

Métodos para Determinação de Vitamina D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: uma Revisão

Methods for Determination of Vitamin D by High Performance Liquid Chromatography: a Review

Marianna R. Anjos,^{a,*} Monalisa S. C. de Jesus,^a Manuela C. P. A. Santiago,^a Allan E. Wilhelm,^b Sidney Pacheco^a

^aEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cromatografia Líquida, CEP 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

^bEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Óleos Graxos, CEP 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

*E-mail: marianna.anjos@embrapa.br

Recebido: 26 de Setembro de 2023

Aceito: 18 de Março de 2024

Publicado online: 25 de Março de 2024

Scientific community's interest in the role of vitamin D in health has increased greatly in recent years. About 1 billion people around the world have deficiency or insufficiency of this vitamin. This statistic is worrying, as vitamin D is indispensable to human health. Accurate measurement of vitamin D is necessary to provide adequate recommendations for supplementation for at-risk groups and to monitor regulatory compliance. Since both under-dosing and overdosing of vitamin D can have adverse health effects, adequate control of the presence of this vitamin in both food and supplements is necessary. Determination of vitamin D in foods represents an enormous analytical challenge because the chemistry of this vitamin is complex and the methods are detailed and time-consuming. The objective of this work is to review the analytical methods for vitamin D determination in foods, using high-performance liquid chromatography as an analytical tool.

Keywords: HPLC; cholecalciferol; ergocalciferol; vitamin D2; vitamin D3.

1. Introdução

O interesse da comunidade científica no papel da vitamina D na saúde tem aumentado muito nos últimos anos. Estima-se que 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo apresentam deficiência ou insuficiência dessa vitamina. Essa estatística é preocupante, pois a vitamina D é indispensável à saúde humana.^{1,2} Além da prevenção do raquitismo ou da osteomalácia, as evidências experimentais e epidemiológicas vinculam os seus baixos níveis a diversos problemas de saúde, tais como, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, risco de malignidade, doenças autoimunes e infecções.³

A conscientização dos benefícios da vitamina D à saúde levou a um crescimento na sua suplementação. Os suplementos dessa vitamina estão agora amplamente disponíveis e muitos são comercializados como formulações não regulamentadas, vendidas ao público com poucas orientações para uma administração segura. Isso contribuiu para uma transição na qual um aumento global nos casos de intoxicação por vitamina D tem sido relatado.² Esta intoxicação pode ser assintomática ou chegar a distúrbios neuropsiquiátricos graves e com risco de vida, geralmente relacionados à hipercalcemia.⁴

Com o advento da Covid-19, terapias alternativas para aumento da imunidade foram adotadas por muitos, incluindo o uso da vitamina D. Um grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) publicou uma revisão narrativa sobre o uso da vitamina D para prevenção ou tratamento da Covid, analisando dados publicados de janeiro a junho de 2020. Eles concluíram que apesar dos estudos selecionados relatarem efeitos positivos do uso de vitamina D para prevenção ou tratamento da Covid-19, havia poucos dados quantitativos para avaliar o real impacto do uso desta vitamina como uma intervenção contra uma doença tão recente quanto esta.⁵

Uma vez que tanto a sub quanto a super dosagem da vitamina D podem ter efeitos adversos à saúde, faz-se necessário um controle adequado da presença desta vitamina tanto em alimentos quanto em suplementos. A determinação da vitamina D em alimentos representa um enorme desafio analítico porque a química dessa vitamina é complexa e os métodos são detalhados e demorados.¹

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão sobre os métodos analíticos para a determinação de vitamina D em alimentos, que utilizam como ferramenta analítica a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2. Método

Foi feita uma busca no Portal de Periódicos da Capes com os seguintes termos: *Vitamin D determination* (no campo título) e *liquid chromatography* (qualquer campo), no período de 2001 a 2023. Foram encontrados 35 artigos revisados por pares no idioma inglês, publicados nas seguintes bases de dados: Web of Science (17); Science Direct (17); Pubmed (13); DOAJ (8) e Springer (6). Uma nova busca foi feita no Portal Capes com os seguintes termos: *Vitamin D determination* (no campo título) e *food analysis* (qualquer campo), no período de 1990 a 2003, foram encontrados 32 artigos revisados por pares no idioma inglês, publicados nas seguintes bases de dados: Web of science (23); Science Direct (16); Pubmed (12); Springer Ejournals (9) e Wiley online Library (4). Alguns artigos se repetiram na segunda busca. Deste total 18 artigos foram utilizados. Os critérios para a seleção foram os artigos sobre análise de vitamina D em alimentos por CLAE ou CLAE/EM.

Foi feita também uma busca no Portal Scielo com o

termo vitamina D, no período dos últimos 20 anos, no idioma português, foram encontrados 30 artigos na área da saúde, destes 6 artigos foram citados na introdução.

3. Formas Encontradas

As principais formas da vitamina D são a vitamina D2 e a vitamina D3, também conhecidas como ergocalciferol e colecalciferol, respectivamente. A vitamina D2 tem uma dupla ligação C22-C23 e um grupo metil em C24, o que a difere da vitamina D3^{6,7} (Figura 1).

Em relação à síntese de ambas as formas de vitamina D, a luz solar é um dos fatores primordiais para a sua produção. A síntese de vitamina D2 ocorre em fungos e leveduras a partir da exposição de ergosterol (provitamina D2; Figura 1, 1) à radiação ultravioleta, enquanto a vitamina D3 é produzida na pele de humanos a partir do 7-desidrocolesterol (provitamina D3 – 7-DHC; Figura 1, 2) também exposto à mesma radiação (290-350 nm).^{6,7}

Tanto a vitamina D ingerida quanto a produzida pela pele são transportadas até o fígado, onde sofrem hidroxilação em

