



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**DETERMINACIÓN DE VITAMINA K POR  
HPLC**

Autor: Luis Botica Moros

Fecha: Junio 2019

Tutor: Pedro Andrés Carvajales

# INDICE

INDICE	2
1 RESUMEN	3
2 ABSTRACT	3
3 INTRODUCCIÓN	3
3.1 FUNCIÓN DE LA VITAMINA	4
3.2 METABOLISMO	4
3.3 FUENTES DE VITAMINA K	6
3.4 INGESTAS RECOMENDADAS	7
3.4.1 EXCESO DE VITAMINA K	7
3.5 HPLC	8
3.5.1 HPLC EN FASE INVERSA.	8
3.5.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	10
4 OBJETIVOS	11
5 MÉTODOS	11
6 DISCUSIÓN Y RESULTADOS	12
6.1 SUERO Y PLASMA	12
6.2 ORINA	14
6.3 SUPLEMENTOS	16
6.4 ALIMENTOS	16
6.5 OTROS BIOMARCADORES	17
7 CONCLUSIONES	17
8 BIBLIOGRAFÍA	18

## 1 RESUMEN

La vitamina K es un nutriente esencial que cumple, principalmente, funciones relacionadas con la coagulación y la formación de hueso. Existen dos formas para la vitamina K: fitoquinonas (K1) y menadionas (K2). Las principales fuentes de vitamina K (fitoquinonas) son los vegetales de hoja verde y el género brassica, las fuentes de menadionas son de origen bacteriano y animal. Según WHO/FAO, la ingesta recomendada para adultos es de 65 µg/día para hombres y 55 µg/día para mujeres. La técnica más ampliamente utilizada para la determinación de vitamina K es el HPLC en fase inversa, ajustando el tipo de detección al tipo de muestra, ya que ésta condiciona que se valore el metabolito o la vitamina como tal. Los principales métodos de detección son: fluorescencia directa o por derivatización y espectrometría de masas.

**Palabras clave:** Vitamina K, HPLC, cromatografía, fase inversa, fitoquinonas, menadionas.

## 2 ABSTRACT

Vitamin K is an essential nutrient that mainly performs functions related to coagulation and bone metabolism. There are two forms of vitamin K: phytoquinones and menadione. The main sources of vitamin K (phytoquinones) are green leafy vegetables and Brassica; the sources of menadione have a bacterial and animal origin. According to WHO/FAO, the recommended intake for adults is 65 µg/day for men and 55 µg/day for women. The most widely used technique for the determination of vitamin K is the reverse-phase HPLC, the detection rely on the source of the sample. The main detection methods are: direct fluorescence and mass spectrometry.

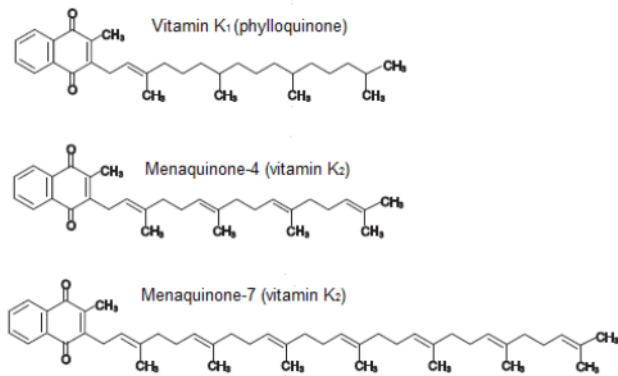
**Keywords:** Vitamin K, HPLC, chromatography, reverse phase, phytoquinones, menadione.

## 3 INTRODUCCIÓN

La vitamina K es un micronutriente liposoluble conocido principalmente por su acción sobre la coagulación y el metabolismo óseo. Ésta se encuentra de forma natural, mayormente, bajo dos estructuras: Fitoquinonas (“vitamina K<sub>1</sub>”) y menaquinonas (“vitamina K<sub>2</sub>”) <sup>1</sup>. Las fitoquinonas suponen la principal fuente de vitamina K; se encuentran principalmente en vegetales de hoja verde y en algunos aceites de origen vegetal. Las menaquinonas, en cambio, son un grupo de compuestos sintetizados principalmente en bacterias (algunas de ellas pertenecen a la microbiota intestinal) y, en menor medida, en productos fermentados y de origen animal. <sup>1</sup>

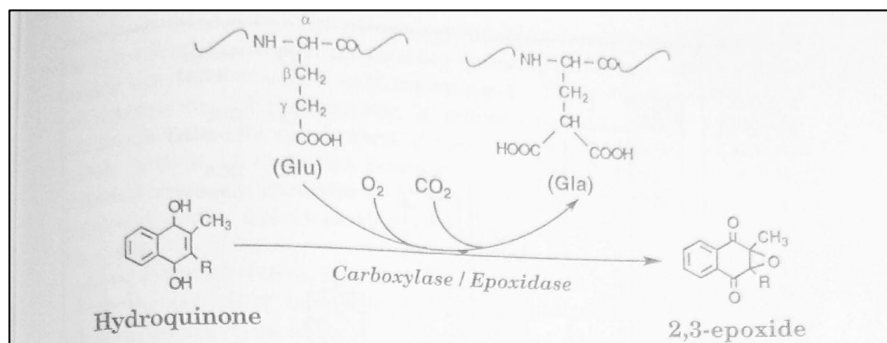
Ambas formas consisten en un anillo de naftoquinona sustituido en la posición número 2, con un grupo metil y un sustituyente de cadena larga en posición 3. La vitamina K<sub>1</sub> tiene un radical fitilo en posición 3; la K<sub>2</sub> supone un grupo de compuestos con sustituyentes sobre el C3 de longitud variable, dicha longitud da nombre a las vitaminas de la serie MK<sub>n</sub>. <sup>1</sup>

### Vitamin K



### 3.1 FUNCIÓN DE LA VITAMINA

La importancia de este grupo de vitaminas radica en su acción sobre la coagulación sanguínea y el metabolismo óseo. En cuanto a la hemostasia, se sabe que la vitamina K mantiene las concentraciones normales de los factores de coagulación II, VII, IX y X (protrombina, proconvertina, Christmas y Stuart Prower, respectivamente).<sup>2</sup> Todos estos factores se sintetizan en el hígado a partir de un precursor inactivo dependiente de la vitamina K para ser biológicamente activo.<sup>3</sup>

