Supplementary Materials

Development, Validation, and Two-Year Application of Rapid and Simple LC-MS/MS-Based Method for the Determination of K2MK-7 in Blood Samples

Łukasz Paprotny , Dorota Szewczak , Iryna Bryshten and Dorota Wianowska

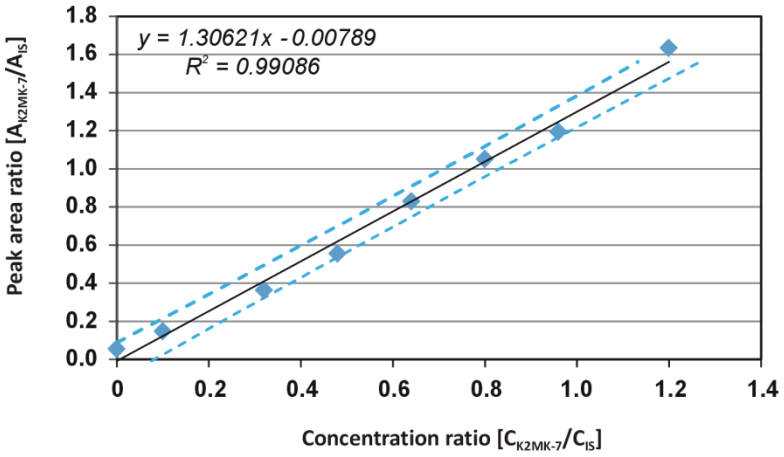


Figure S1. Calibration curve with marked confidence intervals at the confidence level 0.95.

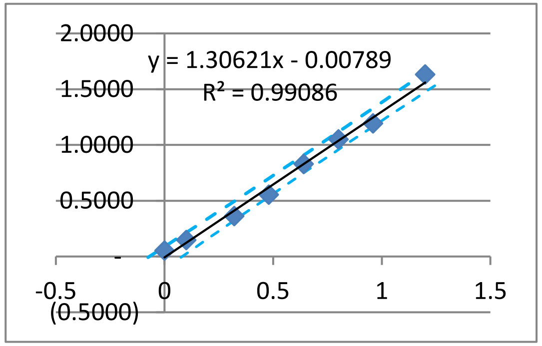
Table S1. Raw data for calibration curve together with statistical analysis

n	Xi	Yi-1	Yi-2	Yi-3	Yi	XiYi			Xi^2	Yi^2	Xi-X_	(Xi-X_)^2	Yi-Y_	(Yi-Y_)^2	(Xi-X_)(Yi-Y_)	di	di^2
1	0	0,0528596	0,05286	0,05286	0,0529	0	0	0	0	0,002794137	-0,5625	0,316406	-0,67399	0,454261	0,379119	0,06075389	0,003691
2	0,1	0,145376	0,152094	0,140187	0,1459	0,014589	0,015209	0,0140187	0,01	0,021282628	-0,4625	0,213906	-0,58096	0,337518	0,268695	0,02315901	0,000536
3	0,32	0,387264	0,286261	0,412377	0,3620	0,11583	0,091604	0,1319606	0,1024	0,13102035	-0,2425	0,058806	-0,36488	0,133138	0,088484	-0,0481254	0,002316
4	0,48	0,598249	-	0,507398	0,5528	0,265355	#ARG!	0,243551	0,2304	0,305613822	-0,0825	0,006806	-0,17403	0,030285	0,014357	-0,0662627	0,004391
5	0,64	0,746753	0,974228	0,762835	0,8279	0,529881	0,623506	0,4882144	0,4096	0,685482436	0,0775	0,006006	0,10109	0,010219	0,007834	-0,0001411	1,99E-08
6	0,8	1,02827	1,07562	1,0422	1,0487	0,838957	0,860496	0,83376	0,64	1,099764699	0,2375	0,056406	0,321848	0,103586	0,076439	0,01162342	0,000135
7	0,96	1,41577	1,08118	1,08012	1,1924	1,144662	1,037933	1,0369152	0,9216	1,421714421	0,3975	0,158006	0,465508	0,216698	0,185039	-0,0537101	0,002885
8	1,2	1,7325	1,52746	1,63682	1,6323	1,958712	1,832952	1,964184	1,44	2,664272708	0,6375	0,406406	0,905411	0,81977	0,5772	0,07270298	0,005286
								0,5528235									
								0,0642414									
	X_				Y_												
Średnia	*0,5625*				*0,726848513*	*0,608498*		*11,62059*	*0,46925*	*0,79149315*							
n	SXi				SYi	SXiYi			S(Xi^2)	S(Yi^2)					S(Xi-X_)(Yi-Y_)		S(di^2)
8	**4,5**				**5,8147881**	**4,867986**			**3,754**	**6,3319452**		**1,22275**		**2,105475**	**1,597168**		**0,01924**