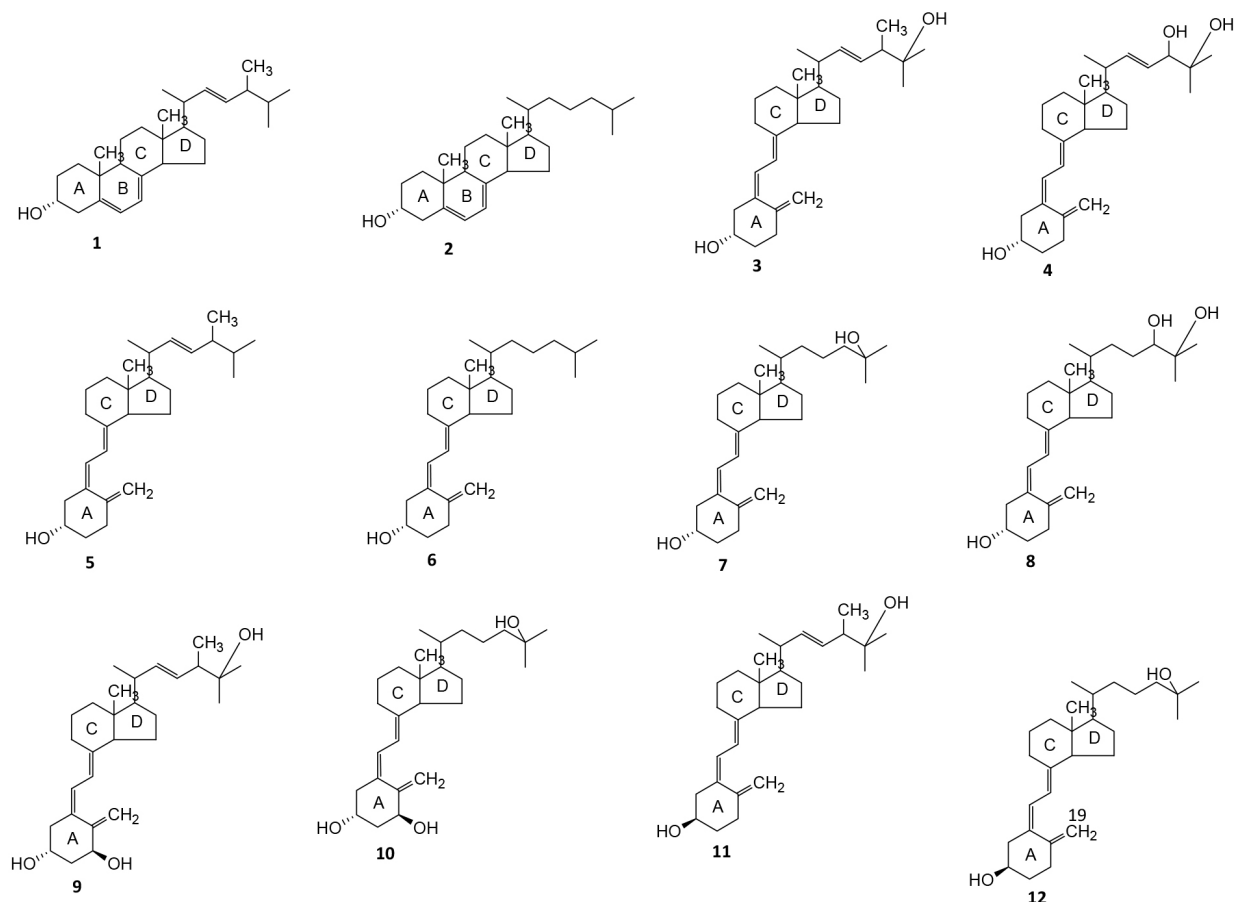


Figura 1 – Moléculas das provitaminas **1.** D2 (ergosterol), **2.** D3 (7-dehidrocolesterol), as vitaminas **5.** ergocalciferol (vitamina D2) e **6.** colecalciferol (vitamina D3) e os seus metabólitos **3.** 25-hidroxitamina D2 (25(OH)D2), **7.** 25-hidroxitamina D3 (25(OH)D3), **9.** 1,25-dihidroxitamina D2 (1,25(OH)2D2), **10.** 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)2D3), **4.** 24,25-dihidroxitamina D2 (24,25(OH)2D2), **8.** 24,25-5-dihidroxitamina D3 (24,25(OH)2D3), **11.** 3-epi-25-hidroxitamina D2 (3-epi-25(OH)D2), **12.** 3-epi-25-hidroxitamina D3 (3-epi-25(OH)D3)

C-25 através da ação da enzima 25-hidroxiase, formando a 25-dihidroxitamina D (25(OH) D) (Figura 1, 3 e 9), também chamada de calcidiol. Depois o calcidiol segue para os rins onde sofre uma segunda hidroxilação em C-1 através da ação da enzima 1α -hidroxilase, a qual o converte em 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)2D) (Figura 1, 9), também chamada de calcitriol, que é a forma metabolicamente ativa da vitamina D. Há outros metabólitos da vitamina D como a 24,25-dihidroxitamina D (24,25(OH)2D) (Figura 1, 4 e 8) e a 3-epi-25-hidroxitamina D (3-epi-25(OH) D) (Figura 1, 11 e 12).

A quantificação individual dos metabólitos é importante, já que eles possuem diferenças em suas atividades biológicas, absorções intestinais e em seus tempos de meia vida no organismo. A (3-epi-25(OH) D) (Figura 1, 11 e 12) por exemplo, é um análogo inativo da vitamina D, que muitos métodos analíticos não distinguem das formas ativas da vitamina D, e a somam ao total das formas de vitamina D ativas detectadas, superestimando o resultado.¹⁰

A vitamina D ocorre naturalmente em alimentos principalmente como vitamina D3 (colecalciferol; Figura 1, 6), e como vitamina D2 (ergocalciferol; Fig 1, 5) em plantas, e 25-hidroxitamina D3 em produtos de origem animal, como carne e ovos.¹¹ Uma vez que está presente em um número limitado de alimentos, a vitamina D em alguns países, é adicionada na forma de suplemento em produtos com grande abrangência na população, como por exemplo o leite,¹² dessa forma o leite se torna uma importante fonte de vitamina D para populações de risco, incluindo as crianças.

