

Utilización de una fase micelar para la inyección directa de muestras de plasma humano en la determinación de vitaminas K₁ y menaquinona-4 por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por fluorescencia

María del Rosario Brunetto^{1}, Libia Yaritza Contreras Méndez¹,
Dina Saraí Torres Izarra¹, Máximo Gallignani¹, Yelitza Delgado Cayama¹, María
Antonieta Obando¹, Oscar Marino Alarcón¹, Edgar Nieto² y Rafael Salinas²*

*¹Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química,
Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Apartado Postal 3, Ipostel La Hechicera
Mérida, 5101-A, Venezuela. ²Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina,
Grupo de Investigación de Metabolismo Óseo (GIMO)*

Recibido: 30-11-06 Aceptado: 14-06-07

Resumen

En el presente trabajo se empleó una precolumna LiChrospher RP-18 ADS (alquil diol sílica) inserta en un sistema de columnas acopladas bajo la modalidad de transferencia indirecta reversa como etapa de tratamiento en línea para la determinación de vitaminas K₁ y MK-4 por CLAR con detección por fluorescencia. Las muestras de plasma humano se inyectaban directamente en la precolumna con una fase de extracción constituida por 2-propanol/acetoneitrilo 200 mM dodecilsulfato de sodio en buffer fosfato 10mM pH= 7,4 (20:25:55, v:v:v). La separación se realizó en una columna Novapack C₁₈ (150 mm x 3,9 mm d.i. y 4 µm d.p.) utilizando como fase móvil A: agua/acetoneitrilo (80:20, v/v) y como fase móvil B: metanol/acetoneitrilo (65:35, v/v) en régimen de gradiente de elución a un flujo de 0,8 mL/min. Las vitaminas K₁ y MK-4 se redujeron en línea en una columna de zinc metálico y el producto se detectó por fluorescencia. La validación del método indicó linealidad entre 0,2 – 1,6 ng/mL, con un límite de cuantificación de 0,2 ng/mL para ambas vitaminas. La recuperación para todos los casos estuvo comprendida entre 90,5 y 112,0% con un C.V. <3,8%. Finalmente, el método propuesto se utilizó para analizar muestras de plasma de individuos sanos con una frecuencia de análisis de 4 muestras/hora.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta resolución; cromatografía micelar; precolumna ADS; sistemas de columnas acopladas; vitaminas K.

* Autor para la correspondencia. E-mail: brunetto@ula.ve

High performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of vitamins K₁ and MK-4 with direct injection of plasma using a micellar mobile phase

Abstract

In this work, a precolumn LiChrospher RP-18 ADS (alkyl-diol silica) was used inserts in a switching-column system in the backflush mode, as an on-line treatment step for the determination of vitamins K₁ and MK-4 by HPLC with fluorescence detection. The human plasma samples were directly injected in the precolumn with an extraction mobile phase constituted by a solution 2-propanol/ acetonitrile/200 mM dodecylsulfate of sodium in buffer phosphate 10 mM pH= 7.4 (20:25:55, v/v). The separation was realized in a Novapack C₁₈ column (150 mm x 3.9 d.i and 4 mm μ m d.p.) using a mobile phase A: water/acetonitrile (80:20, v/v) and a mobile phase B: methanol/acetonitrile (65:35, v/v) in gradient elution mode at a flow-rate of 0.8 mL min⁻¹. The vitamins K₁ and MK-4 were reduced on-line in a reduction zinc column and the product was detected by fluorescence. The validation method for both vitamins showed linearity between 0.2 - 1.6 ng/mL with a quantification limit of 0.2 ng/mL. The recoveries for all the cases were between 90.5 and 112.0 % with a CV <3.8%. Finally, the proposed method was applied for the analysis of vitamin K₁ and MK-4 in plasma sample of healthy subject, with a the sample throughput to 4 samples/h.

Key words: ADS precolumn; HPLC; micellar chromatography; switching column; vitamins K.

Introducción

La vitamina K es un término genérico para un grupo análogo de compuestos que tienen en común un anillo de naftoquinona sustituida con un grupo metilo en la posición 2, pero difieren en su estructura en la posición 3 (Figura 1). En la naturaleza existe la vitamina K₁ o filoquinona y la vitamina K₂ o menaquinona, de esta última se han identificado varias formas siendo la menaquinona-4 o menatetrenona (MK-4) la más activa biológicamente (1, 2). La vitamina K es transportada en la sangre principalmente por lipoproteínas de muy baja densidad (3) y los valores normales reportados para la filoquinona varían entre 0,76-1,30 ng/mL y para la MK-4 entre 0,21 y 0,72 ng/mL (4), por lo que se necesitan metodologías selectivas y muy sensibles para su determinación.