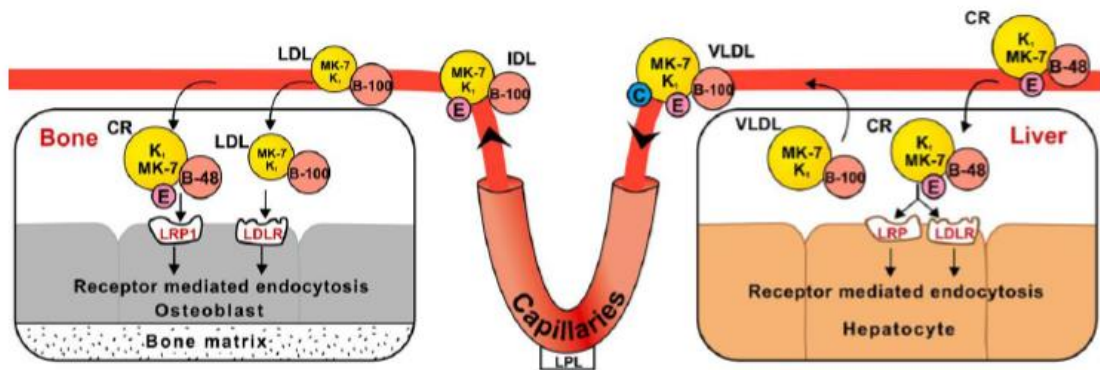


La vitamina K es necesaria para introducir grupos carbonilo en los residuos de ácido glutámico de los factores (II, VII, IX y X) para sintetizar  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla). Esta carboxilación también se da a nivel extrahepático sobre las proteínas BGP (Bone Gla-Protein) y MGP (Matrix Gla-Protein); relacionadas con la mineralización del hueso y la inhibición de la calcificación vascular, respectivamente. No obstante, si no se da la reducción de la vitamina K, se pierde la capacidad para unir  $\text{Ca}^{+2}$  y con ella se detiene el metabolismo óseo y se aumenta la calcificación vascular.<sup>2,3,4</sup>

### 3.2 METABOLISMO

Esta vitamina es hidrófoba y apolar, por tanto depende de la correcta absorción y digestión de grasas para su absorción. Después de su digestión en el tracto intestinal, la vitamina K adquirida

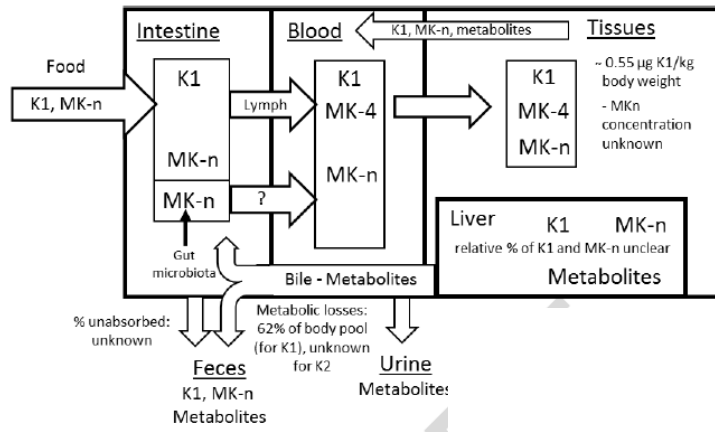
mediante la dieta y los triglicéridos son emulsionados por las sales biliares que forman micelas en los enterocitos, donde son procesados hasta organizarse en quilomicrones.<sup>1,3,4</sup> Estos quilomicrones que contienen las apolipoproteínas A y B (apoA y apoB) son secretados al sistema linfático y a la circulación sistémica para ser modificados periféricamente por acción de la lipoproteinlipasa (LPL); a pesar de las transformaciones, la vitamina K se mantiene en el núcleo lipofílico. La acción de la LPL provoca la pérdida de gran cantidad de triglicéridos, de modo que los quilomicrones se reincorporan al torrente sanguíneo con un menor tamaño.<sup>4</sup> La llegada al hígado de la vitamina K parece seguir el mismo camino que las lipoproteínas; entran por endocitosis al hepatocito y son procesadas hasta obtener moléculas de LDL más pequeñas, manteniendo la vitamina en el núcleo lipofílico.<sup>1</sup> La llegada al tejido óseo está relacionada con el camino que siguen quilomicrones y LDL: los osteoblastos expresan receptores para lipoproteínas. La necesidad de esta llegada está justificada por la naturaleza anabólica de los osteoblastos; en ellos se sintetiza la osteocalcina, de esta forma se produce la carboxilación de ésta y, por tanto, su activación.<sup>1,3,4</sup>



La funcionalidad de la vitamina viene determinada por su epoxidación que, además, permite recuperar los cofactores que participaron en la reacción. Este ciclo permite preservar funcionalidad y mantener los depósitos microsomales de vitamina K: por un lado, se produce la carboxilación de las proteínas dependientes de vitamina K y la epoxidación de ésta; por otro lado, se recupera la vitamina K oxidada mediante una reducción.<sup>4</sup> Estas reacciones son monitorizadas por dos proteínas integrales de membrana:  $\gamma$ -glutamyl carboxilasa (GGCX) y vitamina K epóxido reductasa (VKOR).<sup>1,4</sup> Existen evidencias de que estas enzimas forman parte de un mecanismo concertado para la eficiente oxidación-reducción de la vitamina K, lo que se traduce en un intento por parte de la célula para mantener concentraciones limitadas de la vitamina a modo de almacenaje.<sup>4</sup>

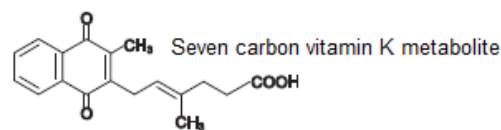
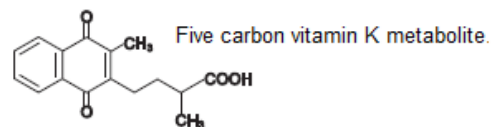
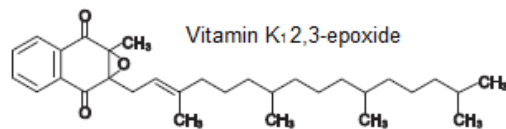
En cuanto a su catabolismo, éste es común para la filoquinonas y las menaquinonas. Se produce en el hígado, donde las cadenas poli-isopreniladas son acortadas mediante una  $\omega$ -oxidación seguida de una  $\beta$ -oxidación; esto lleva a la formación de dos metabolitos no glucídicos y heterósidos (ambos comparten el núcleo de naftoquinona de la vitamina K) con sustituyentes de una longitud de 5 y 7 carbonos cada uno. Estos metabolitos se conjugan con ácido glucurónico para ser excretados por orina y ácidos biliares.<sup>4</sup>