4. Determinação de Vitamina D

4.1. Métodos de extração

A determinação da vitamina D em alimentos representa um desafio analítico porque além das matrizes alimentares serem complexas, as formas presentes de vitamina D em matrizes biológicas encontram-se ligadas a lipídeos e proteínas. Sendo necessários para a extração, métodos de saponificação ou precipitação de proteínas (PP). Geralmente a saponificação é utilizada para extração em alimentos enquanto a precipitação de proteínas é usada em amostras de plasma/soro com poucas exceções.¹⁰

Existem 11 métodos validados pela AOAC International (Gaithersburg, MD), a organização dos EUA responsável por estabelecer métodos oficiais legalmente defensáveis, para a determinação de vitamina D em alimentos e suplementos, entre métodos químicos e microbiológicos. Três métodos químicos foram publicados desde 1990: Método 992.26 - vitamina D3 (colecalciferol) em fórmulas infantis prontas à base de leite,¹³ Método 995.05 - fórmulas infantis de vitamina D e produtos entéricos,¹⁴ e Método 2002.05 - colecalciferol (vitamina D3) em alimentos selecionados.¹⁵ Um método mais antigo, o método 982.29 - vitamina D em rações mistas, pré-misturas e alimentos para animais

de estimação, também tem aplicabilidade.¹⁶

Os métodos da AOAC International (Gaithersburg, MD) são bastante semelhantes. Em geral, as amostras são saponificadas para hidrolisar os lipídios. A saponificação das amostras é feita com a adição de ác. ascórbico, etanol, e solução de hidróxido de potássio (KOH) 50% (p/v), antes da reação é adicionado o padrão interno (vitamina D2 ou D3). A reação é feita sob refluxo por 30-45 min em banho de vapor. Após o resfriamento, o hidrolisado é transferido para um funil de separação onde as vitaminas são extraídas com solventes (hexano ou éter/éter de petróleo ou n-heptano). Em seguida as vitaminas D2 e D3 extraídas são coletadas como um único pico usando cromatografia em fase normal de alto desempenho em escala preparativa (HPLC). Para a separação das vitaminas D2 e D3, é utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e coluna de fase reversa. Variações surgem dos diferentes tipos de solventes e volumes utilizados para a extração, padrões internos e quantidades das amostras, de acordo com cada tipo de matriz alimentícia a ser analisada.¹³⁻¹⁶ De um modo geral são métodos com muitas etapas para a extração e a separação, o que os tornam trabalhosos e requerem profissionais treinados e atentos aos detalhes para que sejam bem executados.

Em seu trabalho, Philips *et al.*¹ prepararam e caracterizam materiais de controle para vitamina D3 em matrizes alimentares específicas (salmão enlatado, cereal fortificado com vitamina D3, suco de laranja, leite e queijo) para melhorar a qualidade das medições analíticas de vitamina D em alimentos essenciais para o NFNAP (National Food and Nutrient Analysis Program), para garantir a precisão e consistência de novos dados de SR (Substâncias de Referência) e para harmonizar os resultados dos métodos entre um subconjunto de seis laboratórios participantes. Dos seis laboratórios participantes, três usaram os métodos oficiais da AOAC,¹³⁻¹⁵ e três métodos próprios.^{17,18} Para identificação e quantificação os seis usaram a técnica de cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta (CLAE-UV). Um resumo dos métodos utilizados se encontra na Tabela 1.

Um resultado inicial inesperado foi uma disparidade inaceitável nos valores obtidos em relação ao valor de referência. O laboratório de referência utiliza o método AOAC 992.26.¹³ partir de métodos analíticos de última geração, e realizados por laboratórios experientes. O desvio padrão relativo (RSD) entre os laboratórios participantes variou de 26,4% (cereais) a 45,6% (suco de laranja) e foi de 30,6 %, 30,7 % e 36,4 %, respectivamente, para queijo, leite e salmão enlatado.

Em relação à extração da vitamina D nos alimentos fortificados, os autores¹ concluíram que há dois problemas principais com os métodos oficiais existentes. Primeiro, eles são longos, trabalhosos e requerem extrema atenção aos detalhes. Isso cria um potencial para erro e baixa precisão, resultando em uma tendência de se executar o mínimo de amostras necessárias e exigindo um analista habilidoso.

Consequentemente, o desvio padrão relativo (RSD) dos dados gerados por esses métodos tende a ser alto e está em desacordo com a tendência de executar menos amostras. Em segundo lugar, os métodos foram validados apenas para produtos lácteos fortificados com vitamina D3 e não para outros tipos de alimentos.

A vitamina D de ocorrência natural (por exemplo, em carne, peixe, ovos) pode não ser extraída tão eficientemente quanto em alimentos fortificados, além de estar presente como 25-hidroxivitamina D^{19,20} ou, em alimentos como cogumelos, como vitamina D2 (ergocalciferol)²¹. Os autores concluíram que a sua pesquisa demonstrou a necessidade intensa de materiais de referência certificados (MRC) para vitamina D em matrizes alimentares, incluindo validação de medições para vitamina D endógena em carnes e peixes, e outras formas de vitamina D (por exemplo, 25-hidroxivitamina D), conforme relatado por outros pesquisadores^{11, 19, 20}. Os resultados também indicam que outros estudos de vitamina D em alimentos requerem validação semelhante da metodologia e desenvolvimento, implementação de materiais de controle combinados com a matriz para garantir a exatidão e precisão dos resultados.

A seguir são apresentados alguns métodos de extração para a análise de vitamina D em alimentos.

Gomes *et al.*¹⁰ fizeram uma comparação entre a precipitação de proteínas (PP) e a saponificação (SN) para o preparo de amostras de leite de vários mamíferos. Para a PP, adicionaram 8 mL de acetonitrila a 4 mL de leite e agitaram por 2 min. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min até a precipitação proteica completa e em seguida centrifugadas por 10 min a 4000 g. Para a SN, 4 mL de solução etanólica de KOH 8 M e 2,8 mL de solução 1 M de ácido ascórbico foram adicionados a 4 mL de leite. A mistura foi agitada em vórtice por 2 min e incubada em temperatura ambiente por 12 h, seguido de centrifugação por 10 min a 4000 g. Ambos os sobrenadantes foram transferidos para um tubo de centrífuga e submetidos ao processo de ELL (extração líquido-líquido). Na ELL, 12 mL de hexano: diclorometano (4:1, v/v) foram adicionados à solução preparada na PP e agitada em vórtice por 2 min. O processo foi repetido. As duas alíquotas de sobrenadante foram somadas e secas sob fluxo de nitrogênio. O resíduo obtido na ELL foi derivatizado com 100 µL de 4-fenil-1,2,4-triazolína-3,5-diona (PTAD), excesso molar de 10.000 vezes. A reação ocorreu em temperatura ambiente por 1h. Após esse tempo foi adicionado 50 µL de etanol para encerrar a reação. As soluções foram secas sob fluxo de nitrogênio e os resíduos foram reconstituídos com 100 µL da fase móvel A (ver Tabela 1), centrifugadas por 5 min a 4000 g e o sobrenadante utilizado para as análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-EM/EM)¹⁰. Os autores constataram que o método de precipitação de proteínas foi mais eficaz em leite do que a saponificação, para a vitamina D2 foram encontrados 8 fmol (PP) contra 5 fmol (SN), para a vitamina D3 12 fmol (PP) contra 9 fmol (SN).