En la literatura se han reportado diferentes métodos para evaluar a la vitamina K, entre ellos aquellos basados en cromatografía de gases (CG) y utilizando la espectrometría de masas (EM) como sistema de detección (5, 6), sin embargo estos métodos carecen de la sensibilidad necesaria para estudiar los niveles endógenos de los análogos de la vitamina K. Los métodos actuales para separar y determinar estas vitaminas en plasma, suero, tejidos biológicos y alimentos utilizan la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y su cuantificación se logra, por medio de sistemas de detección electroquímicos (6, 7) y de fluorescencia (8-12), cuya sensibilidad supera la de las técnicas basadas en la absorción ultravioleta (1, 2). Por otra parte, CLAR-EM (13), permite determinar niveles endógenos de los análogos de la vitamina K en plasma y aunque este método ofrece una alta sensibilidad y exactitud, es

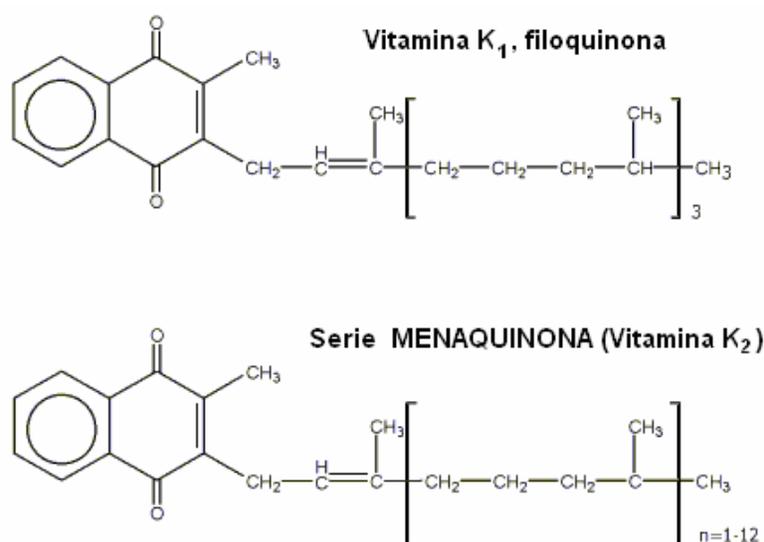


Figura 1. Estructuras químicas de los análogos de la vitaminas K.

muy costoso para análisis de rutina. El método por CLAR con detección fluorescente se basa en una reducción postcolumna de las vitaminas K a su respectivas hidroquinonas, dicha reducción puede ser: fotoquímica (14), electroquímica o química (8); siendo esta última la más usada debido a la simplicidad del instrumental necesario para la reducción. Entre los procedimientos químicos, se han empleado como reductores: borohidruro de sodio (6, 9), tetraborato de tetrametilamonio (contenidos en una postcolumna o incorporados en la fase móvil) (10, 11), óxido de platino (9) y zinc metálico muy usado por su mayor eficiencia en la reducción (12). Así, Haroon y Cols. (12) reportaron que la reducción química con zinc metálico en presencia de iones zinc en la fase móvil (Figura 2), reduce en un 95% las quinonas inyectadas comparado con el 60% que se obtiene con las técnicas electroquímicas. Sin embargo el problema mayor radica en el tratamiento de las muestras biológicas ya que los métodos reportados para determinar vitamina K en plasma involucran procedimientos laboriosos que obliga a una serie de etapas de tratamiento, limpieza y concentración de los analitos (15). En ese sentido, en el transcurso de los últimos años se han

desarrollado métodos de preparación de la muestra más eficientes que permiten la inyección directa de fluidos biológicos en el sistema cromatográfico. Para ello se han utilizado precolumnas con empaques de materiales de acceso restringido, sistemas de columnas acopladas y fases móviles con surfactantes (17). Los materiales de acceso restringido son soportes especiales de extracción selectiva que poseen una propiedad común, la de exclusión de las macromoléculas (como las proteínas) mientras que los analitos son retenidos generalmente por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas. Entre los diferentes soportes que existen en el mercado, los más usados son los de alquil-diol-silica (ADS) (18). En nuestro grupo de investigación se tiene experiencia en esta técnica y particularmente en la determinación de vitamina D₃ y sus metabolitos utilizando una precolumna Biotrap (empaque de octadecilsilano recubierto de proteínas desnaturadas) (19). En esta oportunidad, los resultados obtenidos no mostraron una recuperación cuantitativa de los analitos. Esto se debió, fundamentalmente a que estos analitos son transportados en sangre enlazados a una proteína específica y aunque la naturaleza del enlace no se conoce, se sabe que es-



Figura 2. Reducción química de la vitamina K a su respectiva hidroquinona.