n	a nS(XiYi)-SXiSYi	b S(Xi^2)Syi-(SXiYi)Sxi	S_y S(di^2)/(n-2)	D S(Xi^2)*n	S_a^2 (S_{y^2}n)/D	S_b^2 (S_{y^2}S(Xi^2))/D	S_a Ö(Sa^2)	S_b Ö(Sb^2)	R^2 (S(Xi-X_)(Yi-Y_))^2
1	12,77734	-0,077222	0,003207	30,032	0,025653066	0,012038	0,05121	0,03508	2,550944237
2									
3	nS(Xi^2)-(Sxi)^2	nS(Xi^2)-(Sxi)^2	Ö()	Sxi*Sxi					S(Xi-X_)^2S(Yi-Y_)^2
4	9,782	9,782	0,056627	20,25					2,574469702
5									
6	1,306209	-0,007894		9,782	0,002622477	0,001231			0,990862015
7									
8									

y=ax+b

a	***przedział ufności***	***b***	***przedział ufności***
1,3062094	0,106005	-0,007894	0,072615327



Xi	Xical	% Bias
0	0,04651	#DZIEL/0!
0,1	0,11773	17,73
0,32	0,28316	-11,51
0,48	0,42927	-10,57
0,64	0,63989	-0,02
0,8	0,80890	1,11

linia		
	0	-0,007894
	1,2	1,559557

no	x	y		-	+
0	0	-0,00789	0,037	-0,0757	0,075699
1	0,06	0,070478	0,036	-0,01354	0,133536
2	0,12	0,148851	0,035	0,048498	0,191502
3	0,18	0,227223	0,034	0,110391	0,249609
4	0,24	0,305596	0,033	0,172133	0,307867

	0,918	
0,96	88	-4,28
	1,255	
1,2	66	4,64

				n-2	
		poziom ufności	0,95	*t*	**2,07**
		przedział ufności			

n	**Yi**	**Xi**	**Sx**	**Xi**	
1	0,05286	0	0,036	-0,07	0,07
2	0,14586	0,1	0,034	0,03	0,17
3	0,36196	0,32	0,031	0,26	0,38
4	0,55284	0,48	0,030	0,42	0,54
5	0,82793	0,64	0,030	0,58	0,70
6	1,04869	0,8	0,031	0,74	0,86
7	1,19257	0,96	0,033	0,89	1,03
8	1,6323	1,2	0,040	1,12	1,28

5	0,3	0,383969	0,032	0,23371	0,36629
6	0,36	0,462341	0,031	0,295112	0,424888
7	0,42	0,540714	0,031	0,356325	0,483675
8	0,48	0,619086	0,030	0,41734	0,54266
9	0,54	0,697459	0,030	0,478147	0,601853
10	0,6	0,775831	0,030	0,538737	0,661263
11	0,66	0,854204	0,029	0,599104	0,720896
12	0,72	0,932576	0,029	0,659245	0,780755
13	0,78	1,010949	0,029	0,719157	0,840843
14	0,84	1,089322	0,030	0,778841	0,901159
15	0,9	1,167694	0,030	0,838301	0,961699
16	0,96	1,246067	0,030	0,897543	1,022457
17	1,02	1,324439	0,031	0,956575	1,083425
18	1,08	1,402812	0,031	1,015406	1,144594
19	1,14	1,481184	0,032	1,074046	1,205954
20	1,2	1,559557	0,033	1,132508	1,267492

