

Bestimmung von Vitamin K mittels LCMS

Die Gruppe der **K-Vitamine** ist hauptsächlich für die **Aktivierung diverser Proteine im menschlichen Körper** zuständig, damit diese ihre zugewiesenen Funktionen erfüllen können. Dementsprechend spielt Vitamin K eine wichtige Rolle bei der **Blutgerinnung** - das „K“ im Namen steht sogar für „Koagulation“. Es ist direkt am **Knochenaufbau** beteiligt, unter anderem durch Aktivierung des Knochenproteins Osteokalzin. Außerdem trägt es dazu bei, die Kalkablagerung in Weichteilen wie Knorpeln und Blutgefäßen zu hemmen. Ein Mangel an Vitamin K gilt mittlerweile als Risikofaktor für **Knochenentkalkung, Gelenkverschleiß und Arterienverkalkung**.

Für die **klinische Analytik** sind Vitamin **K1** (Phyllochinon) und die beiden Formen **MK-4** (Menatetrenon) und **MK-7** (Menachinon-7) des **Vitamin K2** wichtig.

Die Gruppe der K-Vitamine gehört zu den **fettlöslichen Vitaminen**. K1 und K2 MK-4 unterscheiden sich in der Anzahl der Doppelbindungen im Substituenten am Naphthochinon-Grundkörper. Bei MK-7 weist der Substituent eine noch längere Kette und noch mehr Doppelbindungen auf.

Die **Bestimmung mittels LC** scheint nicht mit jeder C18-Phase zu funktionieren. Aber mit der hier eingesetzten **Raptor ARC-18 Core-Shell Säule** konnte eine zuverlässige Methode mit der Matrix Serum validiert werden. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm einer gespickten Serumprobe, Abbildung 2 die verschiedenen Massenspektren.

