

应用纪要

在临床研究中利用UPLC-MS/MS分析血清中的维生素K1

Stephen Balloch, Lisa J. Calton, Gareth Hammond

Waters Corporation



仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

由于维生素K1（叶绿醌）的分子具有疏水性且缺乏电离位点，因此难以使用电喷雾电离质谱法进行分析。另一个问题在于维生素K1的浓度低，它在血清中的浓度可能低至0.1 ng/mL或甚至更低。

本研究利用配备电喷雾电离的UPLC-MS/MS，针对血清中维生素K1的分析开发出一种新的临床研究方法。样品制备过程使用PRiME μ Elution对200 μ L血清进行固相萃取。使用ACQUITY UPLC I-Class FTN（装配ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱填料并采用水/甲醇/氟化铵梯度）与Xevo TQ-S micro联用系统，实现了更低的测量区间下限(0.05 ng/mL)和可重现的精密度，并通过稳定标记内标 $^{13}\text{C}_6$ -维生素K1对离子抑制效应进行了补偿。

优势

- 运行时间短（进样间的间隔时间仅3.7 min）
- 血清中的测量区间下限(LLMI)低至0.05 ng/mL

简介

维生素K是指一组在肠道中吸收的脂溶性维生素，由维生素K1和多种形式的甲基萘醌系列维生素K2组成。

维生素K是一种亲脂性维生素，以低浓度存在于血清中，因此实验室过去使用超临界流体色谱(SLC)或大气压化学电离(APCI)等技术来改善分析灵敏度和结果的选择性。

在本应用纪要中，研究人员开发出一种使用电喷雾电离(ESI)的UPLC-MS/MS方法，该方法在临床研究应用中表现出较高的分析灵敏度并缩短了运行时间。本应用纪要介绍了一种使用UPLC-MS/MS电喷雾电离提取和分析维生素K1的临床研究方法，其运行时间仅需3 min。该方法使用ACQUITY UPLC HSS PFP色谱柱，在ACQUITY UPLC I-Class系统上对提取的样品进行色谱分离，然后利用Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪进行质谱检测（图1）。



图1. ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro系统

实验

样品描述

将600 μL 包含内标的乙醇加入200 μL 血清中。将样品混合并离心处理。取上清液加载至Oasis PRiME HLB $\mu\text{Elution}$ 板上，清洗，然后使用庚烷洗脱。干燥后，用甲醇和水复溶提取物。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-ClassFTN
检测器：	Xevo TQ-S micro
样品瓶：	带有扩展的1 mL玻璃内插管的96孔板（沃特世部件号186000855）

色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS PFP 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (沃特世部件号186005965)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	20 μL
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	0.05 mM氯化铵水溶液
流动相B:	0.05 mM氯化铵的甲醇溶液
梯度:	参见表格

质谱条件

质谱系统:	Xevo TQ-S micro
电离模式:	电喷雾电离 (正离子模式)
采集模式:	MRM (多反应监测) 详细参数见表格
毛细管电压:	1.2 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	650 °C

MRM参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
维生素K1	451.3	187.15 (185.15)	35	20 (20)
[¹³ C ₆]-维生素K1	457.3	193.15	35	20

数据管理

质谱软件:

MassLynx软件4.2版自带的TargetLynx XS应用
管理软件

结果与讨论

下面是人血清样品中维生素K1及其内标的色谱图示例，样品浓度为0.14 ng/mL（图2）。

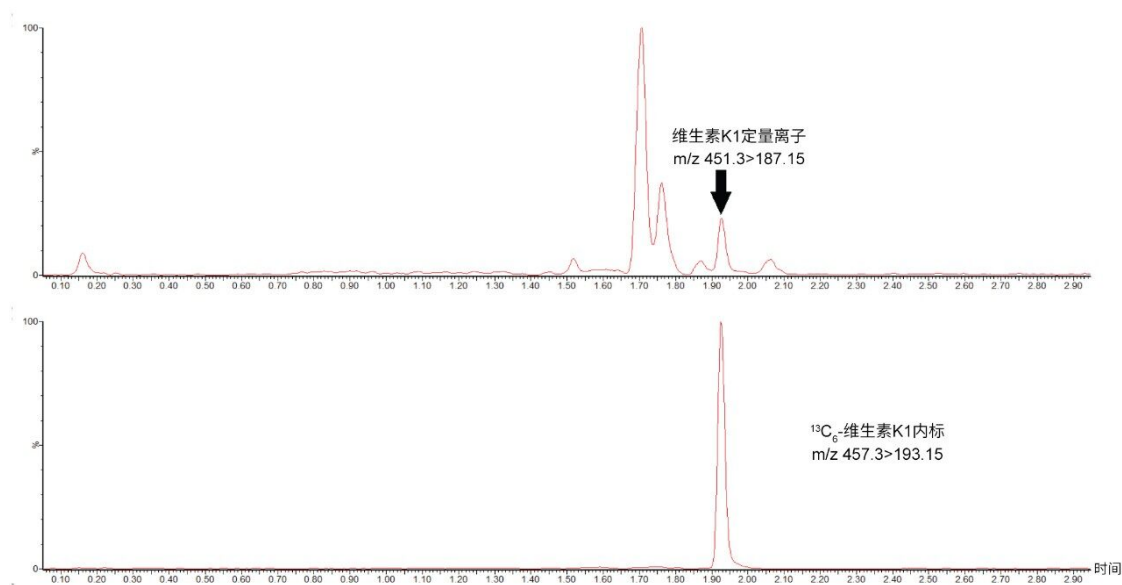


图2.维生素K1及其内标的色谱图

分析高浓度样品之后，未在后续的空白进样中观察到系统残留污染。在五天内萃取并测定五个重复样品以评估精密度(n = 25)。在维生素K1浓度为0.2、0.5和4 ng/mL的QC样品中，总精密度和重复性的CV ≤ 5.4% (表1)。

浓度 (ng/mL)	重现性 (%CV)	合计 (%CV)
0.2	5.4	4.4
0.5	5.4	4.4
4.0	3.2	2.7

表1. 维生素K1的精密度性能汇总

在5天内对经处理的血清中制备的10个低浓度维生素K1重复样进行萃取和定量，评估分析灵敏度。将测量区间下限(LLMI)确定为精密度CV ≤ 20%且偏差CV ≤ 15%时的最低浓度。此外还需要考虑系统能够一致地测量空白血清混合样品的内源性浓度和评估的混合样品浓度之间差异的浓度。将LLMI的浓度视为0.05 ng/mL (表2)。

加标浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	精密度 (%CV)	偏差 (%)
0	0.295	9.0	11.6
0.025	0.305	7.6	5.6
0.05	0.331	7.6	5.3
0.075	0.349	6.7	3.0
0.1	0.373	7.5	2.3

表2. 维生素K1的分析灵敏度汇总

将低浓度和高浓度混合样品按已知比例混合后，在维生素K1浓度为0.077~26 ng/mL的范围内测得该方法呈线性。使用加标处理血清制备的所有校准曲线均呈线性，且决定系数(r^2) ≥ 0.995。

检测典型的内源性干扰物质（白蛋白、胆红素、肌酐、胆固醇、甘油三酯和尿酸）和外源性化合物（视黄醇、

α -生育酚、维生素K1 2,3-环氧化物、维生素K2 2,3-环氧化物和维生素K2) ，供试样品相比于对照样品的回收率均在 $\pm 7.6\%$ 以内。回收率范围超出85%~115%的物质被视为干扰物质。

使用来自六个供体的血清样品研究基质效应。单独定量内源性干扰物的峰面积，使用平均峰面积调整低浓度和高浓度萃取后加标样品的结果，以便与溶剂加标样品的结果进行比较（表3）。尽管观察到维生素K1受到显著抑制，但已证明内标可充分补偿该抑制效应。

加标浓度 (ng/mL)	基于峰面积的基质因子 (范围)	基于响应的基质因子 (范围)
1	0.24 (0.16-0.31)	1.03 (0.95-1.16)
4	0.33 (0.26-0.44)	1.00 (0.90-1.08)

表3. 维生素K1的基质因子汇总

通过分析9种KEQAS（维生素K外部质量保证计划，英国伦敦）维生素K1样品，对计算得出的浓度与ALTM（实验室检测结果的截尾均值）进行比较，以评估准确度。结果可参见表4，与该计划的结果高度吻合，0.19~3.78 ng/mL范围内的平均偏差为7.1%。

KEQAS ID	ALTM (ng/mL)	SD (ng/mL)	沃特世实测浓度 (ng/mL)	与ALTM的偏差 (%)
59A	0.71	0.17	0.82	15.5
59B	0.73	0.16	0.82	12.3
60A	0.33	0.09	0.37	12.1
60B	0.19	0.09	0.18	-5.3
61A	3.78	1.66	2.86	-24.3
62A	0.39	0.17	0.45	15.4
63B	1.43	0.47	1.52	6.3
64B	2.24	0.72	2.44	8.9
65A	2.70	1.17	3.33	23.3