tos analitos no son fácilmente dissociables de la proteína (20). Sin embargo en el presente trabajo se propone determinar a la vitamina K₁ y MK-4 inyectando directamente las muestras de plasma en una precolumna ADS inserta en un sistema de columnas acopladas y utilizando una fase de extracción que contiene un surfactante y disolventes orgánicos. De esta forma, los monómeros y las *micelas* del tensioactivo permiten solubilizar las proteínas presentes en la muestra y desplazar a los analitos asociados a las mismas liberándolos para su interacción con la fase estacionaria (21-23). El método desarrollado tiene la ventaja de integrar el tratamiento de la muestra de plasma en línea con la separación y la detección por fluorescencia. De esta forma se logró evaluar las vitaminas K₁ y MK-4 a los niveles en que se encuentran en las muestras reales y con una frecuencia de análisis superior a la reportada en otros métodos (2, 24).

Experimental

Reactivos y estándares

Todos los disolventes utilizados fueron grado para CLAR (Karl Fisher) y el agua fue purificada en un sistema Milli-Q TOC (Waters, Millipore). Los reactivos empleados fueron de grado analítico: zinc metálico (tamaño de partícula entre 30 y 100 Mesh) de 99,8% de pureza (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato sodio de 97% de pureza (Fluka Chemika) y cloruro de zinc de 98-100,5% de pureza (Riedel-de Haën). La solución regulado-

ra de fosfato 0,5 M (pH= 7,4) se preparó a partir de ácido fosfórico 85,9% en agua y se ajustó el pH utilizando hidróxido de sodio 1,0 M. Los patrones de vitamina K₁ (98%; p/p) y MK-4 fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). Se prepararon soluciones patrones de ambos analitos de 1768 µg/mL en metanol a partir del reactivo sólido. Posteriormente, se prepararon para ambos analitos diluciones de 50,0 µg/mL y luego de 0,5 µg/mL en metanol, las cuales fueron almacenadas en botellas ámbar bajo refrigeración a 4°C. Las soluciones de trabajo de menor concentración se preparaban diariamente por dilución de estos estándares en la fase móvil de lavado optimizada.

Muestras de plasma

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó un concentrado de plasma de 50 adultos voluntarios sanos. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción venosa, se les colocó heparina como anticoagulante y se centrifugaron a 4800 r.p.m. durante 10 minutos. El plasma se separó y almacenó bajo refrigeración a 4°C. Antes de su uso, las muestras de plasma se diluían con la fase móvil de lavado en proporción 1:3 v/v, se agitaban en un vortex durante 30 segundos, se centrifugaban por 2 minutos y se filtraban con membranas de 0,45 µm (suport®-450 Membrana, Waters, USA) para evitar la presencia de cualquier tipo de material en suspensión que pudiera ocasionar una obstrucción de los poros del material de empaque de la precolumna o en las conexiones del sistema.

Instrumentación

La determinación de las vitaminas K₁ y MK-4 se realizó con el instrumental que se detalla a continuación: dos bombas Knauer modelo 64 que suministraron la fase móvil de lavado (B₁) y la fase móvil de reducción (B₃), mientras que la fase de análisis fue suministrada por una bomba binaria Perkin-Elmer modelo LC-250 (B₂). En la etapa de inyección de la muestra se empleó una válvula Rheodyne modelo 7125 (VI), con un lazo de 500 µL. Para el acoplamiento del sistema en línea se empleó una válvula selectora de columnas de seis puertos Rheodyne modelo 7000 (VS). El sistema de detección empleado fue un detector UV arreglo de diodos Perkin-Elmer modelo LC 235 y un detector de fluorescencia Shidmazu modelo RF-535 y, para el procesamiento de los datos obtenidos se contó con un integrador VARIAN modelo 4290.

Procedimiento Analítico

Para la determinación de las vitaminas K₁ y MK-4 en muestras de plasma humano se utilizó un sistema de columnas acopladas que ofrece la posibilidad de integrar el tratamiento de la muestra en el procedimiento

cromatográfico. En los últimos años la modalidad de transferencia indirecta reversa ha sido ampliamente utilizada debido a que la misma evita el ensachamiento de banda. En esta modalidad, la transferencia de los analitos desde la precolumna a la columna analítica se realiza con la fase móvil de mayor poder de elución comprimiendo así al pico cromatográfico evitando su ensanchamiento (17, 25). Un esquema del sistema instrumental utilizado se muestra en la Figura 3. El análisis en el sistema de columnas acopladas se dividía en tres etapas:

Introducción y tratamiento de la muestra: Utilizando la válvula de inyección (VI) se inyectó un volumen de 500 µL de plasma previamente diluido en fase micelar. La muestra se transfirió a la precolumna de extracción ADS utilizando la fase móvil de lavado que era suministrada por la bomba 1 (B₁) a un flujo de 0,8 mL/min. Las vitaminas presentes en la muestra se retenían, mientras que los compuestos endógenos de la misma se transferían hacia el desecho, en un determinado periodo de tiempo el cual se conoce como tiempo de lavado o extracción. Durante este tiempo la válvula selectora de columnas (VS) se encontraba en la posición de carga y la

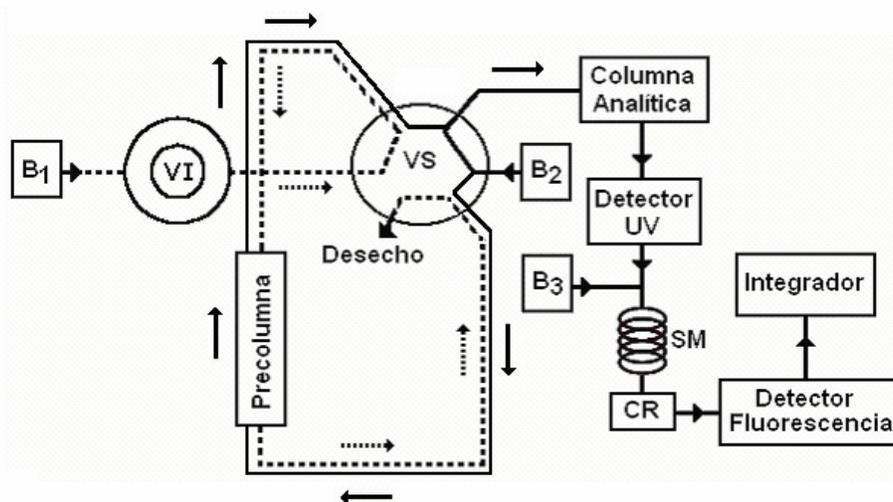


Figura 3. Diagrama esquemático del sistema instrumental utilizado; VI= válvula de inyección; VS= válvula selectora; B1, B2, B3= bombas 1, 2, 3; SM= serpentín de mezcla; CR= columna reductora. (---) Posición de carga. (→) Posición de inyección

fase móvil de elución suministrada por la bomba 2 (B₂) circulaba a través de la columna analítica a un flujo de 0,8 mL/min.

Transferencia de los analitos: En esta etapa la VS giraba a la posición de inyección, la fase de mayor poder de elución pasaba a través de la precolumna en dirección contraria a la de la fase móvil de lavado y los analitos de interés se transferían a la columna analítica, durante un tiempo que se conoce como tiempo de transferencia.

Separación de los analitos y su detección: Terminada la transferencia, la VS retorna a la posición de carga, para que la precolumna se reequilibre con la fase móvil de lavado para una nueva inyección. Simultáneamente, en esta posición, la fase móvil de análisis circulaba por la columna analítica para separar los analitos y detectarlos a la salida de la misma por fluorescencia.

Resultados y Discusión

La optimización de los parámetros instrumentales se realizó por el método univariado que consiste en variar un parámetro a la vez y en el sistema propuesto se realizaron los estudios que se detallan a continuación: separación cromatográfica de las vitaminas en la columna analítica; estudio de la reducción postcolumna de las vitaminas; tratamiento de la muestra de plasma en la precolumna de extracción ADS; acoplamiento de todo el sistema instrumental para determinar el programa de eventos de la válvula selectora de columnas. Para ello, se utilizaron soluciones patrones de las vitaminas K₁ y MK-4, muestras de plasma y muestras de plasma enriquecidas con las vitaminas K a diferentes niveles de concentración.

Estudio de la separación de las vitaminas en la columna analítica

Las muestras de plasma humano además de las vitaminas K₁ y la MK-4, tienen otras vitaminas liposolubles (A, D, E) que es necesario tenerlas en cuenta al momento de optimizar la separación en la columna analítica. En cuanto a su separación, las vitami-

nas liposolubles tienen un carácter muy hidrofóbico y por ello la cromatografía en fase reversa es la que más se ha utilizado en su determinación y fue la modalidad que se seleccionó para este trabajo. En ese sentido se utilizó una columna analítica con una fase estacionaria no polar, de la misma naturaleza que la de la precolumna utilizada para la etapa de extracción cuyas características fueron: columna Novapack (Waters) C₁₈, 15 cm de longitud, 3,9 mm de DI y 4 µm de dp. En cuanto a la optimización de la fase móvil se realizó variando su naturaleza y composición, definiendo el tipo de régimen de elución (isocrático o gradiente) y el flujo de la misma. Es por ello que para este estudio se ensayaron diferentes gradientes de elución utilizando agua, metanol y acetonitrilo y mezclas de los mismos en diferentes proporciones. Además, para disminuir el tiempo de análisis se varió el flujo entre 0,5 – 1,5 mL/min. El mejor resultado que permitió obtener una buena resolución entre las vitaminas en un tiempo de análisis satisfactorio se logró para una fase A: agua-acetonitrilo (80:20 v/v) y como fase B: metanol-acetonitrilo (65:35 v/v) en régimen de gradiente de elución, a un flujo de 0,8 mL/min.

