



Determinación de vitamina K por HPLC.

Luis Botica Moros
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

OBJETIVOS

Método de determinación de vitamina k en sus formas activas y sus metabolitos.

INTRODUCCIÓN

NATURALEZA DE LA VITAMINA K

Vitamin K

Vitamin K₁ (phylloquinone)

Menaquinone-4 (vitamin K₂)

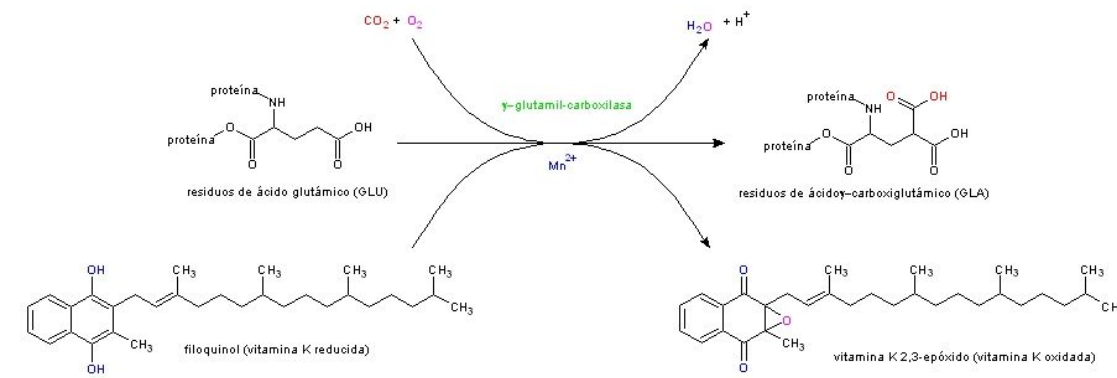
Menaquinone-7 (vitamin K₂)

- La vitamina K es una vitamina liposoluble.
- Está presente en dos formas: **Fitoquinonas (K1)** y **menadionas (MK-n)**.

IMPORTANCIA DE LA VITAMINA K

COAGULACIÓN

- Activa a los factores de coagulación II, VII, IX y X (protrombina, proconvertina, Christmas y Stuart Prower, respectivamente).
- Participa en la carboxilación del ácido glutámico (Glu), que pasa a γ -carboxiglutamato (Gla).



METABOLISMO ÓSEO

- Carboxilación de Glu a nivel extrahepático.
- Osteocalcina, BGP (Bone Gla-Protein) y MGP (Matrix Gla-Protein), proteínas dependientes de vitamina K.
- relacionadas con la mineralización del hueso y la inhibición de la calcificación vascular

FUENTES DE VITAMINA K

FITOQUINONAS

- En todas las plantas fotosintéticas, especialmente en:
 - Vegetales de hoja verde (espinacas, lechuga y demás vegetales para ensalada) → 60–365 $\mu\text{g}/100\text{g}$
 - Género Brassica (en flores y hojas) → 80–585 $\mu\text{g}/100\text{g}$

MENADIONAS

- Especialmente en productos de origen animal y fermentados.
 - MK-4 en productos cárnicos y a base de hígado. 0.1–42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 0.3–369 $\mu\text{g}/100\text{g}$
 - MK-7 en el fermento de soja. 850 μg –1,000 $\mu\text{g}/100\text{g}$