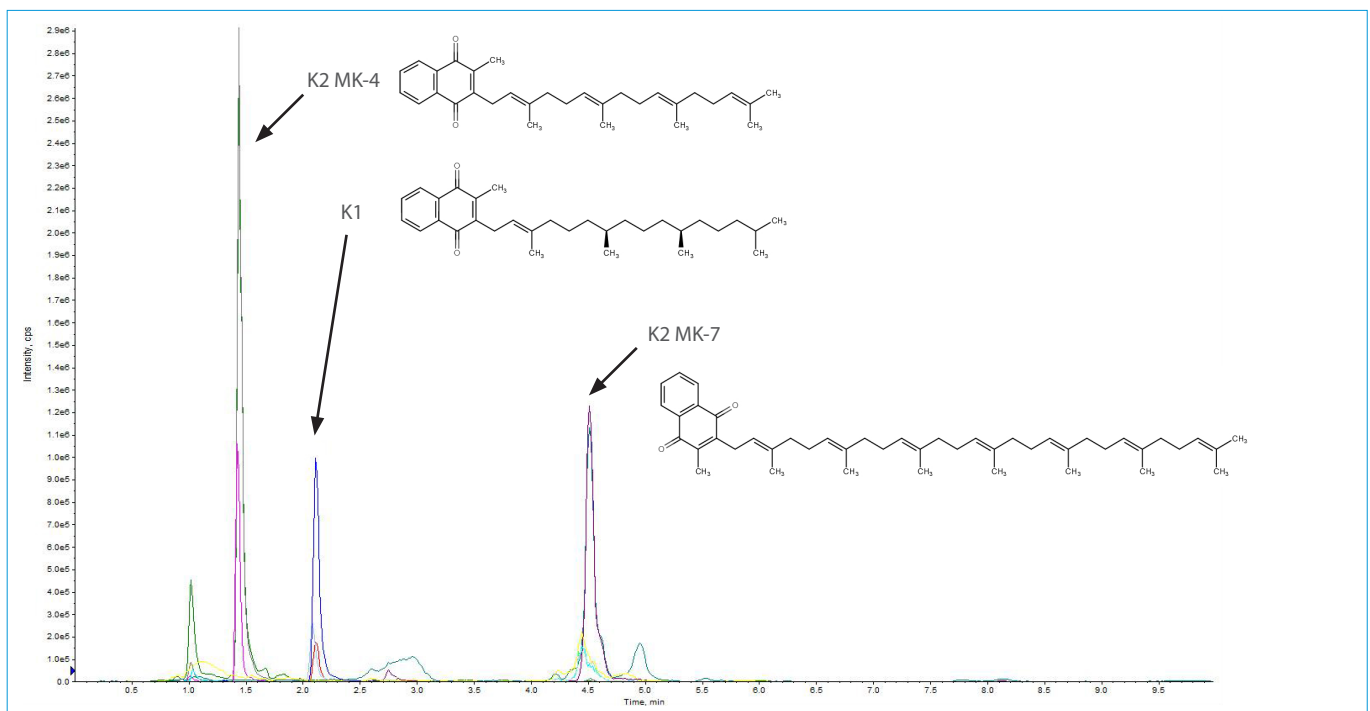


Abbildung 1: Chromatogramm einer gespickten Serumprobe

Literatur: www.wikipedia.de
www.orthoknowledge.de

Formeln: ChemIDplus

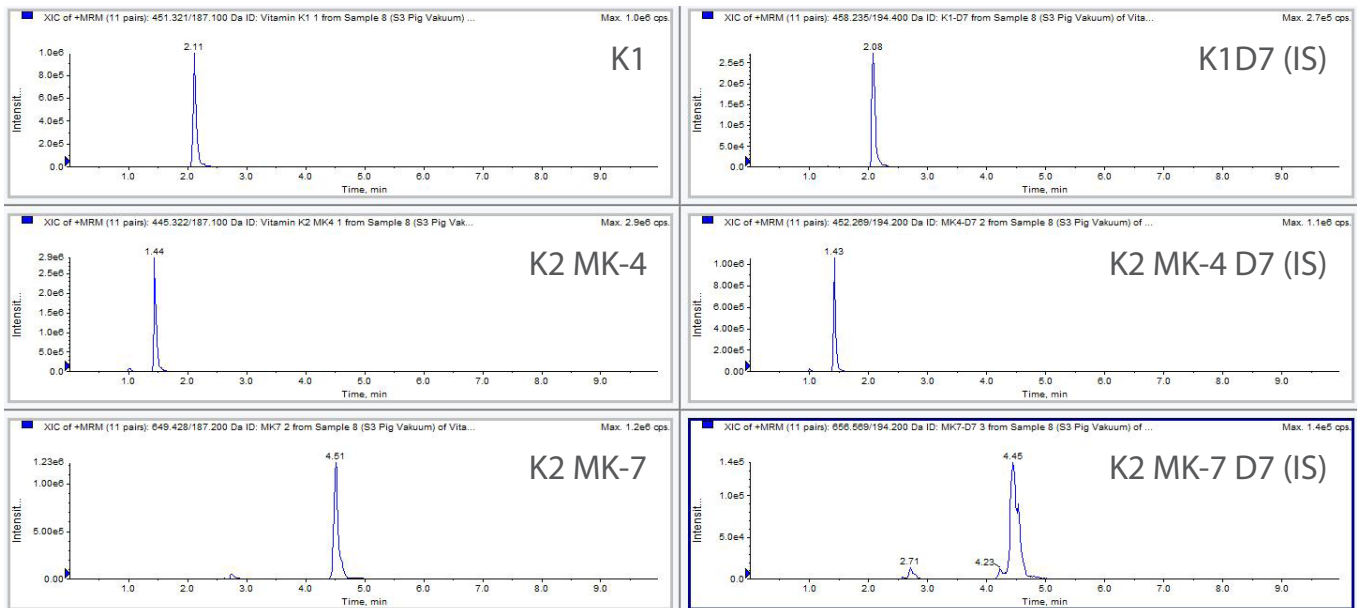


Abbildung 2: Einzelne Massenspektren der gespickten Serumprobe

Probenvorbereitung

1. Proteinfällung

- 500 µL Probe mit 50µL internem Standard versetzen
Interner Standard (in Ethanol gelöst):
 200 ng/mL Vitamin K1-D7, 200 ng/mL Vitamin K2 MK-4-D7 und 100 ng/mL K2 MK-7-D7
- Mit 2000 µL Ethanol fällen, 30 sec vortexen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- Bei 12000 x g 5 min zentrifugieren

2. Festphasenextraktion

- SPE Kartusche: **Restek Bekolut LEOX** 30 mg / 1 mL (Art.Nr. 64043)
- Konditionierung: 1 mL Methanol, gefolgt von 1 mL Wasser
- Probenaufgabe: Den Überstand der Zentrifugation auf die SPE Kartusche geben und langsam durchsaugen
- Waschen: 1 mL Wasser, gefolgt von 1 mL Wasser/Methanol 1:1, anschließend 1 mL Wasser/Methanol 20:80
- Trocknen: 5 min unter Vakuum
- Elution: 1 mL n-Hexan

3. Eluatbehandlung

- Unter Stickstoff bei 60°C zur Trockne eindampfen
- Rekonstituieren mit 150 µL 75% Isopropanol / 25% Wasser

Anmerkung: Die K-Vitamine sind sehr licht- und temperaturempfindlich, weshalb sich die Lagerung der Substanzen und Seren in einem speziellen Gefrierschrank bei -74° bewährt hat.