Optimización de la reacción de reducción postcolumna y de la detección fluorescente

La reducción de las vitaminas K₁ y MK-4 a sus respectivas hidroquinonas con propiedades fluorescentes (Figura 2) se realizó postcolumna en una columna rellena con zinc metálico. Una vez que las vitaminas K se eluyen de la columna analítica por las fases móviles de elución, pasan al detector de UV y de aquí a una conexión en "T" donde el eluido recibe a la fase móvil reductora y se mezclan posteriormente en un serpentín de 50 µL antes de ingresar a la columna de zinc donde ocurre la reacción de reducción. Finalmente a la salida de la columna de zinc se realiza la detección fluorescente de las vitaminas K₁ y MK-4. Para un sistema postcolumna como éste se optimizaron todos aquellos parámetros involu-

crados en mejorar el rendimiento de la reacción de reducción con el fin de obtener la sensibilidad adecuada para su determinación en las muestras de plasma. En ese sentido, se optimizó inicialmente la fase móvil de reducción tanto en la naturaleza de sus constituyentes como en su concentración y los mejores resultados se obtuvieron para una fase constituida por metanoletanol (83:17 v/v) con 40 mM cloruro de zinc, en buffer acetato 20 mM, pH= 3,9. Del mismo modo se optimizaron las dimensiones de la columna de zinc encontrándose la mayor área de los estándares de vitaminas K con una columna de 5 cm de longitud y 4,6 mm de DI. Así mismo, se varió el flujo de la fase móvil de reducción entre 0,5 y 1,5 mL/min y se observó un incremento de la señal con 0,8 mL/min. Finalmente se optimizaron las longitudes de onda de excitación y de emisión obteniéndose un máximo de sensibilidad en la señal fluorescente con 325 nm y 440 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Estudio del tratamiento de la muestra de plasma en la precolumna de extracción ADS

Para la extracción de los analitos de la muestra se utilizó una precolumna LiChrospher RP-18 ADS de Merck (2,5 cm de longitud, 4 mm de DI y 25 μ m de dp). Esta precolumna fue introducida por Boos y Colaboradores en 1995 (26, 27). Este tipo de empaque sintetizado a partir de soporte de sílice, de tamaño de poro de 6 nm y de tamaño de partícula de 25 μ m posee una superficie externa de carácter hidrofílico (grupos dioles) que impide la interacción con las proteínas y que permite la exclusión de aquéllas de tamaño molecular superior a 15.000 Daltons. Por otra parte, la superficie interna tiene una fase enlazada hidrofóbica formada por cadenas carbonadas C₁₈, C₈ o C₄ y, son los centros de adsorción de aquellas moléculas hidrofóbicas que por su tamaño pequeño penetran a través de los poros (17,18).

Estudios realizados previamente han demostrado que es conveniente: (A) La utili-

zación de solución reguladora de fosfato en la fase de lavado o extracción debido a la compatibilidad con las proteínas plasmáticas (28). Asimismo, debido a que la precolumna contiene partículas de sílice, el pH está limitado al intervalo entre 2,5-7,5 para evitar su solubilidad. Sin embargo, para evitar la precipitación de las proteínas plasmáticas se deben evitar valores de pH entre 3-5 (29,30), la utilización de un pH cercano al fisiológico (valores normales 7,3-7,4 en sangre venosa) favorece la eliminación de las proteínas presentes en la muestra. (B) Agregar pequeñas cantidades de solvente(s) orgánico(s) en la fase de lavado, ya que usualmente ayuda a romper la interacción que se pueda establecer entre las proteínas y los analitos (28). Para determinar el perfil de elución del plasma y de los analitos, la precolumna de extracción ADS se conectó directamente al detector UV y se fijaron las longitudes de onda a 280 y a 245 nm respectivamente y se estudió la composición y el flujo de la fase móvil de lavado. Para ello se evaluó una fase que permitiera eliminar el contenido endógeno proteico de las muestras de plasma y al mismo tiempo que tuviera la composición en modificador orgánico necesaria para romper el fuerte enlace vitamina-lipoproteína. En ese sentido, se optimizó una fase de lavado micelar que permitiera la mayor eficiencia de extracción de los analitos en la precolumna variando: la concentración del surfactante, la concentración de la solución reguladora de fosfato y el tipo y proporción del modificador orgánico. Los mejores resultados se obtuvieron con una solución acetoniitrilo-2-propanol-200 mM de dodecilsulfato de sodio en la solución reguladora de fosfato 12,5 mM (pH= 7,4) (25:20:55 v/v) a un flujo de 0,8 mL/min. De este estudio se pudo establecer el tiempo de limpieza de la muestra (4 min) el cuál se estableció entre el tiempo en que finalizaba de eluir de la precolumna todo el material endógeno de la matriz y el tiempo en que comenzaban a eluir de la misma las vitaminas de interés. Es importante señalar que para este estudio se utilizó un detector UV de arreglo