INGESTA RECOMENDADA

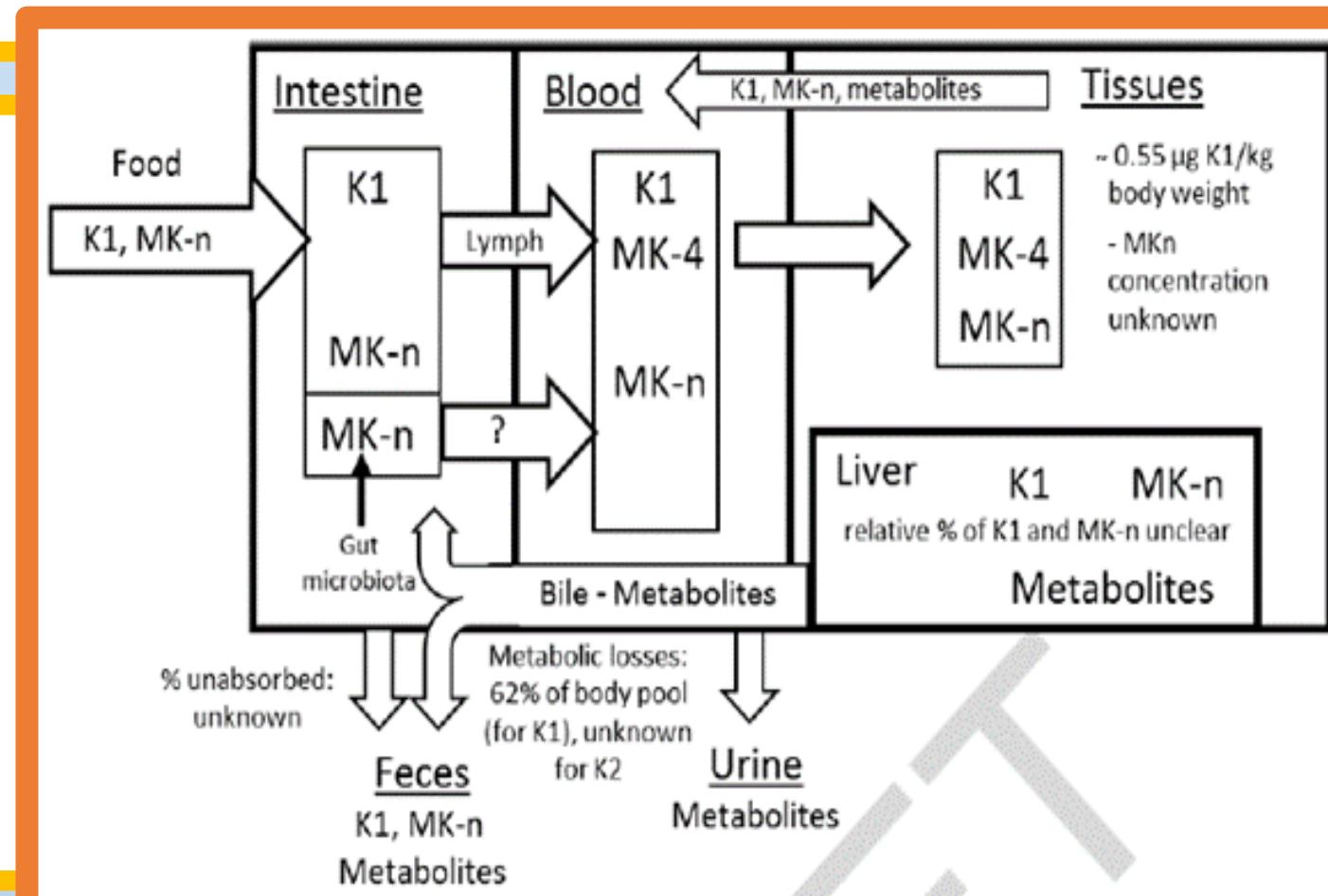
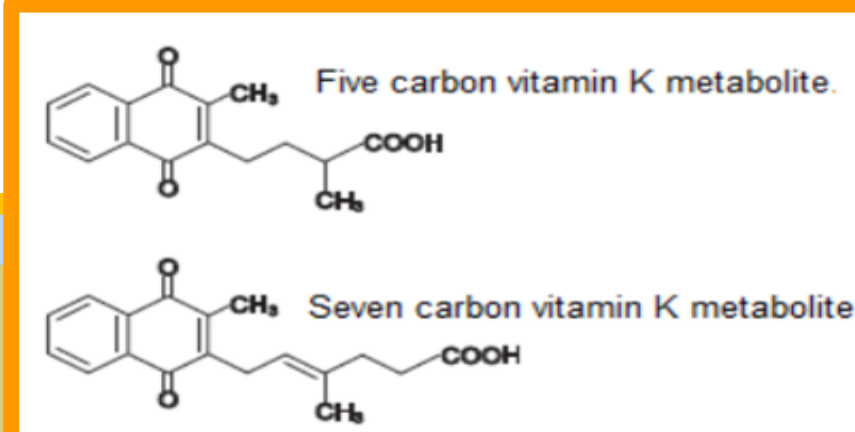
(a) $\mu\text{g}/\text{día}$	WHO/FAO(a)	AFSSA(a)	D-A-CH(a)	
Edad	19-265	19-74	≥75	19-50 51-265
Sexo				
Hombre	65	120	70	70 80
Mujer	55	90	70	60 65

- Para lactantes entre 7 y 12 meses, IR: 10 $\mu\text{g}/\text{día}$.
- Para niños entre 10 y 18 años, IR: 35-55 $\mu\text{g}/\text{día}$.