LC-MS Messung

Säule: Raptor ARC-18 2.7 µm 100x2.1mm (Art.Nr. 9314A12)

- Vorsäule: Raptor ARC-18 2.7 µm 5x2.1mm (Art.Nr. 9314A0252)
- Vorsäulenhalter: EXP Direct Connect (Art.Nr. 25808)
- **Ofentemperatur:** 65°C

Mobile Phase:

- **A:** 98% Methanol / 2% Wasser mit 5mM Ammoniumformiat und 0.1% Ameisensäure
- **B:** 100% Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure
- **Flussrate:** 0.5 mL/min

Gradient:	Zeit [min]	% A	% B
	0.00	100	0
	5.50	100	0
	5.51	0	100
	8.00	0	100
	8.01	100	0
	10.0	100	0

Gerät: Shimadzu LC 20 Nexera XR, Sciex API 4000 MS

- Ionisierungsmodus: ESI positiv
- Messmodus: MRM

Parameter	Precursor Ion m/z	Product Ion Quantifier m/z	Product Ion Qualifier m/z
Vitamin K1	451.28	187.2	71.2
Vitamin K1-D7	458.23	194.4	
Vitamin K2 MK-4	445.25	187.2	81.2
Vitamin K2 MK-4-D7	452.27	194.2	
Vitamin K2 MK-7	649.43	187.2	81.2
Vitamin K2 MK-7-D7	656.57	194.2	

Wir bedanken uns bei:

Jacqueline Fromke-Donath

Labor Blackholm MVZ GmbH

Abteilung Toxikologie

Bahnhofstraße 14

74072 Heilbronn

fromke-donath@labor-hn.com

Restek sichert die richtige Wiedergabe der zur Verfügung gestellten Daten zu.
Restek übernimmt keine Garantie für die Richtigkeit der Angaben.

Fast Facts zur Raptor ARC-18 Core-Shell Säule

Weitere Informationen unter www.restekgmbh.de/raptor



Die Säurebeständige
für komplexe Mischungen

USP Code	L1		
USP Klassifizierung	C18, Octadecylsilan		
Ligandentyp	Sterisch geschützte C18		
Partikelgröße [µm]	1.8	2.7	5
Basismaterial	Core-Shell Partikel aus hochreinem Typ B Kieselgel		
Porenweite [Å]	90		
Oberfläche [m²/g]	125	130	100
Kohlenstoffgehalt [%]	7	7	5
Endcapping	nein		
pH-Bereich	1.0-8.0		
Maximaltemperatur [°C]	80		
Maximaldruck [psi / bar]	15000 / 1034 *	8700 / 600	5800 / 400

* Für maximale Säulenlebensdauer empfehlen wir für den Dauerbetrieb einen Maximaldruck von 12000 psi / 830 bar.

Charakteristik	<ul style="list-style-type: none"> • Optimale Beständigkeit im Säuren • Keine kürzer werdenden Retentionszeiten durch Phasenabbau wie bei herkömmlichen C18-Phasen • Ausgewogenes Retentionsprofil
Wechseln Sie zur Raptor ARC-18 Phase, wenn Sie ...	<ul style="list-style-type: none"> • komplexe Mischungen mit LC-MS analysieren müssen. Die Analyten eluieren meist gleichmäßig über den Gradienten verteilt. • saure Eluenten nutzen (pH 1-3). • schnelle Trennungen mit langen Säulenstandzeiten bei niedrigen pH-Werten erreichen möchten.
Anwendungsbeispiele	Aflatoxine, Aldehyde/Ketone (DNPH), Aminosäuren (FMOC), Anthocyanidine, Cannabinoide / Cannabis-Analytik, Flavonoide, Polyphenole, Pestizide (!), Resveratrol in Wein, Sprengstoffe, Statine, fettlösliche Vitamine, Vitamin D Metabolite, Vitamin K

Wie wär's mit einem unverbindlichen Test?