A extração otimizada de Viñas *et al.*²² consistiu na adição de 3 mL de acetonitrila a 0,2-2 g de amostra de alface ou 50-250 mg de alimento infantil ou amostra de referência de alimento infantil (infant/adult nutritional formula SEM 1849a do NIST, Gaithersburg, MD, USA) em tubo cônico de polipropileno. A suspensão foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min e filtrada em fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF) 0,45 µm. Ao sobrenadante foi adicionado 150 µL de tetracloreto de carbono (solvente extrator) na amostra aquosa formando uma mistura turva à qual foram adicionados 6 mL de água ultrapura, em seguida agitada, e centrifugada por 2 min a 3000 rpm. O solvente extrator decantado no fundo do tubo cônico recuperado (50 ± 10 mL) foi seco sob fluxo de nitrogênio e o resíduo reconstituído em 50 mL de acetonitrila e analisado por CLAE-DAD e por CLAE-EM.

Kumar *et al.*²³ apresentaram dois métodos para detecção de Vitamina D3 para os laboratórios de análises clínicas na Índia. Por se tratar de materiais biológicos, a etapa de extração realizada para ambos os métodos foi mais simples do que se costuma encontrar na literatura para matrizes alimentícias. Foram adicionados 350 µL de uma solução de metanol:2-propanol (80:20, v/v) a 0,5 mL de amostra, sendo a mesma submetida à agitação. Após, a vitamina D foi extraída pela adição de 1 mL de hexano, seguida de agitação com formação de duas fases. A fase orgânica foi separada por centrifugação, evaporada sob fluxo de nitrogênio e em seguida diluída com a fase móvel de cada método.

Gentili *et al.*²⁴ propuseram um método de avaliação de micronutrientes lipossolúveis em leite. A extração foi realizada em alíquotas de 6 mL de amostra, com adição de etanol e KOH para precipitação das proteínas e saponificação a frio durante 15 horas. Após a saponificação os analitos foram extraídos com hexano e concentrados por evaporação de solvente com nitrogênio. As análises de vitaminas foram realizadas por CLAE-DAD combinada com APCI-EM/EM com separação em fase reversa.

Farag *et al.*²⁵ se propuseram a desenvolver um método sensível e exato por cromatografia líquida para determinação de vitamina D3 em alimentos com elevado, baixo e zero teor de gordura. O isolamento da vitamina incluiu uma etapa de saponificação e outra de extração com éter de petróleo e éter dietílico. O teor de gordura dos alimentos também foi determinado. As etapas de preparo da amostra foram as seguintes: Saponificação dos alimentos com elevado teor de gordura - 5 gramas de amostra em pó ou 5 mL de amostra líquida foram adicionados 10 mL de água morna a 40 °C, seguido de agitação por vórtice pelo período de 10 min. Após homogeneização, adicionou-se 20 mL de solução KOH 50% e 1 grama ácido ascórbico, sendo o volume completado até 100 mL com etanol e o frasco coberto por papel alumínio submetido à agitação contínua durante a noite à temperatura ambiente até que a amostra estivesse completamente saponificada. Para alimentos com baixo ou zero teor de gordura foi feito o mesmo procedimento sem a etapa de adição de água. Extração - após agitação, a amostra saponificada foi transferida para funil de separação

de 500 mL, sendo adicionados 50 mL de éter dietílico: éter de petróleo (50:50, v/v), com subsequente agitação por 20 min. A camada aquosa foi reextraída com mais 50 mL da mistura de éter dietílico: éter de petróleo, com posterior agitação por 20 min em outro funil de separação. As duas camadas orgânicas foram unidas e lavadas duas vezes por agitação de 2 min com 250 mL de água. A camada orgânica foi recolhida e evaporada a 40 °C. Para a análise cromatográfica, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de metanol e filtrado em membrana de 0,45 µm.

Mandrioli *et al.*²⁶ avaliaram o teor de vitamina D3 em amostras de leite de vaca comercializados como de alta qualidade na Itália, avaliando tantos os leites crus quanto os pasteurizados. A extração da vitamina envolveu procedimentos de saponificação e purificação. Para a saponificação direta a frio foram adicionados 2,36 µg de vitamina D2 (padrão interno), 35 mL de uma solução 35% de KOH em etanol 85% e 20 mL de solução pirogalol: etanol (1:99, v/v) a 35 g de amostra, em um frasco de vidro. Após, utilizou-se nitrogênio para remoção do oxigênio do frasco, sendo em seguida o mesmo submetido à agitação por 18 h no escuro. A fração insaponificável foi então extraída duas vezes com 35 mL da mistura éter de petróleo: éter dietílico (90:10, v/v). A fase etérea foi lavada 3 vezes com 30 mL de água até atingir pH neutro. O extrato etéreo foi seco através da adição de 10 g de sulfato de sódio anidro, por um período total de contato de 60 min a 4 °C. Após filtração em papel de filtro, a fase etérea foi seca em rotaevaporador, sendo em seguida diluída com 1 mL de n-hexano e armazenada a -20 °C até análise. Para a extração em fase sólida (EFS) da fração insaponificável foram utilizados cartuchos com 500 mg de sílica. Após ativação com 5 mL de n-hexano, o cartucho foi lavado com 2 mL de n-hexano: clorofórmio (22:78, v/v), sendo em seguida a vitamina D3 eluída com 2 mL de metanol. O extrato metanólico foi seco sob fluxo de nitrogênio e dissolvido posteriormente com menor volume de metanol.