表4. 维生素K1的准确度汇总

获得一组匿名血清样品(n = 66, 0.11~2.05 ng/mL)，与使用APCI独立开发出的SPE-LC-MS/MS方法进行比较。

获得的Deming方程为 $y = 0.97x - 0.07$ ，表现出统计学显著的常值偏差，但是不存在显著的比例偏差。回归曲线如图3所示。

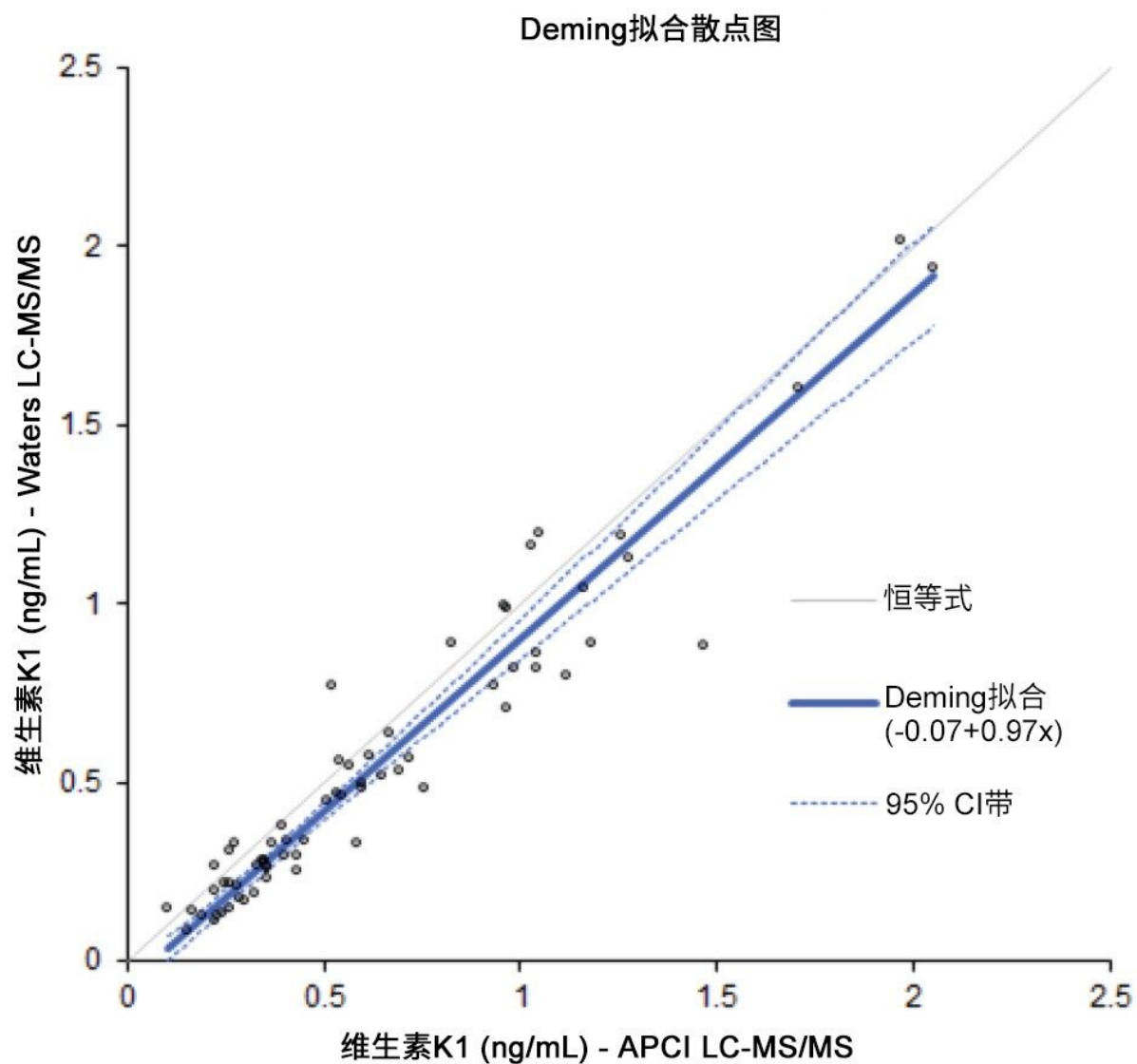


图3.比较独立LC-MS/MS方法与沃特世LC-MS/MS方法的Deming回归曲线

QC浓度下的回收率（萃取效率）为80.2%~93.2%，总体平均值为84.9%，且总体CV为8.6%。

结论

本研究开发出一种快速方法，用于在临床研究中血清中的维生素K1进行具有挑战性的分析。该方法运行时间短，可实现高样品通量。分析灵敏度研究表明，该方法能够可靠地检测血清中浓度 ≤ 0.1 ng/mL的维生素K1。该方法具有非常出色的精密度，无残留，在所需的范围内呈线性，不受检测的内源性化合物和外源性化合物干扰，不存在由所选内标引起的基质效应，并提供一致的萃取效率。此外，采用该方法得到的结果与独立LC-MS/MS方法获得的结果高度吻合，并且与EQA样品的结果也高度吻合。

致谢

本文作者诚挚感谢生物化学和免疫学实验室中心（丹麦瓦埃勒）的Anne Schmedes提供用于方法对比的样品。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007169ZH, 2021年2月