En función de la localización se puede encontrar las diferentes formas de la vitamina. En orina sólo se hayan compuestos originarios del metabolismo; en sangre, metabolitos y vitamina K (K<sub>1</sub> y MK-n) y, en tejidos, sólo la vitamina (K<sub>1</sub> y MK-n, especialmente MK-4).<sup>1</sup>



Los metabolitos más probables, no conjugados, de la vitamina K son:<sup>1</sup>

### METABOLITOS DE LA VITAMINA K



### 3.3 FUENTES DE VITAMINA K

Las fitoquinonas están presentes en todas las plantas fotosintéticas, sus principales fuentes son vegetales de hoja verde (espinacas, lechuga y demás vegetales para ensalada) y el género Brassica (en flores y hojas); con valores de 60–365  $\mu\text{g}$  y 80–585  $\mu\text{g}$  por 100 g, respectivamente.<sup>1</sup>

Las menadionas se encuentran en mayor medida en alimentos de origen animal, particularmente en productos elaborados a partir de hígado (mayormente MK-4 en un rango de 0.3–369  $\mu\text{g}/100$  g, según EFSA)<sup>1</sup>. También se haya en productos cárnicos (MK-4 0.1–42  $\mu\text{g}/100$  g)<sup>1</sup>, en productos lácteos (de MK-4 a MK-10, especialmente MK-9, en una concentración de 0.1–94 $\mu\text{g}/100$  g) y la MK-7 se encuentra especialmente en el fermento de soja en un intervalo de 850  $\mu\text{g}$ –1,000  $\mu\text{g}/100$  g.<sup>1</sup>

### 3.4 INGESTAS RECOMENDADAS

Datos de ingestas recomendadas actualizados en el año 2017 por WHO/FAO (World Health Organization/ Food and Agriculture Organization), AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) y D-A-CH (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft):

	WHO/FAO(a)	AFSSA(a)		D-A-CH(a)	
Edad	19- $\geq$ 65	19-74	$\geq$ 75	19-50	51- $\geq$ 65
Sexo					
Hombre	65	120	70	70	80
Mujer	55	90	70	60	65

(a)  $\mu\text{g}/\text{día}$

Las recomendaciones fueron estimadas considerando una ingesta diaria de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; la AFSSA y D-A-CH tuvieron en cuenta para su estimación el reciclaje hepático en la edad adulta, por ello es menor para los mayores de 70 años.<sup>1</sup>

La WHO/FAO establece una ingesta recomendada para lactantes entre 7 y 12 meses de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$  y de 35-55 $\mu\text{g}/\text{día}$  para niños entre 10 y 18 años. También ha referido el uso de la suplementación como medida profiláctica para recién nacidos contra la enfermedad hemorrágica neonatal.<sup>1,4</sup>

#### 3.4.1 EXCESO DE VITAMINA K

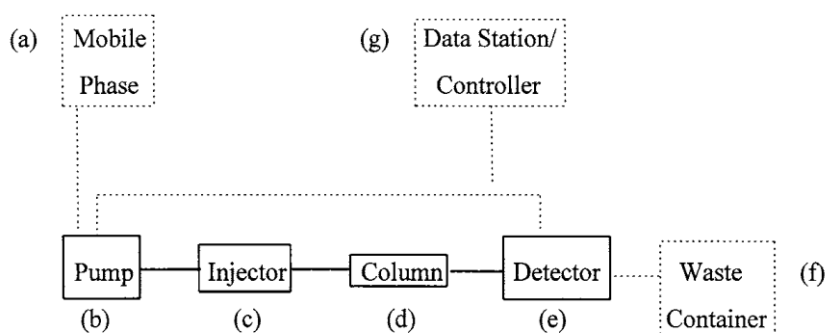
Dos estudios sobre la sobredosificación en humano (Craciun et al., 1998; Booth et al. 2001) determinaron que no existe evidencia sobre efectos adversos en la salud, teniendo en cuenta una suplementación de 10mg/día durante un mes.<sup>1</sup>

Dos ensayos sobre el uso profiláctico en recién nacidos (con dosis parenteral suprafisiológica de 0,2mg/Kg y 1mg en bolo) realizados por Clarke et al. en 2006 y Harrington et al. 2010 mostraron que aumentando la concentración en sangre en los pacientes no se observaba un efecto nocivo sobre la salud; los niños eran capaces de metabolizar las dosis de vitamina K.<sup>1</sup>

### 3.5 HPLC

Por definición, la cromatografía es un sistema de separación en el que los componentes de una mezcla se separan en función de la interacción que existe entre cada uno de ellos con la fase estacionaria. También hay que tener en cuenta la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil.<sup>5</sup>

La instrumentación necesaria consta de (a) un contenedor de eluyentes para la fase móvil, (b) una bomba de presión para mover la fase móvil, (c) un sistema de inyección para introducir las muestras, (d) una columna donde se encuentra la fase estacionaria, (e) un detector que reconozca los solutos, y (g) un equipo informático para el análisis y archivo de datos.<sup>5</sup>



La columna es clave para la separación cromatográfica; la selectividad, eficacia y capacidad de la técnica se ven afectadas por la naturaleza de los componentes de la fase estacionaria y la fase móvil. Las fases estacionarias más utilizadas en fase inversa son la C18, C8 y la de fenilo. Siendo la más utilizada, según las fuentes bibliográficas consultadas para el tipo de moléculas a separar, la C18.<sup>5,6</sup>

#### 3.5.1 HPLC EN FASE INVERSA.

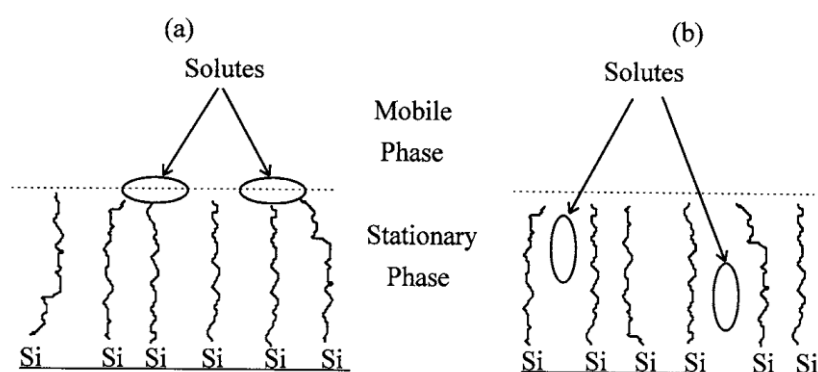
La técnica más ampliamente usada para la determinación de la vitamina K es la HPLC en fase inversa, según las fuentes bibliográficas consultadas.<sup>1</sup> La popularidad y elección de este método para la detección de la vitamina K se justifica por su simplicidad, versatilidad y su alcance de aplicación; ya que no es sólo aplicable a moléculas no polares y no iónicas, sino que se puede aplicar a compuestos iónicos también.<sup>5,6,7</sup>