*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.

METABOLISMO

- Transporte en quilomicrones tras la ingesta (naturaleza lipídica).
- Transporte en LDL: llegada a tejido óseo
- γ -glutamil carboxilasa (GGCX) y vitamina K epóxido reductasa (VKOR).
- Metabolismo hepático.
- Dos metabolitos principales; no glucídicos y con sustituyentes de una longitud de 5 y 7 carbonos.
- El origen de la muestra determina la forma de vitamina K predominante:
 - Orina: catabolitos exclusivamente.
 - Sangre: vitamina y catabolitos.



DETERMINACIÓN

SUERO, PLASMA

“La medida que mejor refleja la ingesta en las últimas 24h”

Ensayo de E. Kaplova et al. 2017

INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

- HPLC- FASE INVERSA
- COLUMNA: LiChroCART RP 18.
- Reducción postcolumna con Zinc (zinc en polvo al 99,995%).
- FASE MÓVIL: METANOL 85% + 2-PROPANOL 9% + ACETONITRILLO 5% + SOLUCIÓN DE METANOL 1%.

DETECCIÓN

- 10mM ZnCl₂, 5mM acetato de sodio, 5mM ácido acético
- FLUORESCENCIA (240nm excitación, 450nm emisión).
- DILUCIÓN ESTÁNDAR, PATRONES PARA MK-4, MK-7 y K₁ [0,1; 0,3; 0,6; 1; 1,5; 2; 4; 8 y 15 ng/ml]

RECTA DE CALIBRACIÓN

- LINEAL ($r^2=0,9992$ para MK-4, $r^2=0,9993$ para K₁ y $r^2=0,9995$ para MK-7).
- No interferencias.

ORINA (CATABOLITOS)

“Proceso no invasivo, hay suficiente volumen de muestra y el proceso de recolección es sencillo.”

Ensayo de M. G. McDonald et al. en 2019

EQUIPO

- Fase estacionaria: UPLC C18
- Equipo en tándem LC-MS
- Límites de cuantificación para los catabolitos 10 – 50 fmol por ml de orina. ALTAMENTE SENSIBLE Y REPRODUCIBLE.