Table S2. The lack-of-fit test

H_0	There is no lack of fit
H_A	There is lack of fit

Concentration	Signal 1	Signal 2	Signal 3	Mean signal	Signal_calc (au)	(mean-calculated)^2	MSS (LoF)	(Signal1(i)-mean_signal(i))^2	(Signal2(i)-mean_signal(i))^2	(Signal3(i)-mean_signal(i))^2	MSS (error)
0	0,0520775	0,0672389	0,052852	0,0574	-0,0079	0,004262	0,00515	0,0000282	0,0000970	0,0000206	0,010184
0,1	0,145376	0,152094	0,140187	0,1459	0,1227	0,000536		0,0000003	0,0000385	0,0000325	
0,32	0,387264	0,286261	0,412377	0,3620	0,4101	0,002316		0,0006399	0,0057314	0,0025411	
0,48	0,598249	0,378097	0,507398	0,4946	0,6191	0,015501		0,0107470	0,0135686	0,0001643	
0,64	0,746753	0,974228	0,762835	0,8279	0,8281	0,000000		0,0065911	0,0214006	0,0042385	
0,8	1,02827	1,07562	1,0422	1,0487	1,0371	0,000135		0,0004172	0,0007249	0,0000422	
0,96	1,41577	1,08118	1,08012	1,1924	1,2461	0,002885		0,0499135	0,0123603	0,0125971	
1,2	1,7325	1,52746	1,63682	1,6323	1,5596	0,005286		0,0100481	0,0109830	0,0000208	