La fase móvil (polar) es acuosa o una mezcla de agua y un modificador orgánico (metanol o acetonitrilo), esta mezcla de componentes polares y menos polares se utiliza para conseguir una fuerza de elución adecuada; la fase estacionaria (no polar) está formada por siliconas modificadas en sus grupos silanol, la más utilizada es la C18 [  $-(\text{CH}_2)_{18}$  ].<sup>7</sup>



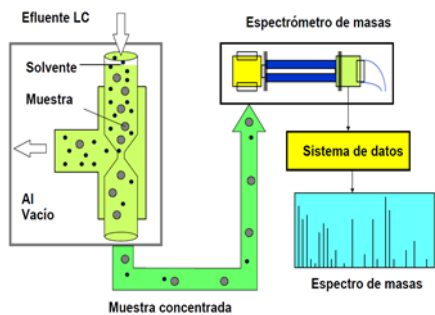
La base para la retención en esta técnica se relaciona con la fuerza de las interacciones entre el analito, la fase móvil y la superficie de la fase estacionaria. Una mayor fuerza en la interacción se traduce en un mayor tiempo de retención.<sup>6</sup> La interacción se ha intentado explicar mediante dos teorías:<sup>5</sup>

- a) Teoría de la partición: reparto de los componentes de la muestra problema entre la fase móvil y la fase estacionaria, quedan en la superficie de ésta.<sup>5</sup>
- b) Fuerzas hidrofóbicas: La retención se produce por interacciones hidrofóbicas entre los solutos, la fase móvil y la fase estacionaria; de forma que las moléculas menos polares quedan en los radicales hidrófobos de la fase estacionaria.<sup>5,7</sup>

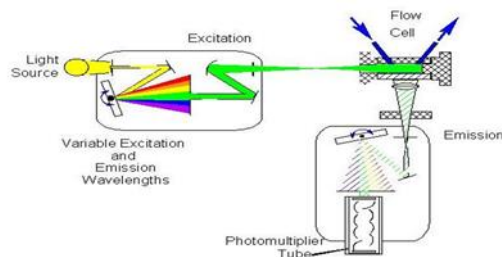


Otro aspecto importante en esta técnica es el pH; dada la inestabilidad del gel de sílice sustituido a pH alto y bajo, es importante controlar este parámetro. El rango óptimo de trabajo está comprendido en un pH entre 2 y 8; por debajo de pH=2, se produce la hidrólisis de los grupos funcionales introducidos sobre el silanol (hay un defecto en la retención, que será menor). Por encima de pH=8, el gel de sílice se disuelve y, por tanto, se pierde.<sup>7</sup>

La selección del detector va a depender de la naturaleza de los solutos. Éste recoge los cambios que sufre, a través de la columna, el efluente y los convierte en una señal eléctrica que es recogida en el sistema informático.<sup>7</sup> En los últimos 20 años, las técnicas más ampliamente utilizadas para la detección de vitamina K han sido: Detección por fluorescencia (FD), detección ultravioleta (UV), detección electroquímica (ECD) y espectrometría de masas (MS). La cuantificación directa puede realizarse mediante fluorescencia, después de una reducción antes de su paso por la columna; este método requiere un buen pretratamiento de muestras para minimizar las interferencias cromatográficas con componentes endógenos presentes en la matriz de la muestra.<sup>8</sup>



Esquema detector  
espectrómetro de masas.



Esquema detector de  
fluorescencia.

La derivatización es una estrategia que consiste en obtener un producto estructuralmente similar, pero con propiedades diferentes a las originales; esto se hace porque el analito original no puede ser analizado. La vitamina K sufrirá en el proceso de derivatización una reducción con Zinc o Platino hasta una forma química fluorescente.<sup>7,8</sup> El uso de la espectroscopía de masas ha aumentado significativamente debido a las mejoras que presenta en sensibilidad y especificidad, aunque aún presenta limitaciones como su coste o las posibles interferencias por efectos de matriz.<sup>8</sup>

### 3.5.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La vitamina K está presente en baja concentración con relación a otros componentes lipídicos. Por ello, la extracción mediante lípidos crudos no puede efectuarse para un análisis directo por HPLC. Además, debido a su inestabilidad en medio alcalino, la vitamina K no puede ser separada de los triglicéridos mediante una saponificación.<sup>9</sup>

La extracción y purificación, que depende del tipo de muestra es determinante para mejorar los resultados obtenidos en el análisis. Los objetivos del pretratamiento son eliminar componentes de la matriz que puedan interferir (o dañar el equipo) y extraer y concentrar el analito de interés. Las técnicas principales son: Precipitación de proteínas (PP), extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE); aunque también se utilizan la derivatización, sonicación o emulsificación.<sup>8,9</sup>

La precipitación de proteínas se lleva a cabo mediante la adición de solventes orgánicos (acetonitrilo, metanol o etanol), ciertos metales y ácidos concentrados. Esta técnica no es suficiente por sí misma y se suele combinar con otras como LLE o SPE para alcanzar la pureza adecuada. La extracción líquido-líquido es bastante adecuada para el analito en cuestión, debido a las propiedades lipofílicas de este; se usan solventes como hexano, ciclohexano, isooctano o cloroformo.<sup>8</sup> La separación en fase sólida es una técnica rápida y barata que permite eliminar compuestos endógenos para limitar el efecto de matriz y, además, concentrar el analito a analizar. Esta técnica ha sido utilizada mayormente en el análisis de muestras de orina y plasma, donde la mayoría de los componentes de las muestras se adsorben sobre un sorbente determinado por fuerzas electrostáticas, hidrofobicidad o por exclusión por tamaño.<sup>8,9</sup>

## **SUERO Y PLASMA**

Las muestras de plasma o suero necesitan una desproteínización antes de la extracción en fase líquida. El tratamiento a efectuar sobre este tipo de muestras es el siguiente: desproteínización con isopropanol; extracción de lípidos mediante hexano; extracción en fase sólida sobre gel de sílica; dilución con diisopropiléter en hexano.<sup>9</sup> Las muestras se pueden conservar hasta dos años a temperaturas de -70°C y protegidas de la luz.<sup>9</sup> La determinación se realiza sobre la vitamina K (K<sub>1</sub> y MK-n) y sus metabolitos<sup>1</sup>, detectado por espectrometría de masas y fluorescencia.