MUESTRAS

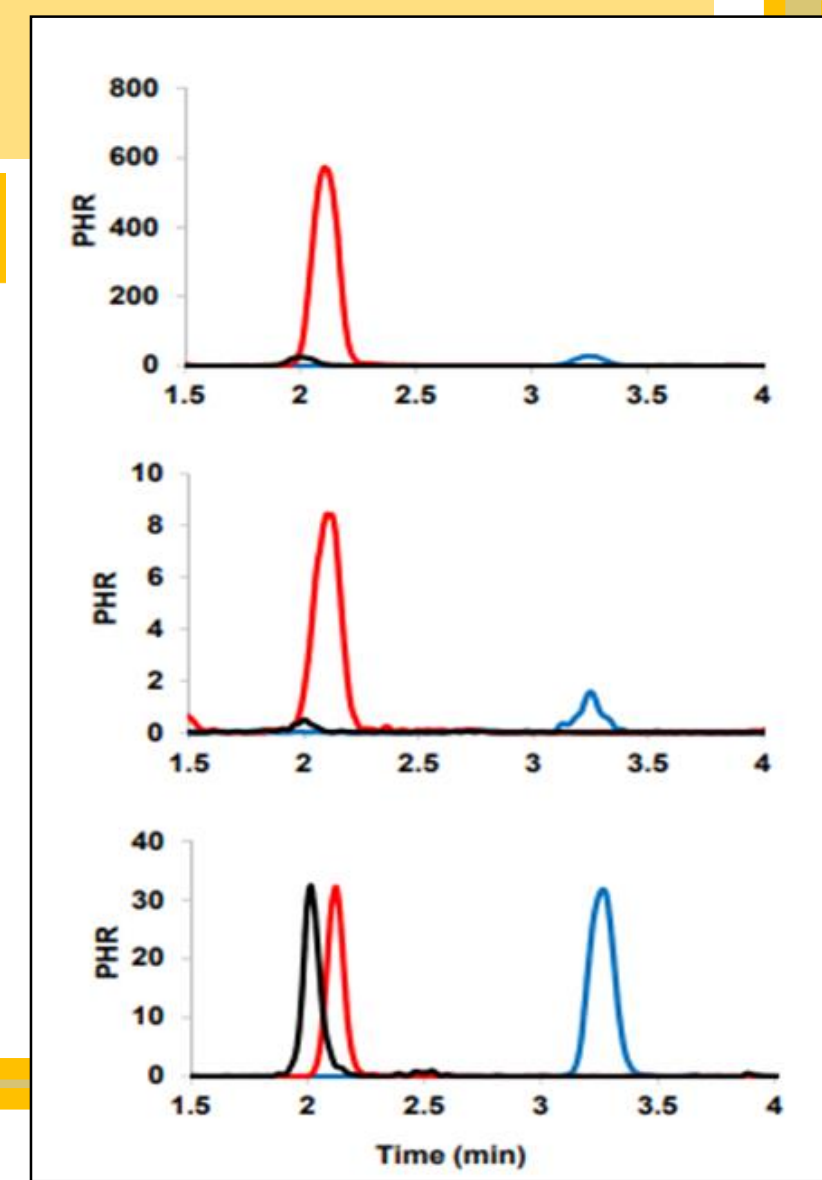
- Suplementación en pacientes (consumían 25 mg de MK4, 5 mg K₁, y 0.5 mg de MK7 por día).
- Patrón interno: K1 sintetizada en el propio laboratorio.

DETECCIÓN

- Detección por espectroscopía de masas.
- Cuantificación basada en el pico del cromatograma.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Patrón interno (MK-1) + 2,5 ml orina.
- SPE en gel Sep-pak.
- Hidrólisis con HCl.
- Agitación 12 h en oscuridad.
- Extracción con diclorometano y corriente de nitrógeno.
- Disolución del extracto seco en 100 μl de alcohol isopropílico



OTROS BIOMARCADORES

- Ácido γ -carboxiglutámico (Gla).
 - La determinación de Gla se realiza mediante HPLC-reversa
 - Derivatización pre o postcolumna.
 - Detectada por fluorescencia.
 - 60% factores de coagulación dependientes de vitamina K // 40% proteínas dependientes no involucradas en la hemostasis
- Osteocalcina (bone Gla protein [BGP]).
 - 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 inmuno-ensayos
- PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonism)
 - Relacionado con la protrombina (factor II).
 - No posee la sensibilidad suficiente (la PIVKA-II sólo supone el 0,002% de la protrombina total en adultos sanos).
 - Muestras del cordón umbilical, determinación por inmunoensayos.

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.
- Falta de un método validado, estandarizado y universal. **Salvar los obstáculos.**
- Actualizar tablas de composición de alimentos.
- Estimar la ingesta recomendada.

BIBLIOGRAFÍA

- 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, Lambert-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>
- Indyk HE, Woollard Vitamin K in milk and infant formulas: determination and distribution of phylloquinone and menaquinone-4. Analyst. 1997 May;122(5):465-9.
- McDonald MG, Yeung CK, Teitelbaum AM, Johnson AL, Fujii S, Kagechika H, Retti 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
- 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

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

10 μL PATRÓN + 0,5 ml SUERO + 2 ml ETANOL
AGITACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN

EXTRACCIÓN CON METANOL

SPE EN GEL Sep-pak Y LAVADO CON HEXANO

- La fase orgánica de hexano que contenía la vitamina K fue diluida con dietililéter: hexano (3:97) y sometida a corriente de nitrógeno.
- El extracto fue redisoluelto con 100 μl de isopropanol; 50 μl fueron inyectados en la columna.