Kwak *et al.*²⁷ desenvolveram um método simples e rápido que utiliza condições otimizadas para a extração (saponificação sem aquecimento e extração em fase sólida dispersiva (dSPE)) para a determinação de vitamina D3 em produtos lácteos emulsionados como fórmulas infantis à base de leite. Nas condições otimizadas do método, 0,5 g de amostra foram homogeneizadas com 10 mL de água à temperatura ambiente. Foram adicionados 10 mL de isopropanol como solvente de extração. As amostras foram agitadas por 1 min em vórtex. Foram adicionados 4 g de (NH₄)₂SO₄ anidro para induzir a separação das fases e seguindo imediatamente para agitação por 30 s no agitador vórtex. Em seguida o material foi centrifugado por 5 min a 4000 rpm a 4 °C. A camada sobrenadante lipídica (6 mL) foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL para a saponificação, sendo adicionados 150 mg de KOH, 150 mg de sorbente dSPE Discovery® DSC-NH₂ e 2,4 g de NaCl. Os tubos foram vigorosamente agitados por 1 min e em seguida mantidos por 1,5 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 6 mL de água destilada e as soluções

foram agitadas por 1 min em vórtex. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 min a 4000 rpm a 4 °C. Uma alíquota de 3 mL da solução foi concentrada para 0,5 mL sob fluxo de nitrogênio, filtrada em membrana PVDF 0,45 µm e transferida para injeção no sistema CLAE-EM/EM.

No método de Trenerry *et al.*²⁸, a determinação de vitamina D₃ em amostras de leite cru, leite comercial e fórmulas infantis foi feita após saponificação com KOH e extração com hexano. Para a saponificação, 10 mL de amostra foram adicionados 0,5 g de ác. ascórbico, 40 mL de etanol e 10 mL de KOH 100% (p/v), aquecido sob refluxo com agitação por 30 min. Em seguida a solução foi resfriada e diluída com 50 mL de água e 10 mL de etanol. A solução foi transferida para um funil de separação e os analitos extraídos em 50 mL de hexano contendo 15 mg L⁻¹ de hidroxitolueno butilado (BHT) com mistura suave. A fase aquosa foi separada e extraída duas vezes com porções de 20 mL de hexano contendo 15 mg L⁻¹ de BHT. Os extratos hexânicos foram combinados e lavados com água (3 × 100 mL). A solução de hexano foi transferida para um frasco âmbar e o solvente removido sob vácuo a 40 °C. O resíduo foi reconstituído com 1,0 mL de solução padrão interno (vitamina D₃-[2H₃], 0,1 µg mL⁻¹) e filtrado em membrana de teflon® de 0,45 µm antes da análise por CLAE-EM.

Um resumo dos métodos de extração com seus respectivas condições cromatográficas está apresentado na Tabela 1.

4.2. Métodos de separação, identificação e quantificação

A determinação da vitamina D é necessária para proporcionar recomendações adequadas para a suplementação de grupos de risco e para monitorar as conformidades regulatórias. Os métodos empregados para a identificação e quantificação atualmente utilizam a CLAE-EM, utilizando feixe de partículas, ionização por eletronebulização (ESI) ou ionização química sob pressão atmosférica (APCI), que proporcionam melhor seletividade quando comparados aos detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis) ou fluorescência (FL).^{10,16}

Rakusa *et al.*²⁹ propuseram um método rápido por CLAE-UV para determinação de vitaminas solúveis, além de coenzima Q10 em medicamentos. Foi feito um estudo de validação, no entanto para isso foi usado apenas padrões. Os autores utilizaram um sistema cromatográfico da Agilent 1100/1200 series® com DAD em 270nm e uma coluna C18 (4.6x150mm; 5µm) Luna da Phenomenex. A separação foi com eluição de ACN: THF: Água (50:45:5) em modo isocrático a 1mL.min⁻¹. Os padrões foram diluídos em Hexano com 0,05% de BHT. A separação foi realizada em fase reversa, mas apenas a vitamina D3 foi utilizada no estudo. A faixa de trabalho para a vitamina D3 variou de 0,25-50 mg L⁻¹ e o LOQ obtido foi de 0,15 mg.L⁻¹.

Woollard *et al.*³⁰ realizaram experimentos de isomerização a partir de soluções padrão de vitaminas D2