de diodos con el fin de poder monitorear el tiempo necesario para eliminar la totalidad de los compuestos endógenos. Para el resto del análisis como se señaló con anterioridad se utilizó un detector de fluorescencia. Finalmente se estudió el tiempo de transferencia de los analitos desde la precolumna ADS hacia la columna analítica. Para ello se determinó el tiempo de transferencia de la vitamina K_1 que era la más retenida y se pudo observar que en un tiempo inferior a 8 minutos era eluida cuantitativamente a la precolumna estableciéndose 8 minutos como tiempo de transferencia.

Automatización del sistema y programación de la válvula selectora de columnas

Esta etapa consistió en integrar en línea la extracción de los analitos en la precolumna ADS, su separación en la columna analítica y su detección por fluorescencia previa reducción postcolumna. Para ello se montó el sistema propuesto y se estableció el programa de tiempos de la válvula automática selectora de columnas (VS), es decir, el tiempo de lavado, el tiempo de transferencia y el tiempo necesario para reacondicionar la precolumna para una nueva inyección. Del mismo modo, con el sistema completamente montado se optimizó nuevamente el gradiente de elución de la fase móvil del análisis contemplando en el mismo la etapa de transferencia de los analitos en la columna analítica. En la Tabla 1 se resumen las condiciones optimizadas para todo el sistema y en la Figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones al inyectar en el sistema 500 μ L de: un blanco de plasma diluido en fase móvil de lavado (proporción 1:3 v/v), una solución patrón de vitaminas K_1 y MK-4 en fase móvil de lavado a una concentración de 0,3 ng/mL, y una muestra de plasma diluida en la misma proporción y enriquecida con los analitos a una concentración de 0,3 ng/mL.

Validación del método

Efecto de matriz

Para evaluar el efecto de matriz en el análisis, se realizaron curvas de calibración de soluciones patrones de vitaminas K_1 y MK-4 preparados en la fase móvil de lavado y de muestras de plasma enriquecidas con los analitos utilizando el método de adición de estándar. Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de cuatro puntos y un blanco, y se midieron un mínimo de tres veces cada uno. Los intervalos de concentración estudiados para las vitaminas K_1 y la MK-4 fueron entre 0,2-1,6 ng/mL con un volumen de inyección de 500 μ L. En la Tabla 2, se presentan las ecuaciones de regresión lineal del área de pico de las vitaminas en función de la concentración (ng/mL). Las curvas de calibración son lineales para ambos analitos en los intervalos de concentración estudiados. La comparación de las pendientes de las curvas construidas a partir de las soluciones patrones en la fase de lavado con las muestras de plasma enriquecidas no muestran diferencias significativas ($t_{\text{Student}} 95\% 2,57$, $n=6$) para las dos vitaminas. Este comportamiento permite concluir que no existe interferencia de matriz en el análisis y es posible así evaluar los niveles de las vitaminas K_1 y MK-4 en muestras de plasma utilizando una curva de calibrado de ambos analitos preparados en fase de lavado.

Precisión y exactitud del método

La precisión del procedimiento se evaluó por la medición del área de pico de cinco réplicas de soluciones estándares de vitaminas K_1 y MK-4 y de muestras de plasma enriquecido con los analitos a diferentes niveles de concentración (0,3 y 0,5 ng/mL) y se analizaron con el método propuesto durante un día y entre días ($n=5$). Los resultados obtenidos mostraron que la desviación estándar relativa en un día tanto para los patrones como para las muestras de plasma enriquecido fueron menores del 3,0% para ambos analitos y entre días se encontraron entre

Tabla 1
Condiciones de operación de todo el sistema.