ALIMENTOS

LECHE Y FÓRMULAS INFANTILES

- TÉCNICA: HPLC Fase inversa, reducción postcolumna y detección por fluorescencia
- MATERIALES:
 - Fase estacionaria C18.
 - Fase móvil: de metanol, diclorometano, acetato anhidro de sodio, cloruro de zinc y ácido acético
- La recta de calibrado es lineal, con una $r^2=0,9932$.
- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:
 - Llevar la muestra a 15ml de volumen (agua) para digestión enzimática (lipasa).
 - Extracción con hexano.
 - Redisolución en 1 ml de metanol y filtrado.

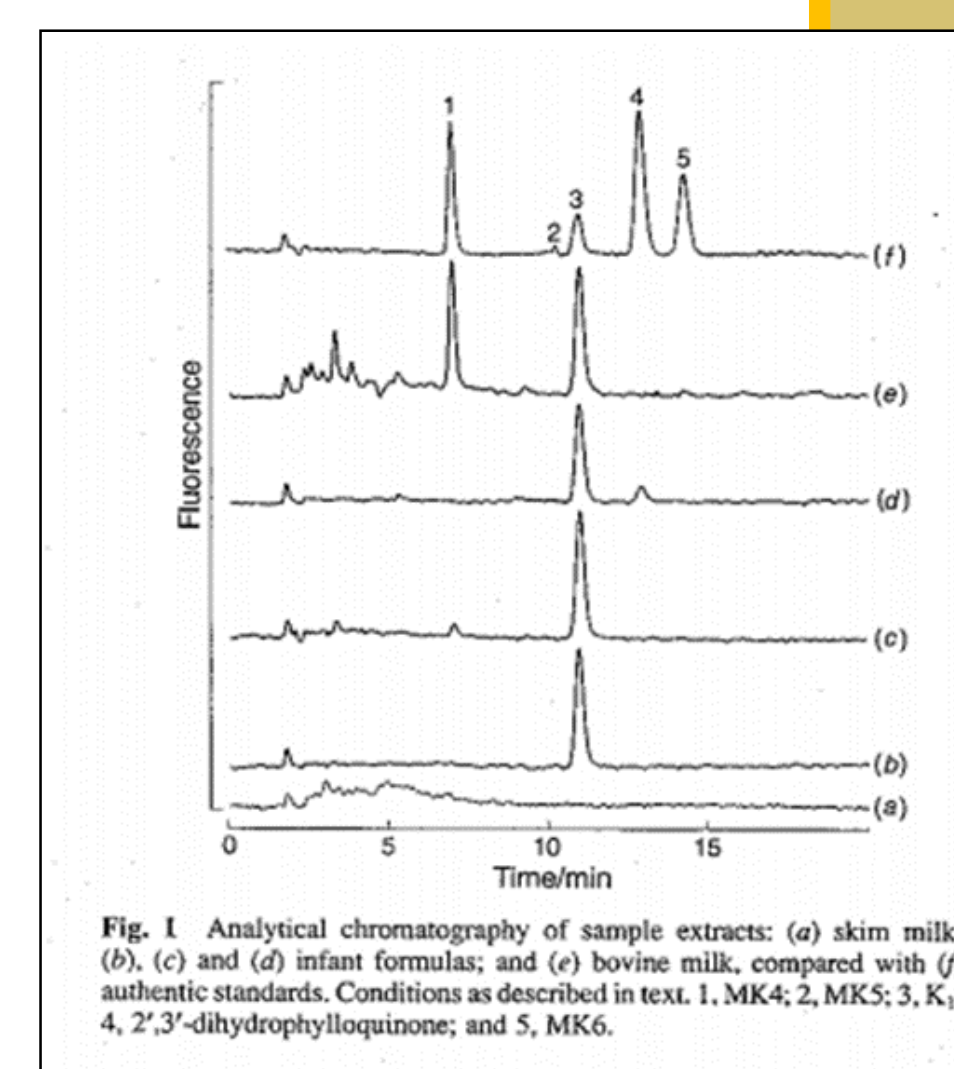


Fig. 1 Analytical chromatography of sample extracts: (a) skim milk; (b), (c) and (d) infant formulas; and (e) bovine milk, compared with (f) authentic standards. Conditions as described in text. 1, MK4; 2, MK5; 3, K₁; 4, 2',3'-dihydrophylloquinone; and 5, MK6.