Tabela 1. Resumo dos Métodos de Determinação de Vitamina D

Autor	Forma da Vitamina D	Matriz	Extração	Purificação e concentração	Deteção	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Faixa de trabalho/ LD e LQ
Gomes <i>et al.</i> ¹⁰	8 análogos de vitamina D2 e D3	Leite materno, de vaca, égua, cabra e ovelha	Precipitação de proteínas com acetonitrila. Extração LL com hexano: diclorometano (4:1)	Evaporação com N ₂ seguida de derivatização com PTAD	CLAE-EM/EM (m/z no texto)	Phoroshell 120 EC-C18 (150 x 2,1 mm, 2,7µm)	A: H ₂ O (0,1 % ác. fórmico) B: MeOH (0,1% ác. fórmico)	LD: 0,2-0,4 fmol
AOAC 992.26 ¹³	D3	Fórmulas infantis prontas à base de leite	Saponificação seguida de extração com éter etílico e éter de petróleo	CL preparativa com coluna de sílica (250 x 4,6 mm, 5 µm)	CLAE-UV (254 nm)	Fase normal sílica (150 x 4,6 mm, 3 µm)	Hexano: álcool n-amílico (99,85: 0,15)	488-533 UI L ⁻¹
AOAC 995.05 ¹⁴	D2 e D3	Fórmulas infantis e produtos entéricos	Saponificação seguida de extração com hexano	EFS coluna de sílica 500 mg / 2,8 mL	CLAE-UV (265 nm)	Fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente com MeOH: ACN: AC Etila	8-260 UI. 946. L ⁻¹
AOAC 2002.05 ¹⁵	D3	Leite fortificado, fórmulas infantis, margarina, óleos	Saponificação seguida de extração com n-heptano	CL preparativa com coluna de sílica (250 x 4,6 mm, 5 µm)	CLAE-UV (265 nm)	Fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MeOH: ACN (20:80)	0,4-12 µg 100g ⁻¹
AOAC 982.29 ¹⁶	D2 e D3	Rações	Saponificação seguida de extração com éter de petróleo	Coluna de alumina 250 g (150 x 20 mm, tubo) e CL preparativa C18 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	CLAE-UV (254 nm)	Fase normal sílica (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Hexano: álcool n-amílico 0,35% (v/v)	2-200 UI g ⁻¹
Chen <i>et al.</i> ¹⁷	D2 e D3	Soro ou plasma	Extração líquido-líquido com etanol e acetato de etila	EFS com partícula C18	CLAE-UV (265 nm)	Zorbax Sílica (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Hexano: isopropanol (99:1)	-
Hollis ¹⁸	D3	Alimentos	Extração com hexano	-	CLAE-UV (265 nm)	-	-	-
Viñas <i>et al.</i> ²²	D2 e D3	Alimentos	DLLME com ACN e tetracloro de carbono	Centrifugação e evaporação com N ₂	CLAE-DAD CLAE-EM-APCI (m/z) no texto	Zorbax Eclipsed non endcapped (25 cm x 0,46 cm x 5 µm)	ACN: H ₂ O (70:30) modo isocrático	LD e LQ: 3,1 e 10 ng mL ⁻¹ (D2) e 4,0 e 13,0 ng mL ⁻¹ (D3).
Kumar <i>et al.</i> ²³	D3	Amostras biológicas	Extração LL com hexano	Evaporação com N ₂	CLAE-UV (265 nm)	C18 (150 x 4,6 mm; 3 µm)	Método 1: MeOH: ACN (95:5) Método 2: MeOH: ác. fórmico 0,1 % em água (95:5)	M1:LD e LQ: 1,4 e 5,2 ng. mL ⁻¹ M2:LD e LQ: 1,1 e 3,6 ng. mL ⁻¹
Gentili <i>et al.</i> ²⁴	D2 e D3	Leite de vaca, búfala, ovelha, cabra e jumenta	Saponificação seguida de extração com hexano	Evaporação com N ₂	CLAE-DAD combinada com APCI-EM/EM	Supelcosil C18 (4,6 mm x 50 mm, 5 µm) e Alltima C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	Gradiente: Fase A:MeOH (50:50) Fase B: hexano: isopropanol (50:50)	LD e LQ: 0,90 e 2,70 µg L ⁻¹ (D2) 1,12 e 3,36 µg L ⁻¹
Farag <i>et al.</i> ²⁵	D3	Alimentos com elevado, baixo e zero teor de gordura	Saponificação seguida de extração com éter etílico e éter de petróleo	Lavagem com água e evaporação com N ₂	CLAE-UV (265 nm)	ACE 5 C18-300 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático MeOH:ACN (50:50) Vazão: 1 mL min ⁻¹	LD: 5,09 µg L ⁻¹ LQ: 15,42 µg L ⁻¹

Tabela 1. Resumo dos Métodos de Determinação de Vitamina D (cont.)

Autor	Forma da Vitamina D	Matriz	Extração	Purificação e concentração	Deteccção	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Faixa de trabalho/ LD e LQ
Mandrioli <i>et al.</i> ²⁶	D2 e D3	Leite de vaca	Saponificação seguida de extração com éter etílico e éter de petróleo. A fração insaponificável foi extraída por EFS com cartucho de sílica 500mg	Lavagem com água e evaporação com N ₂	CLAE-DAD (265 nm) CLAE-EM ESI+ m/z (no texto)	C30 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático MeOH: H ₂ O (96:4) Vazão: 1 mL min ⁻¹	LD: 1 µg L ⁻¹ LQ: 3 µg L ⁻¹
Kwak <i>et al.</i> ²⁷	D3	Fórmulas infantis à base de leite	Saponificação sem aquecimento e dSPE	Evaporação com N ₂	CLAE-EM/EM ESI+ m/z (no texto)	X bridge C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm)	Gradiente A: formiato de amônio 5mM aquoso B: formiato de amônio 5mM em MeOH	LD: 0,396 ug kg ⁻¹ LQ: 1,307 ug kg ⁻¹
Trenerry <i>et al.</i> ²⁸	D3	Leite cru, fórmulas comerciais e infantis	Saponificação seguida de extração com hexano	Lavagem com água e concentração no rotaevaporador	Comparação entre CLAE-MS ⁿ e CLAE-EM/EM	Polaris C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm)	MS ⁿ : MeOH: água (92: 8) vazão de 0,2 mL min ⁻¹ EM/EM: MeOH: Formiato de amônio 5 mM (92: 8) vazão de 0,2 mL min ⁻¹	LD: 0,01 µg 100g ⁻¹ por CLAE-MS ⁿ e 0,02 µg 100g ⁻¹ por CLAE-EM/EM

e D3 para verificar a formação de suas respectivas pré-vitaminas. Os autores constataram que níveis mensuráveis de pré-vitamina D são rapidamente formados de acordo com a temperatura de armazenamento e ocorrem sob a mesma taxa para ambas as vitaminas, o que sustenta o uso da vitamina D2 como padrão para a análise da vitamina D3 em alimentos. No entanto, os autores frisam que este atributo é aplicado quando ambas as formas de pré-vitamina D possam ser adequadamente separadas de suas respectivas vitaminas na análise por CLAE-UV. Para chegar a este resultado, eles avaliaram a capacidade de diferentes colunas cromatográficas em alcançar uma resolução completa na separação dos picos das vitaminas D2 e D3 e suas respectivas pré-vitaminas. Para isso, os autores selecionaram 16 diferentes colunas cromatográficas analíticas de fase reversa, que foram operadas a 30 °C, utilizando acetonitrila como fase móvel em condições isocráticas. Os fluxos utilizados foram de 1,0 mL/min para as fases reversas de 5 µm (fully porous columns) and 0,7 mL/min para as fases reversas de 2.6 µm (core-shell columns). Sob estas condições, as soluções padrões foram monitoradas para as mudanças em vitamina D e pré-vitamina D. Foi utilizado o comprimento de onda de 265 nm para o monitoramento primário e os dados do espectro foram adquiridos na faixa de 200-350 nm para identificação dos picos e avaliação da pureza. Os dados obtidos indicaram que todas as 16 colunas utilizadas no estudo alcançaram uma resolução adequada na separação das vitaminas D2 e D3. No entanto, apenas

4 colunas (ACE C18, ACE C18-AR, Agilent Polaris C18-Ether e Vydac 201 TP) atingiram uma resolução completa dos 4 picos das vitaminas D2 e D3 e de suas respectivas pré-vitaminas. Os autores, no entanto, ponderam que algumas das colunas utilizadas no estudo poderiam não estar operando em condições adequadas, visto que mudanças de solventes e utilização de gradiente de eluição poderiam otimizar sua performance.