slope	1,3062094
intercept	-0,0078943

n	8
p	3

DoF (numerator)=	7
DoF (denominator)=	18
F_tab=	2,58
F_calc=	0,790

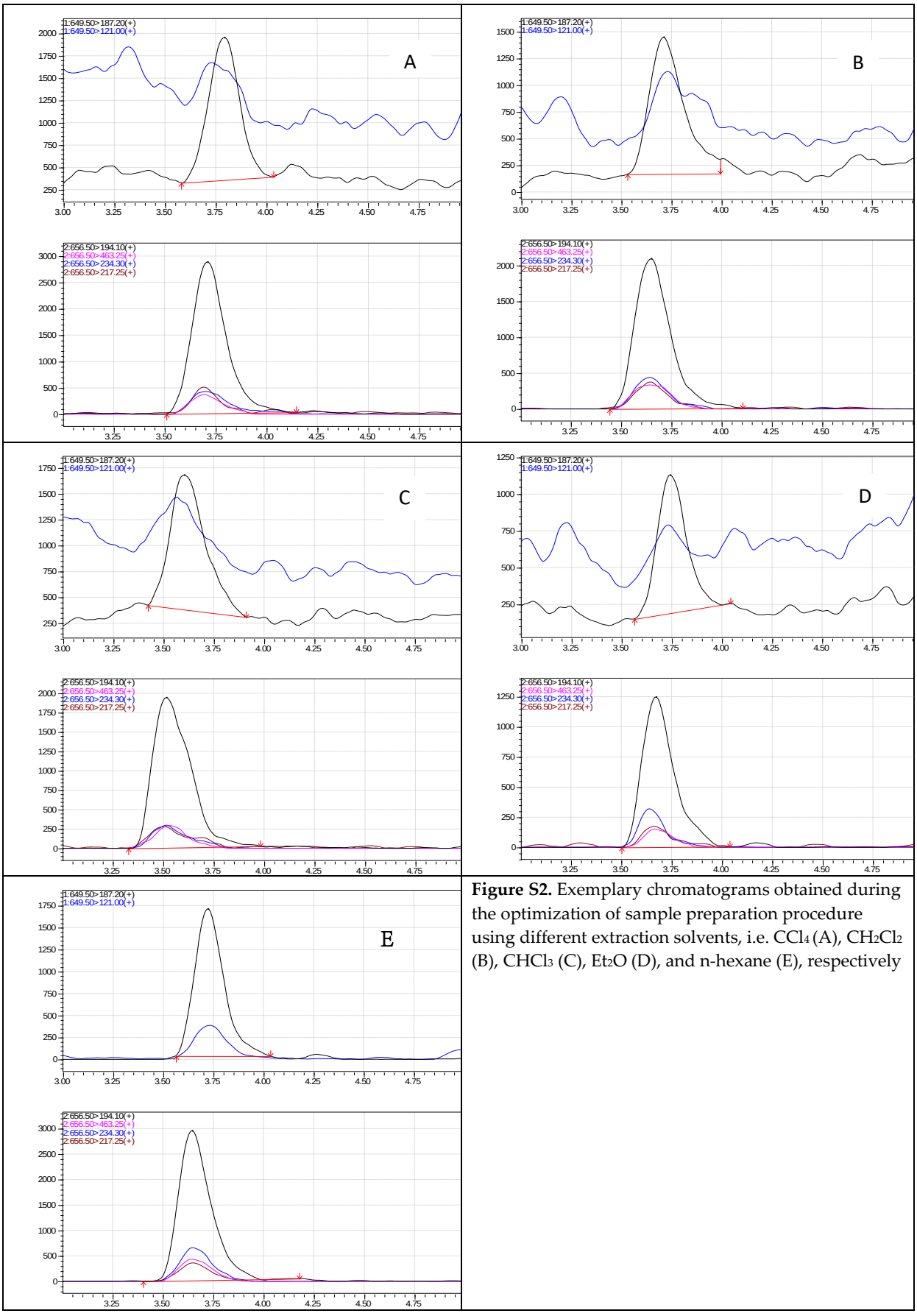


Figure S2. Exemplary chromatograms obtained during the optimization of sample preparation procedure using different extraction solvents, i.e. CCl_4 (A), CH_2Cl_2 (B), $CHCl_3$ (C), Et_2O (D), and n-hexane (E), respectively

Table S3. The influence of the number of extraction cycles on the surface area of the vitamin K2MK-7 peak extracted using 500 and 250 μL of n-hexane, respectively

Cycle number	500 μL	250 μL
1	31194 ± 674	19071 ± 622
2	1940 ± 483	7247 ± 1141
3	n.d.	6371 ± 701
Total	33134 ± 1157	32689 ± 2464

Table S4. Results of comparative studies

Sample number	Lab 1	Lab 2
1	1,3412	1,1467
2	2,6195	2,3838
3	0,2842	0,2473
4	0,4484	0,4874
5	0,4441	0,3819
6	0,1461	0,1242
7	3,6302	3,0494
8	0,1585	0,1426
9	0,3492	0,3212
10	3,2486	3,6501
11	0,1400	0,1246
12	11,6607	10,4946
13	9,8915	8,9024
14	0,5110	0,4343
15	0,1012	0,1205
16	0,2309	0,1986
17	1,1451	0,9963
18	1,9074	1,8120
19	0,4140	0,3560
20	0,3700	0,3145
21	0,1470	0,1279
22	0,8100	0,7290
23	0,2026	0,1732
24	1,4940	1,3595
25	2,9381	3,3771
26	2,7799	2,5575
27	0,6037	0,5192
28	2,3655	2,0107
29	0,4067	0,3416
30	0,1474	0,1327
31	0,2588	0,2381
32	0,3824	0,4297

33	0,0815	0,0725
34	0,1424	0,1282
35	2,1365	1,9229
36	0,3816	0,3244
37	0,7482	0,6285
38	0,6977	0,8113
39	0,3426	0,3938
40	0,1617	0,1536
41	3,6728	3,1586
42	2,7141	3,1930
43	2,6850	2,3360
44	1,9942	1,7948
45	1,5802	1,3511
46	0,2022	0,2222
47	1,7170	1,4938
48	2,2546	2,0742
49	0,1250	0,1075
50	3,1480	3,7035