Etapas	Componentes del sistema	Condiciones		
Carga del lazo (Tiempo = 0 min.)	<ul style="list-style-type: none"> Válvula de inyección manual Rheodyne 7125 (VI): posición de carga 	Volumen de inyección: 500 µL de plasma diluido en la fase móvil de lavado (1:3 v/v)		
Inyección y limpieza de la muestra (Tiempo = 4 min.)	<ul style="list-style-type: none"> Válvula de inyección manual Rheodyne 7125 (VI): posición de inyección Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): en posición de carga precolumna de extracción: LiChrospher C₁₈ (2,5 cm x 4 mm D.I. y 25 m dp) 	Fase móvil de lavado: (B1): 200 mM dodecil sulfato de sodio en buffer fosfato 10mM (pH=7,4): acetonitrilo: 2-propanol (55:25:20 v/v)		
Transferencia de los analitos (Tiempo = 12 min.)	<ul style="list-style-type: none"> Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): posición de inyección, columna analítica: Novapack C₁₈ (15,0 cm x 3,9 mm DI, 4 mµ dp) 	Gradiente de elución (B2): A: agua:acetonitrilo (80:20 v/v) B: metanol:acetonitrilo (65:35 v/v)		
Análisis (Tiempo = 18 min.)	<ul style="list-style-type: none"> Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): en posición de carga precolumna de extracción: se regenera para una nueva inyección columna analítica : se realiza la separación de los analitos en la columna analítica con el gradiente de elución (B2). 	Tiempo (min.)	% A	% B
		0	20	80
		3	10	90
		4	5	95
		10	5	95
		11	0	100
Próxima inyección (Tiempo = 14 min.)	<ul style="list-style-type: none"> Válvula selectora de columnas Rheodyne 7000 (VS): posición de carga 	31	0	100
		32	20	80

0,7-2,4% lo que aseguraba una buena precisión del sistema cromatográfico.

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación. Los porcentajes de recuperación para todos los casos estuvieron comprendidos entre 90,5 y 112,0% con un CV <3,8% que pueden ser considerados cuantitativos y satisfactorios. Por otra parte, es importante señalar que estos resultados son superiores a los reporta-

dos en la literatura por otros investigadores que realizaron el tratamiento de muestra de forma manual (2, 12, 24). Esto demuestra además la excelente eficiencia de extracción de la precolumna C₁₈ utilizada.

El límite de detección definido como la concentración de analito que proporciona un área de pico igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco fue de 0,06 ng/mL para ambas vita-

Tabla 2
Características analíticas de las rectas de calibrado.

Analito	Matriz	Intervalo dinámico (ng/mL)	Ecuación ^(a)	$r^{2(b)}$
Vitamina K ₁	Fase de lavado Plasma	0,20 – 1,60	A= (249±7)10 ² C	0,9994
			A= (248±7)10 ² C + (285±6)10	0,9991
MK-4	Fase de lavado Plasma	0,20 – 1,60	A= (293 ± 9) 10 ² C	0,9993
			A= (294 ± 9) 10 ² C+ (967±2)10	0,9992

(a) Ecuación de regresión lineal: A= a + bC, donde: A= Área de pico, C= concentración de cada analito, a= ordenada en el origen (desviación estándar relativa: DER= 2%), b= pendiente de la recta (DER= 2%). (b) Coeficiente de regresión.

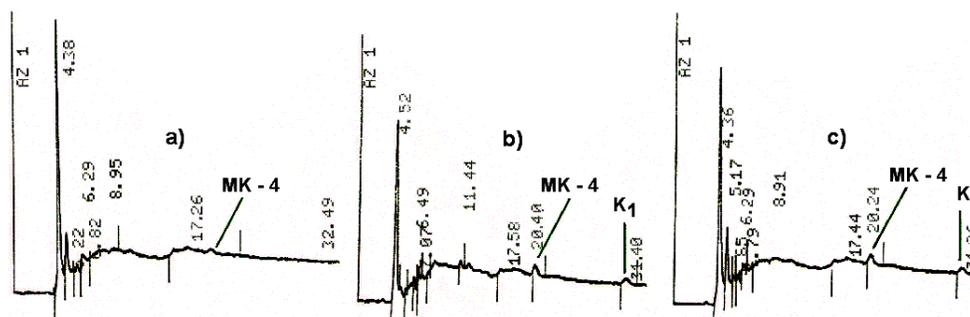


Figura 4. Cromatogramas obtenidos al realizar los estudios de recuperación a 0,3 ng/mL de concentración: a) blanco plasma b) estándar en fase de lavado c) plasma enriquecido con los analitos.

minas. Por otra parte, el límite de cuantificación definido como la concentración de analito que proporciona un área de pico igual a la señal del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco, obtenidos con una buena reproducibilidad y exactitud fue de 0,20 ng/mL para ambas vitaminas.

Utilizando el método propuesto se analizaron cuatro muestras de plasma pertenecientes a individuos sanos. Los resultados obtenidos mostraron valores entre 0,4 y 0,6 y entre 0,8 y 1,0 ng/mL para la vitamina MK-4 y K₁ respectivamente

Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló un método automatizado que permitió evaluar

cuantitativamente a las vitaminas K₁ y MK-4 en muestra de plasma sanguíneo humano por CLAR con detección por fluorescencia.