Kumar *et al.*²³ desenvolveram e apresentaram um estudo comparativo de dois métodos para deteção de vitamina D3 pela técnica de CLAE-UV com coluna de fase reversa. O objetivo dos autores foi definir um método simples, sensível e econômico para determinação da vitamina D3, de modo que pudesse ser mais prático e menos oneroso para os laboratórios de análises clínicas na Índia, já que a maioria dos métodos utiliza a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Para avaliação e comparação dos dois métodos os autores utilizaram os seguintes parâmetros: linearidade, exatidão, precisão (como reprodutibilidade e precisão intermediária), limite de deteção, limite de quantificação, eficiência e robustez. Os dois métodos cromatográficos avaliados foram: Método 1 – análise conduzida com coluna C18 (150 x 4,6 mm; 3 µm) a 40 °C, modo de eluição isocrático com fase móvel metanol: acetonitrila (95:5; v/v), vazão de 0,4 mL min⁻¹, deteção a 265 nm e tempo de corrida igual a 10 min. O tempo de retenção obtido para a vitamina D3 foi de 7,14 min; Método 2 - a única diferença em relação ao método 1 foi

a fase móvel utilizada, neste caso metanol: ácido fórmico 0,1 % em água (95:5; v/v). Para este método, o tempo de retenção da vitamina D3 foi igual a 7,01 min. De acordo com os autores, foi possível detectar a vitamina D3 com boa resolução utilizando os dois métodos apresentados. Porém, além do método dois ter apresentado maiores precisão e exatidão, o fato de não utilizar acetonitrila na fase móvel, o torna menos oneroso do que o primeiro método. Os autores destacaram ainda que a presença de ácido na fase móvel melhorou o formato do pico obtido referente à vitamina no cromatograma. Considerando todas essas observações, o método dois foi apontado pelos autores como o mais adequado para uso.

O método cromatográfico desenvolvido por Farag *et al.*²⁵ para determinação de vitamina D3 em alimentos com elevado, baixo e zero teor de gordura utilizava um sistema de CLAE-UV usando comprimento de onda de 264 nm, coluna ACE 5 C18-300 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) com um cartucho de proteção C18 à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi metanol:acetonitrila (50:50, v/v) com vazão de 1 mL.min⁻¹ em modo isocrático, volume de injeção igual a 20 µL e tempo de corrida de 7 min. A quantificação foi realizada por padronização externa, sendo preparada curva analítica com solução padrão obtida a partir da diluição de 1 mg de padrão de vitamina D3 com metanol. Os autores classificaram o método apresentado como favorável em comparação com outros já existentes na literatura, por conta da sua estabilidade, tempo de execução curto e ampla faixa analítica com excelente linearidade, exatidão e precisão, sendo apropriado para a análise de rotina de diversas matrizes alimentícias.

Em termos analíticos, a CLAE-EM tem conquistado notoriedade devido à sua superior sensibilidade e especificidade. No entanto, a pouca eficiência na ionização por ionização sob pressão atmosférica (API) das várias formas da vitamina D tem sido uma desvantagem. Para contornar essa desvantagem, um procedimento de derivatização baseado em reação Diels-Alder tem sido introduzida para aumentar a eficiência e a sensibilidade nas determinações de vitamina D. A derivatização pré-coluna com 4-fenil-1,2,4-triazolina-3,5-diona (PTAD) tem se mostrado uma estratégia eficaz para a análise dos compostos minoritários da vitamina D, cujas concentrações são muito baixas para serem detectadas por métodos padrões de CLAE-EM, amostras reduzidas como os fluidos biológicos neonatais¹⁰.

Trenerry *et al.*²⁸ apresentaram um comparativo de dois métodos cromatográficos para determinação de vitamina D3 e seus metabólitos em leite, um por CLAE-MSⁿ e outro por CLAE-EM/EM. No método CLAE-MSⁿ foi utilizado detector de armadilha de íons (do inglês *ion trap*) com ionização química em pressão atmosférica em modo positivo (APCI+) no sistema Agilent® series 1100 acoplado ao espectrômetro de massas Thermo Electron ITQ®. Um protocolo de varredura completo (3-10 min) com uma faixa de 150-800 m/z foi usada para 25-hidroxivitamina D3,

(m/z 401). Três eventos de varredura (10-26 min) foram usados para vitamina D3 (m/z 385,5) e vitamina D3-[2H3] (m/z 388,5). A primeira varredura foi uma varredura completa de m/z 150-800 amu. Para a segunda varredura a m/z 385,5 foi isolada e fragmentada para m/z 367,4 e m/z 259. Para o terceiro evento de varredura, a m/z 388,5 foi isolada e fragmentada em m/z 370,4. O método CLAE-EM/EM utilizou ionização por eletronebulização em modo positivo (ESI+) no sistema Waters Alliance HT 2795® acoplado ao espectrômetro de massas de quadrupolo sequencial Quattro Micro®. Neste sistema os analitos foram separados com o mesmo tipo de coluna cromatográfica, fase móvel e vazão, com a exceção da adição de formiato de amônio 5mM na fase. Para a quantificação foram utilizadas as seguintes transições no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM): Vitamina D3 m/z 385,2 → 107; 159,2; 259,4; Vitamina D3- [2H3] m/z 388,3 → 110; 162,2; 259,4; 370,4; 25-hidroxivitamina D3 m/z 401,2 → 105, 159 e 383.

Os autores observaram que os espectrômetros de massas de armadilha de íons (LC-MSⁿ) cobrem uma faixa de massa m/z semelhante aos espectrômetros de massas sequenciais e também podem operar no modo de varredura total em altae baixa resolução. A principal vantagem dos instrumentos LC-MSⁿ é a capacidade de executar etapas sucessivas de fragmentação, o que fornece mais informações estruturais do que outros analisadores de massas. No entanto, a sensibilidade dos espectrômetros tradicionais de massa de armadilha de íons 3D é de uma ordem de magnitude menor que os espectrômetros de massa sequenciais. O novo espectrômetro de massa de armadilha de íons linear exibe sensibilidade que se aproxima da dos espectrômetros de massa sequenciais que são usados rotineiramente nos laboratórios de análises. Nesse estudo, os limites de detecção para a vitamina D3 foram de 0,01 µg.100g⁻¹ por CLAE-MSⁿ e 0,02 µg.100g⁻¹ por CLAE-EM/EM.²⁸ As condições cromatográficas estão na Tabela 1.