## **ORINA**

El método de elección para cuantificar menadionas en orina es la HPLC- en fase inversa.<sup>9</sup> El tratamiento que reciben estas muestras es una extracción en fase sólida para eliminar la mayor cantidad de componentes no deseados presentes en la muestra.<sup>9</sup> La determinación se realiza sobre los metabolitos de la vitamina K, principalmente las gliconas C5 y C7.<sup>1</sup>

## **ALIMENTOS**

Los tejidos necesitan una maceración mecánica (u homogeneización) para romper la integridad celular antes o durante la extracción en fase líquida. La digestión enzimática es aplicable en el proceso de homogeneización. Se añade diez veces el peso de la muestra en sulfato sódico anhidro y se procede a preparar alícuotas con isopropanol, hexano y agua (también el patrón), se agita por sonicación.<sup>9</sup>

## **4 OBJETIVOS**

El objetivo perseguido es realizar una revisión bibliográfica sobre las técnicas para la determinación de Vitamina K, centrándose en la HPLC y haciendo especial énfasis en los principales problemas que surgen de la manipulación, estabilidad o naturaleza de las muestras que dificultan el análisis y la correcta evaluación del estado nutricional del individuo y la ingesta recomendada; dada la importancia de esta vitamina sobre la coagulación y la formación del tejido óseo.

## **5 MÉTODOS**

La metodología a seguir ha consistido en una búsqueda exhaustiva de la información más relevante y actual. Los artículos y libros utilizados han sido seleccionados de bases de datos y bibliotecas de riguroso carácter científico, tales como: PubMed, Chroane, Scielo, PMC, Biblioteca Complutense etc. Toda la información consultada queda recogida en la bibliografía de este trabajo.

## 6 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El desarrollo y mejora de las técnicas para la cuantificación de la vitamina K están justificados por la relación de dicha vitamina con la salud ósea y la coagulación<sup>1,3</sup>, también se relaciona con la fibrosis quística y la enfermedad renal crónica. Se ha reportado el uso de suplementos de vitamina K como profiláctico en la prevención de la enfermedad hemorrágica neonatal, como recomendación de la WHO/FAO. No obstante, el origen de las muestras de interés será humano y animal, para evaluar por un lado el estado nutricional del individuo y, por otro, medir la ingesta. Los principales inconvenientes que encontramos en la determinación de la vitamina K son la baja concentración endógena y la interferencia con las matrices de las muestras, además de la dificultad en la preparación de estas.<sup>8,9</sup>

### 6.1 SUERO Y PLASMA

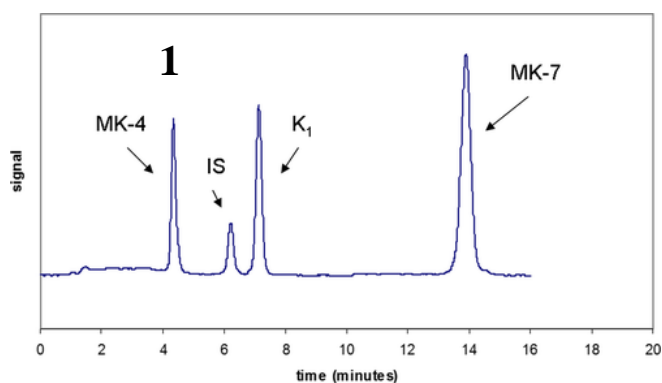
Estas muestras son de importancia clínica; las concentraciones en plasma de fitoquinonas tienen una variabilidad interindividual muy grande en comparación con otras vitaminas liposolubles; de ahí la necesidad de un buen método. La medida que mejor refleja la ingesta en las últimas 24h es la concentración en plasma.<sup>8,9</sup>

Los pacientes en tratamiento con cumarinas tendrán una mayor concentración endógena de la vitamina K epoxidada. Para minimizar la variabilidad asociada a la absorción postprandial de vitamina K, sólo se utilizarán muestras de plasma en ayunas o suero.<sup>9</sup>

Según la experiencia de E. Kaplova, J. Cepova, K. Dunovska y R. Prusa en 2017<sup>10</sup>, la lectura de HPLC para MK-4, MK-7 y K<sub>1</sub> en presencia de un patrón estándar (2-metil-1,4-naftoquinona, Immudiagnostik AG), y para muestras de suero, está representada en el espectro número 1. La técnica elegida para la detección fue la fluorescencia, el cromatógrafo utilizado fue un Agilent 1260 HPLC system (el tiempo total de separación fue 20 minutos).<sup>10</sup>

El detector de fluorescencia utilizado se ajustó a una longitud de onda de 246nm para la excitación y a 430nm de emisión.<sup>10</sup>

Los patrones utilizados fueron elaborados a partir de vitaminas concentradas certificadas ya comercializadas, en concreto: MK-4, MK-7 y K<sub>1</sub>. La preparación de los patrones se realizó diluyendo el concentrado con etanol hasta una concentración final de 200 ng/ml.<sup>10</sup>



Los estándares fueron preparados a partir de suero de donantes voluntarios, las alícuotas de suero fueron mezcladas con cantidades conocidas de K<sub>1</sub>, MK-4 y MK-7 (0,1; 0,3; 0,6; 1; 1,5; 2; 4; 8 y 15 ng/ml). Para la determinación, se usaron 0,5 ml de suero problema, al que añadieron 10µl de patrón interno (2-metil-1,4-naftoquinona, Immudiagnostik AG) y 2 ml de etanol. La mezcla fue agitada y centrifugada para luego volver a extraer la parte inferior del líquido. La fase orgánica se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El extracto lipídico se redisolvió en 2 ml de hexano y se llevó a cabo la SPE (la muestra se cargó sobre un gel de silicona Sep-pak y fue lavado con hexano). La fase orgánica de hexano que contenía la vitamina K fue diluida con dietiletiléter: hexano (3:97) para luego someterla a una corriente de nitrógeno. El residuo fue disuelto con 100µl de isopropanol y 50µl fueron inyectados en la columna.<sup>10</sup>

La columna funcionaba a 22°C, temperatura ambiente del laboratorio, y era una LiChroCART RP 18 para fase inversa, con reducción postcolumna con Zinc (zinc en polvo al 99,995%). La fase móvil utilizada se componía de: metanol 85%, 2-propanol 9%, acetonitrilo 5% y solución de metanol al 1% (10mM ZnCl<sub>2</sub>, 5mM acetato de sodio, 5mM ácido acético).<sup>10</sup>