Se utilizó una precolumna de extracción ADS inserta en un sistema de columnas acopladas y una fase móvil de lavado micelar que permitió la introducción y tratamiento de las muestras de plasma humano directamente en el sistema cromatográfico. De esta forma se minimizaron los errores experimentales involucrados en un tratamiento manual de la muestra obteniéndose una mejor precisión y exactitud en el análisis.

Finalmente, el método propuesto permitió realizar en línea las etapas de tratamiento de la muestra con la de análisis por CLAR aumentando la frecuencia de análisis a una inyección cada 14 min.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al FONACIT por el soporte económico brindado (Proyecto S1-2001001146)

Referencias Bibliográficas

1. BOWMAN B., RUSSELL R. **Conocimientos Actuales Sobre Nutrición**, 8^{ta} ed., Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, Washington (USA). Capítulo 15, pp. 178-187, 2003.
2. WANG L., BATES C., YAN L., HARRINGTON D., SHEARER M., PRENTICE A. **Clin Chim Acta** 347: 199-207, 2004.
3. MAHAN L., ESCOTT S. **Nutrición y Dietoterapia de Krause** 10^a ed., Editorial McGraw-Hill Interamericana, Distrito Federal (México), pp. 89-91, 2001.
4. WAKABAYASHI H., ONODERA K., YAMATO S., SHIMADA K. **Nutrition** 19: 661-665, 2003.
5. DOLNIKOWSKI G., SUN Z., GRUSAK M., PETERSON J., BOOTH S. **J Nutr Biochem** 13: 168-174, 2002.
6. RAITH W., FAULER G., PICHLER G., MUNTEAN W. **Thromb Res** 99: 467-472, 2000.
7. MCCARTHY P., HARRINGTON D., SHEARER M. **Methods in Enzymology** 282: 421- 433, 1997.
8. MACHLIN L. **Handbook of vitamins** 2^a ed., Marcel Dekker, New York (USA). Capítulo 4, pp. 145-194, 1991.
9. SHINO M. **Analyst** 113: 393-397, 1988.
10. LAMBERT W., DE LEENHEER A., BAERT E. **Anal Biochem** 158: 257-261, 1986.
11. DE LEENHEER A., LAMBERT W., NELIS H. **Modern Chromatographic Analysis of Vitamins** 2^a ed., Marcel Dekker, New York (USA). Capítulo 4, pp. 197-233, 1992.
12. HAROON Y., BACON D., SADOSWSKI J. **J Chromatogr** 384: 383-389, 1987.
13. SUHARA Y., KAMAO M., TSUGAWA N., OKANO T. **Anal Chem** 77: 757-763, 2005.
14. PÉREZ T., MARTÍNEZ C., GARCÍA M., MARTÍN J. **J Chromatogr A** 1141: 67-72, 2007.
15. BOYER F., FERNÁNDEZ J., LUQUE DE CASTRO M., QUESADA J. **Analyst** 124: 401-406, 1999.
16. BERRUETA L., GALLO B., VICENTE F. **Chromatographia** 40: 474-483, 1995.
17. ANDERSON D. **Clin Chem** 65: 434R-443R, 1993.
18. SOUVERAIN S., RUDAZ S., VEUTHEY J. **J Chromatogr B** 801: 141-156, 2004.
19. BRUNETTO M., OBANDO M., GALLIGNANI M., ALARCON O., NIETO E., SALINAS R., BURGUERA J., BURGUERA M. **Talanta** 64: 1364-1370, 2004.
20. KOSHY K. **J Pharm Sci** 71: 137-153, 1982.
21. GARCÍA M., CARDA S. **J Chromatogr B** 736:1-18, 1999.
22. SALAGER J. Surfactantes en solución acuosa. Cuaderno FIRP N° 201-A. Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, 1993.
23. KOENIGBAUER M. **J Chromatogr Biomed Appl** 531: 79-99, 1990.
24. AHMED S., KISHIKAWA N., NAKASHIMA K., KURODAN. **Anal Chim Acta En prensa** 2007.
25. RAMSTEINER K. **J Chromatogr** 456: 3-20, 1988.
26. BOOS K., RUDOLPHI A., VIELHAUER S., WALFORT A., LUBDA D., EISENBEISS F. **Fresenius J Anal Chem** 352: 684-690, 1995.
27. BOOS K., GRIMM C. **Trends Anal Chem** 10: 175-180, 1999.
28. HERMANSSON J., GRAHN A., HERMANSSON I. **J Chromatogr A** 797: 251-263, 1998.
29. YU Z., WESTERLUND D. **Chromatographia** 44: 589-594, 1997.
30. SHIHABI Z. **J Liq Chromatogr** 11: 1579-1593, 1988.