



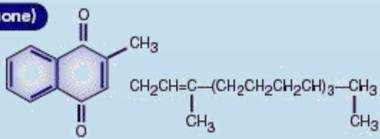
MÉTODOS ANALÍTICOS EXISTENTES PARA DETERMINAR EL ESTADO NUTRICIONAL DE VITAMINA K EN LA POBLACIÓN

Autora: Cristina Velasco Hernández; cvelas02@ucm.es **Tutora:** Elena Rodríguez Rodríguez elerodri@far.ucm.es
Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, España

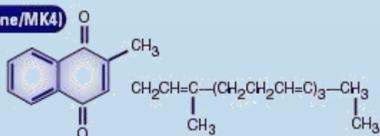
INTRODUCCIÓN

La vitamina K liposoluble agrupa a filoquinona (K1) presente en vegetales de hoja verde, menaquinona (K2) de origen animal y bacteriano, y menadiona (K3) de origen sintético. El mecanismo de acción es similar para todas las formas, pero hay diferencias en absorción, transporte, distribución y biodisponibilidad. Sus funciones son participar en la coagulación sanguínea y metabolismo óseo. Su déficit puede ocasionar alteraciones hemorrágicas, osteoporosis y aterosclerosis. Existen métodos analíticos directos e indirectos (ver esquema) para poder determinar la concentración de vitamina K en la población. Los directos son los más informativos, pero presentan diferentes limitaciones e interferencias.

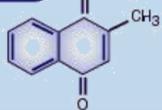
K₁ (Phylloquinone)



K₂ (Menatetrenone/MK4)



K₃ (Menadione)



OBJETIVO

Revisar los métodos analíticos directos existentes para la determinación de vitamina K en la población.

METODOLOGÍA



Revisión bibliográfica en ScienceDirect, PubMed, Google-académico, biblioteca on-line de la UCM.

Palabras claves: Vitamin K, determination of vitamin K, characteristics of vitamin K.

Artículos: 1991 611 769

De los 3371 artículos encontrados, se seleccionaron 26 para la memoria y 5 para el póster (al contener los datos más relevantes y figuras necesarias para realizar el trabajo).

Métodos de determinación

Indirectos

Directos

Tiempo de protrombina

HPLC-UV-Vis

Osteocalcina o proteína Gla de la matriz

HPLC-Fluorescencia

Descarboxi-protrombina

HPLC-EC

7C-aglicona y 5C-aglicona

HPLC-APCI-MS/MS

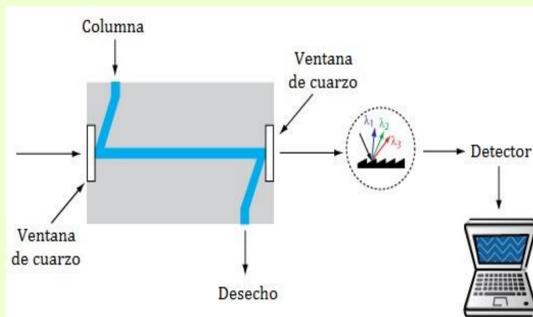
1

HPLC con detector UV-Vis

Es un método de cromatografía líquida en fase inversa que se basa en la capacidad de esta vitamina en absorber radiación ultravioleta (248nm, a la cual se realiza la detección).

Este método de determinación es fácil de usar, rápido y los datos obtenidos son similares a los reales.

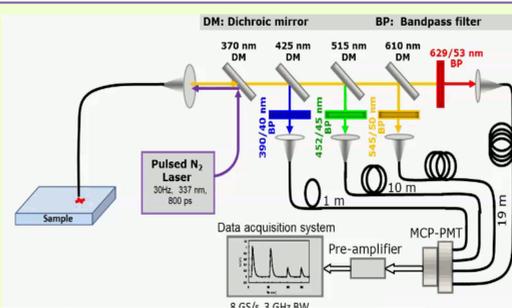
Sin embargo, su baja sensibilidad y selectividad implica que se recomienden hacer determinaciones adicionales.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2

HPLC con detector FL



Mediante el uso de una longitud de onda de 240nm para K1 y MK-7 y 320nm para MK-4, los átomos del analito son excitados y emiten una señal de luz (fluorescencia). Es un sistema fácil de manejar y relativamente estable. Requiere purificación exhaustiva de la muestra para reducir interferencias inducidas por los lípidos.

Tiene una alta selectividad, sensibilidad y precisión, y se considera un método adecuado para determinar la vitamina K.

