**Определение витамина К2 в биологических матрицах методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии**

***Макаркин С.Д., Вокуев М.Ф.***

*Студент, 6 курс специалитета*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail:* stepan.maksrkin@gmail.com

Витамин К — общий термин для наименования гидрофобных и жирорастворимых витаминов, сходного строения и близкой функции в организме. Витамин K по химической природе представляет ряд производных 2-метил-1,4-нафтохинона, необходимых для синтеза белков, обеспечивающих процесс свертывания крови. В целом, витамин К существует в различных формах, таких как филлохинон, менахинон и мениадион, каждая из которых имеет свою биологическую активность и биохимическую функцию. Объектом нашего исследования является менахинон-4 (MK4), известный как одна из форм витамина К2. В отличие от витамина К1, менахинон синтезируется бактериями в кишечнике и также может быть получен из продуктов животного происхождения, таких как мясо и молочные продукты. Несмотря на то, что исследования витамина К продолжаются, понимание его различных форм помогает лучше понять его роль в общем здоровье человека. Целью работы является разработка надежного подхода для определения витамина К2 в сложных биологических матрицах (плазма и сыворотка крови человека, насекомые Drosophila).

На первом этапе работы были выбраны условия масс-спектрометрического детектирования. В результате предварительных экспериментов чувствительность определения MK4 в режиме химической ионизации при атмосферном давлении оказалась выше, чем при ионизации электрораспылением. Были изучены масс-спектры первого и второго поколения в режиме детектирования положительно и отрицательно заряженных молекул и выбраны следующие MRM-переходы: *m/z* 444.1-185.1 и m/z 444.1-224.2 Да в режиме отрицательно заряженных молекул. Для выбранных MRM-переходов оптимизировали следующие параметры масс-спектрометра: потенциал декластеризации, входной потенциал, энергия соударения.

На втором этапе были выбраны оптимальные условия хроматографирования в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижных фаз использовали деионизированную воду и метанол. Температура термостата колонки 40˚С. Предел обнаружения витамина МК4 в выбранных условиях составил 11 нг/мл

Для извлечения МК4 из биологических объектов использовали твердофазную экстракцию (ТФЭ). Сравнивали несколько типов картриджей для ТФЭ с неполярными сорбентами: Oasis HLB (60 мг, Waters, Ирландия), Strata SDB-L (100 мг, Phenomenex, США), CHROMABOND C18 (100 мг, Macherey-Nagel, Германия), CHROMABOND HR-P (300 мг, Macherey-Nagel, Германия). Наиболее оптимальным оказался обращенно-фазовый сорбент CHROMABOND HR-P – высокопористый сополимер полистирола и дивинилбензола. Использовались следующие биологические матрицы: плазма и сыворотка крови человека, мухи-дрозофилы. Для достижения наибольшей степени ТФЭ извлечения витамина МК4 были выбраны следующих условия: кондиционирование - 3 мл раствора смеси метанол-изопропанол 1:1 и 2 мл раствора вода-метанол 9:1; промывка - 1 мл смеси (50% вода, 50% метанол), затем 0.5 мл метанола; элюирование - 2 мл дихлорметана. Далее упаривали дихлорметан досуха и перерастворяли в 200 мкл подвижной фазы для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Степень извлечения и матричный эффект при использовании плазмы составили 71% и 98% соответственно, а в случае эксперимента с сывороткой – 64% и 90% соответственно.

**Литература**

1. Yan, Q.; Zhang, T.; O’Connor, C.; Barlow, J. W.; Walsh, J.; Scalabrino, G.; Xu, F.; Sheridan, H. The Biological Responses of Vitamin K2: A Comprehensive Review. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *11* (4), 1634–1656. https://doi.org/10.1002/fsn3.3213.