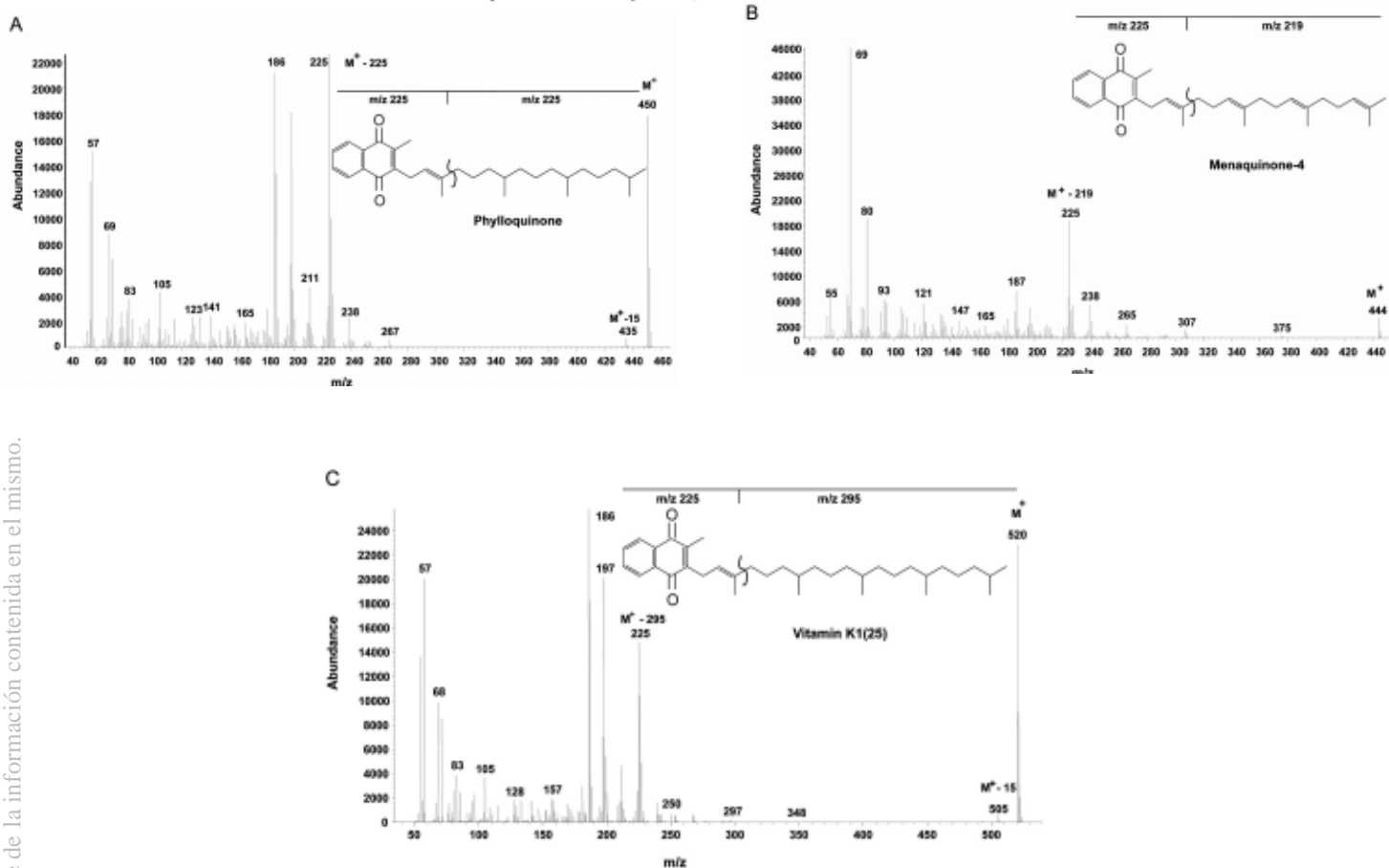
El ensayo fue lineal ( $r^2=0,9992$  para MK-4,  $r^2=0,9993$  para K<sub>1</sub> y  $r^2=0,9995$  para MK-7) para todo el conjunto de concentraciones. No se encontró interferencia alguna entre los componentes de los patrones y los analitos. Los coeficientes de variación intra e inter día fueron:<sup>10</sup>

Coeficiente de Variación (%)		
	Intradía	Interdía
MK-4	8,4	9,4-9,7
MK-7	9,5-6,9	9,9-9,6
K <sub>1</sub>	7,3-8,6	9,9-8,7

Los límites de cuantificación y tiempos de retención para MK-4, MK-7 y K<sub>1</sub> fueron los recogidos en la tabla. La cuantificación se basó en el cálculo del área bajo el pico en la lectura del equipo.<sup>10</sup>

Compuesto	Tiempo de retención	Límite de cuantificación
MK-4	4,2 min	0,04ng/ml
MK-7	14,1 min	0,03ng/ml
K <sub>1</sub>	7,00 min	0,03ng/ml

También se ha trabajado en otros ensayos<sup>8</sup> con un equipo conectado a un espectrómetro de masas (LC-MS) permite diferenciar y cuantificar perfectamente la vitamina K<sub>1</sub> y MK-4 en presencia de otros componentes biológicos presentes en la muestra.<sup>11</sup>



(A) Espectro de filoquinonas, (B) Espectro de menaquinona, (C) Espectro vitamina K<sub>1</sub>.

La determinación de los niveles de vitamina K es difícil debido a la baja concentración circulando en plasma y a los componentes que puedan interferir, especialmente triglicéridos.<sup>10</sup>

## 6.2 ORINA

Las muestras de orina presentan varios aspectos positivos: es un proceso no invasivo, hay suficiente volumen de muestra y el proceso de recolección es sencillo; aunque la dificultad se haya en la alta concentración de componentes que potencialmente pueden interferir (incluyendo compuestos neutros, ácidos, básicos y anfóteros). El análisis de orina es un reflejo del proceso in vivo, se analiza tanto la vitamina como sus metabolitos.<sup>9</sup>

La eliminación completa de los metabolitos polares se estima que alcanza los tres días, la glicona 5C- es el que se encuentra en mayor concentración entre estos, seguido de la glicona 7C-.<sup>1</sup>

En el ensayo de Matthew G. McDonald et al. en 2019<sup>12</sup> se utilizó un equipo en tándem LC-MS, detección por espectroscopía de masas. El equipo era un tándem Waters Xevo TQ-S Quadrupole Mass Spectrometer conectado a un ACQUITY Ultra Performance LC, con una fase estacionaria UPLC C-18. Las transiciones para los compuestos a analizar fueron m/z 240 > 185

para MK1, el patrón estándar;  $m/z$  312 > 195 para la glicona C-7; y  $m/z$  284 > 195 para la glicona C-5.<sup>12</sup>