	HPLC-UV-Vis (248nm)	HPLC-FL	HPLC-EC	HPLC-APCI-MS/MS
Tiempo análisis	Rápido	Rápido	Lento	Lento
Sensibilidad	Baja	Alta	Alta	Muy alta
Límite de detección	0,1 – 1ng	0,001 – 0.01ng	0,01 – 1ng	0,04 – 1,4ng
Precisión (CV%)	2,2 – 5,6%	K1=4,86-9,64% MK-4=5,73-9,21% MK-7=6,32-19,31%	8.9%	K1 y MK-4 = <10% MK-7 = <12%
Recuperación	88% ± 3.6	92 - 105%	86 - 91%	92 - 103%
Temperatura de trabajo	18 - 20°C	35°C	20°C	Automuestrador=15°C Columna=50°C Sonda=400°C
Eliminación interferencias	No	Sí	Sí	No
Gradiente	Sí	Sí	No	Sí
Selectividad	Baja	Alta	Alta	Muy alta
Índice de flujo	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min

3

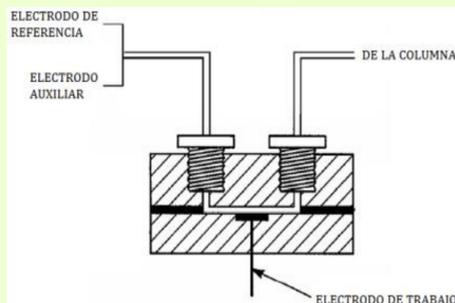
HPLC con detector EC

Mide la corriente que pasa del electrodo de trabajo a un electrodo auxiliar en función del tiempo.

Se realiza con una bomba recíproca de flujo constante y un **amperométrico** (mide la corriente generada cuando la quinona de la vitamina K se reduce a su hidroquinona correspondiente).

Es un método capaz de reducir la mala resolución producida por el colesterol y triglicéridos del paciente.

Tiene una alta sensibilidad y precisión.

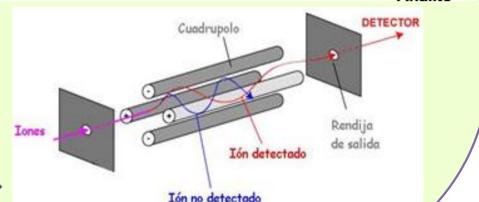


Se fundamenta en la separación de núcleos atómicos en función de la relación entre masa y carga (m/z). Generalmente se ioniza la muestra mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) y como analizador de masas el triple **cuadrupolo** (MS/MS).

Método simple, rápido, sensible y selectivo, mayor rendimiento y evita métodos de pre purificación intensos.

4

HPLC-APCI-MS/MS



MISIÓN CUMPLIDA

CONCLUSIÓN

Después de comprobar varios métodos analíticos de determinación de vitamina K y sus análogos, se ha determinado que aunque el más rápido, sensible, preciso y selectivo es el método **HPLC-APCI-MS/MS**, en los laboratorios el más usado actualmente es el **HPLC con detector de fluorescencia**, ya que es más económico y el proceso de pre purificación de la muestra es más rápido.

BIBLIOGRAFÍA

- María Furaso, Maurizio Gallieni, Maria Antonietta Rizzo, Andrea Stucchini, Pierre Delanaye, Erienne Cavalier, et al. Vitamin K plasma levels determination in human health. Clin Chem Lab Med. 2017; 56(6): 789-799.
- Semih Otles, Ozlem Cagindi. Determination of Vitamin K1 content in olive oil, chard and human plasma by RP.HPLC method with UV-Vis detection. Food Chemistry. 2007; 100: 1220-1222.
- Sameh Ahmed, Ashraf M. Mahmoud. A novel salthing-out assisted extraction coupled with HPLC-fluorescence detection for trace determination of vitamin K homologues in human plasma. Talante. 2015; 144: 480-487.
- JeeEun Yang, Jang-Hee Yoon, Mi-Sook Won, Yoo-Bo Shim. Electrochemical and Spectro electrochemical Behaviour of Vitamin K1/Lipid Modified Electrodes and the Formation of Radical Anion in Aqueous Media. Bull Korean Chem Soc. 2010; 31(11): 3133-3138.
- Alessandra Gentili, Alfredo Miccheli, Pierpaolo Tomai, Maria Elisabetta Baldassare, Roberta Curini, Virginia Pérez-Fernández. Liquid Chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of vitamin K homologues in human milk after overnight cold saponification. Journal of Food Composition and Analysis. 2016; 47: 21-30.