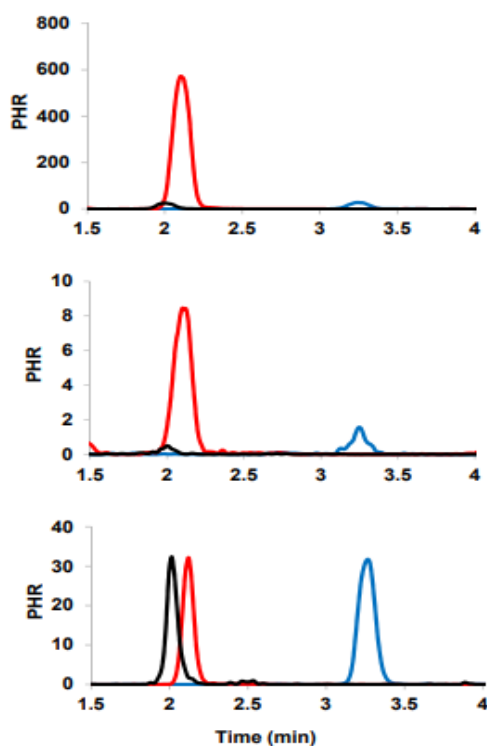
El estudio llevado a cabo se basaba en la suplementación de seis individuos voluntarios que consumían 25 mg de MK4, 5 mg K<sub>1</sub>, y 0.5 mg de MK7 por día. El pretratamiento de la muestra consistió en la adición del patrón interno MK-1 (sintetizado en el propio laboratorio), extracción en fase sólida (en una columna C18) e hidrólisis con HCl, con una agitación durante 12h en oscuridad, sobre 2,5 ml de orina. Los analitos fueron luego de esto extraídos mediante diclorometano y sometidos a corriente de nitrógeno, el residuo seco se disolvió en 100µl de alcohol isopropílico para el análisis.<sup>12</sup>

Las curvas de calibración se efectuaron mediante el método de dilución estándar, 2,5 ml de la orina fueron mezclados con cantidades variables de los catabolitos y del patrón. Se inyectó 5µl de cada muestra en el equipo.<sup>12</sup>

La cuantificación se basó en la lectura de los picos del cromatograma, relativos al patrón MK-1 de concentración conocida. Con el fin de minimizar la variabilidad interindividual se hallaron las concentraciones de creatinina y, así, normalizar las concentraciones de catabolitos.<sup>12</sup>

Los límites de cuantificación para los catabolitos son de 10 y 50 fmol por ml de orina para las gliconas C5 y C7, respectivamente. La técnica resultó ser altamente sensible.<sup>12</sup>

El principal inconveniente de este método es que, al medir los productos del catabolismo, de algún modo, se valora un biomarcador no específico para cada uno de los analitos; los productos del catabolismo son comunes para las rutas que siguen MK-4, K<sub>1</sub> y MK-7.<sup>12</sup>



COEFICIENTE DE VARIACIÓN %		
	INTRADÍA	INTERDÍA
C5	6,4	7,4
C7	8,4	11
MK-1	16,2	12

ROJO: glicona C5

AZUL: glicona C7

NEGRO: patrón MK-1

Cromatograma para los catabolitos en presencia de un patrón.

El único método validado para la determinación de los catabolitos es el descrito por Harrington et al. en 2005<sup>13</sup>, con detección electroquímica.

### 6.3 SUPLEMENTOS

El método descrito en la Real Farmacopea Española para su valoración es cromatografía de líquidos. 15,0 mg de la muestra problema se disuelven y diluyen hasta 10,0 ml con la fase móvil. El espectrofotómetro se debe ajustarse a 254 nm, el método de detección es fluorescencia. Es importante inhibir la digestión enzimática antes de la inyección de la muestra.

### 6.4 ALIMENTOS

Según el ensayo de H. E. Indyk et al. 1997<sup>14</sup>, para la determinación de vitamina K en fórmulas infantiles y leche fluida, el tratamiento de muestra seguido fue<sup>14</sup>:

- 1g de fórmula infantil o 10g de leche fluida fueron llevados a un tubo de ensayo. La fórmula infantil se disolvió en 15 ml de agua, la leche fluida se diluyó hasta 15ml.
- Se añadieron: solución tampón (5ml, 0,2M, Fosfato, para asegurar la digestión enzimática) y lipasa, fue agitado durante 7 minutos. Se incubó a 37°C durante 120 minutos.
- La solución fue atemperada y se añadieron 10ml de etanol y 1g de carbonato potásico.
- Se añadieron 30 ml de hexano para la extracción líquido-líquido y se evaporó por corriente de nitrógeno (se conservó la solución de hexano que contenía la vitamina K).
- El residuo seco fue disuelto en 1 ml de metanol y fue filtrado.

La técnica para la determinación fue HPLC-fase inversa con una columna C18 y detección por fluorescencia; previa reducción postcolumna. La fase móvil se compone de metanol, diclorometano, acetato anhidro de sodio, cloruro de zinc y ácido acético.<sup>14</sup>

El límite de cuantificación es de 0-0,5µg/100g, con un CV para K<sub>1</sub> y MK-4 de 2,35% y 2,32% respectivamente. El patrón estándar utilizado fue la 2',3'-dihidroquinona. El método es lineal, con un coeficiente de correlación de:  $r^2=0,9932$ .<sup>14</sup>

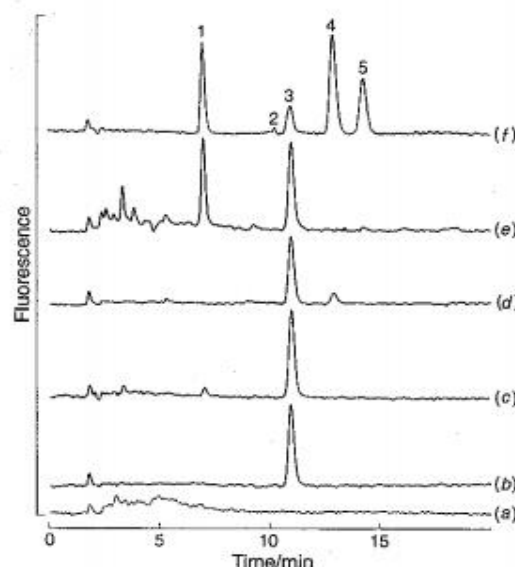


Fig. 1 Analytical chromatography of sample extracts: (a) skim milk; (b), (c) and (d) infant formulas; and (e) bovine milk, compared with (f) authentic standards. Conditions as described in text. 1, MK4; 2, MK5; 3, K<sub>1</sub>; 4, 2',3'-dihydrophyloquinone; and 5, MK6.



## 6.5 OTROS BIOMARCADORES

El desarrollo de un método fiable pasa por mejorar las técnicas ya usadas (HPLC) o la búsqueda de otras estrategias:

El ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) se sintetiza post-transducción a partir de residuos de ácido peptidil glutámico presentes en las proteínas dependientes de vitamina K; por tanto, no hay necesidad de reciclar el aminoácido, que es excretado por orina. La determinación de Gla se realiza mediante HPLC en fase inversa con derivatización pre o postcolumna y es detectada por fluorescencia. El Gla medido corresponde a dos fuentes: alrededor de un 60% viene de los factores de coagulación dependientes de vitamina K y el resto de proteínas dependientes no involucradas en la hemostasis. No obstante, la medida del Gla excretado en 24h ofrece información sobre la respuesta de proteínas hepáticas y extrahepáticas ante las alteraciones en el estado nutricional.<sup>1,9</sup>

La osteocalcina (bone Gla protein [BGP]) es producida por los osteoblastos en el hueso. Ésta contiene tres residuos de Gla que le confieren propiedades para unir calcio. Una pequeña fracción de la osteocalcina sintetizada es liberada a la circulación, donde puede ser medida como un marcador de la formación ósea. La determinación se lleva a cabo por inmunoensayos.<sup>1,9</sup>

También se han descrito inmunoensayos para la determinación de PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonism), relacionado con la protrombina (factor II). Una menor cantidad de vitamina K conlleva una mayor cantidad de PIVKA-II. Este marcador no posee la sensibilidad suficiente, la PIVKA-II sólo supone el 0,002% de la protrombina total en adultos sanos. Ha sido usado con éxito para medir el estado nutricional en madres y niños, tomando muestras del cordón umbilical.<sup>1,9,11</sup>

## 7 CONCLUSIONES

La vitamina K es un nutriente esencial relacionado con la síntesis de los factores de coagulación (II, VII, IX y X) y el metabolismo óseo. El principal método para su determinación es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase inversa; en función del origen de la muestra se lleva a cabo un pretratamiento diferente dirigido a minimizar las interferencias con la matriz. Entre los diferentes métodos de detección encontramos la fluorescencia, la espectroscopía de masas, la detección electroquímica o la luz ultravioleta; la elección de uno u otro depende del origen de la muestra, que determina la concentración de fitoquinonas y menadionas o de sus metabolitos.

Así pues, en orina sólo se encuentran sus metabolitos; siendo el más probable el metabolito 5C. En sangre, se hayan las dos formas: metabolitos y vitamina. La forma más habitual de menadiona en humanos es la MK-4. Las limitaciones del método se centran en el pretratamiento (se pierde analito en el proceso) y la variabilidad de formas de la vitamina K.

La importancia del desarrollo de una técnica válida para la determinación de vitamina K está justificada por su relación con funciones fisiológicas y fisiopatológicas; y, también, para

confeccionar tablas actualizadas de composición de alimentos y estimar la ingesta recomendada (no existen recomendaciones para menadonas que indiquen su deficiencia o exceso). El desarrollo de un método estandarizado

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Turck, D, Bresson, J-L, Burlingame, B, Dean, T, Fairweather-Tait, S, Heinonen, M, Hirsch-Ernst, KI, Mangelsdorf, I, McArdle, HJ, Naska, A, Nowicka, G, Pentieva, K, Sanz, Y, Siani, A, Sjödin, A, Stern, M, Tomé, D, Van Loveren, H, Vinceti, M, Willatts, P, Lamberg-Allardt, C, Przyrembel, H, Tetens, I, Dumas, C, Fabiani, L, Ioannidou, S and Neuhäuser-Berthold, M, 2017. Scientific Opinion on the dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal* 2017; 15(5):4780, 78 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4780>
2. Fusaro, M., Gallieni, M., Rizzo, M., et al. (2016). Vitamin K plasma levels determination in human health. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(6), pp. 789-799. from doi:10.1515/cclm-2016-0783
3. Martin J. Shearer, P. Barkhan. Metabolism of Vitamin K1 (Phylloquinone) in Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 70, 2: pp. 93-96., First Published Feb 1, 1977.
4. Shearer M., Fu X., Booth S. , Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research, *Advances in Nutrition*, Volume 3, Issue 2, March 2012, Pages 182–195, <https://doi.org/10.3945/an.111.001800>
5. Andrea Weston, Phyllis R. Brown, *HPLC and CE: Principles and Practice*. Academic Press, 1997. ISBN 9780121366407, <https://doi.org/10.1016/B978-012136640-7/50001-5>.
6. Ackley K. , Caruso J. , García Alonso J. , Ruiz Encinar J. , Michalke B. , Chéry C., Chapter 4: Separation Techniques En: Rita Cornelis, Joe Caruso, Helen Crews, Klaus Heumann. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*. 2003 John Wiley & Sons, Ltd. (Pages: 147-239)
7. Y. Kazakevich, R. LoBrutto. Chapter 4: Reversed-Phase HPLC En: Yuri Kazakevich, Rosario LoBrutto. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. 2007 John Wiley & Sons, Inc. (Pages: 139-239).
8. Zhang Y, Bala V, Mao Z, Chhonker YS, Murry DJ. A concise review of quantification methods for determination of vitamin K in various biological matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019 May 30;169:133-141. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.006>
9. Song, Won O., Gary R. Beecher, and Ronald R. Eitenmiller. *Modern analytical methodologies in fat- and water- soluble vitamins*. New York: Wiley, 2000.
10. Klapkova, E, Cepova, J, Dunovska, K, Prusa, R. Determination of vitamins K<sub>1</sub>, MK-4, and MK-7 in human serum of postmenopausal women by HPLC with fluorescence detection. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32:e22381. <https://doi.org/10.1002/jcla.22381>
11. Marinova M. , Lütjohann D. , Westhofen P. , Watzka M., Breuer O., Oldenburg J. A Validated HPLC Method for the Determination of Vitamin K in Human Serum – First Application in a Pharmacological Study. *The Open Clinical Chemistry Journal*, 2011, 4: 17-27.

12. McDonald MG, Yeung CK, Teitelbaum AM, Johnson AL, Fujii S, Kagechika H, Rettie AE: A new LCMS assay for the quantitative analysis of vitamin K metabolites in human urine. [J Lipid Res](#). 2019 Apr;60(4):892-899. doi: 10.1194/jlr.D087916
13. Harrington DJ, Soper R, Edwards C, Savidge GF, Hodges SJ, Shearer MJ: Determination of the urinary aglycone metabolites of vitamin K by HPLC with redox-mode electrochemical detection.. [J Lipid Res](#). 2005 May;46(5):1053-60
14. Indyk HE, Woollard. Vitamin K in milk and infant formulas: determination and distribution of phylloquinone and menaquinone-4. [DC. Analyst](#). 1997 May;122(5):465-9.