Gomes *et al.*¹⁰ otimizaram a derivatização com PTAD aumentando a sensibilidade de 7 a 70 vezes para as 4 formas majoritárias e 1 minoritária de vitamina D em fluidos biológicos, quantificando 8 análogos da vitamina D: D2 e D3, seus metabólitos 25-hidroxi D2 e D3; 24,25-dihidroxi D2 e D3; 1,25-dihidroxi D2 e D3, além da provitamina 7-deidrocolesterol (7-DHC). Os efeitos de matriz foram eliminados usando coeluição de padrão interno marcado com isótopo estável para cada um dos 8 análogos e para a calibração. A identificação e a quantificação foram feitas por CLAE-EM/EM num sistema triplo quadrupolo da Agilent® com ionização por eletronebulização em modo positivo (ESI+). A detecção ocorreu no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM): D2, m/z 397→83; D3, m/z 385→159; 25(OH) D2, m/z 412→83 e 25(OH) D3 e 3-epi-25(OH) D3, m/z 401→159. O método foi validado e posteriormente aplicado para dosagem de vitamina D total em amostras de leite humano, de vaca, égua, cabra e ovelha. Os limites de detecção, desvio padrão e as faixas de

recuperação variaram de 0,2 a 0,4 fentomols, 6,30 a 13,5% e 88,2 a 105%, respectivamente.

Viñas *et al.*²² desenvolveram um método simples para análise por CLAE-DAD e APCI-EM para a detecção simultânea de ergocalciferol (D2), colecalciferol (D3) filloquinona (K1), menaquinona (K2) e uma forma sintética da vitamina K, a menadiona (K3). O sistema CLAE EM utilizado por Viñas *et al.*²² foi o Agilent 1200®. O espectrômetro de massas foi o ion-trap (1036) equipado com interface APCI operando no modo negativo por 8 min (SIM) foi usado para m/z 172 de 0 a 8 min (K3) e no modo positivo para m/z 445 de 8 a 10,6 min (K2), m/z 397 de 10,6 a 12,3 min (D2), m/z 385 de 12,3 a 13,1 min (D3) e m/z 451 de 13,1 a 16 min (K1). A protonação de vitaminas lipossolúveis é muito difícil e a sensibilidade obtida por ionização por eletronebulização (ESI) foi muito baixa. Por essa razão, os autores²² escolheram a APCI para a ionização porque as vitaminas D e K são neutras e não-voláteis com polaridade baixa, o que proporciona sinais intensos no APCI. O modo de ionização foi otimizado testando uma varredura completa para cada um dos analitos de onde a sensibilidade máxima foi obtida operando em modo negativo para a vitamina D3 e em modo positivo para as demais vitaminas, que mostraram a molécula protonada $[M+H]^+$ como pico base. A otimização dos valores de m/z foi alcançada usando o modo SIM. O espectro de massas da vitamina D2 gerou uma molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 397, um fragmento devido à perda de uma molécula de água $[MH-H_2O]^+$ em m/z 379, e o fragmento em m/z 271, correspondente à perda da cadeia lateral. O espectro da vitamina D3 contém a molécula protonada em $[M+H]^+$ em m/z 385, o íon molecular protonado desidratado $[MH-H_2O]^+$ em m/z 367. Porém, os íons protonados no APCI (+) usados m/z 397 de 10,6 a 12,6 min (D2) em/z 385 de 12,3 a 13,1 min (D3) foram mais intensos e com maior sinal/ruído que em todas as outras vitaminas. Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação foram respectivamente, 3,1 e 10 ng mL⁻¹ (D2) e 4,0 e 13,0 ng.mL⁻¹ (D3).

Mandrioli *et al.*²⁶ avaliaram o teor de vitamina D3 em amostras de leite utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de bomba quaternária acoplado a um espectrômetro de massas e um detector de arranjo de diodos (CLAE-EM-DAD), utilizando a vitamina D2 como padrão interno. As vitaminas D2 e D3 tiveram suas identidades confirmadas por espectrometria de massas com fonte de eletronebulização positiva (ESI+), onde foram observados, respectivamente, seus íons moleculares de razão m/z igual a 397,65 e 385,01. A análise quantitativa foi conduzida com o DAD a 265 nm. Utilizou-se coluna cromatográfica C30 (250 × 4,6 mm; 5 µm), pré coluna com a mesma fase estacionária (10 × 4,0 mm), ambas a 50 °C, modo de eluição isocrático com fase móvel metanol:água (96:4, v/v), vazão de 1 mL min⁻¹ e volume de injeção de 50 µL. As análises realizadas permitiram aos autores determinar o teor de vitamina D3 nos diferentes tipos de leite de vaca estudados, onde constataram que os leites

classificados como de alta qualidade não apresentaram teor desta vitamina superior ao do leite convencional consumido na Itália. Observaram também que em alguns casos o leite pasteurizado apresentou maior teor de vitamina D3 do que o cru. Tais informações, de acordo com os autores, não haviam ainda sido relatadas na literatura, sendo as mesmas consideradas muito importantes para o poder de escolha dos consumidores locais.

Em seu estudo, Kwak *et al.*²⁷ usaram a técnica de CLAE-EM/EM. O espectrômetro de massas operou com fonte por eletronebulização em modo positivo (ESI+). O íon precursor para a vitamina D3, cujo tempo de retenção foi 10,7 min, é o m/z 385, os íons produto qualitativos foram m/z 259 e 159 e o íon produto quantitativo foi o m/z 107. Foi detectado um fragmento de m/z 367, como o maior dos produtos detectados da fragmentação do íon precursor 385, porém pouco estável. Este método teve limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção do método (MDL) determinados para a vitamina D3 de 0,396 ug kg⁻¹, 1,307 ug kg⁻¹ e 0,84 ug kg⁻¹, respectivamente. Os valores são muito próximos dos LOQ e MDL do método oficial AOAC, que são 1,68 ug kg⁻¹ e 0,6 ug kg⁻¹, respectivamente, que possui mais etapas e maior tempo de preparo²⁷.

Padrões de vitamina D deuterada são comumente usados como padrões internos na análise LC-MS/MS de vitamina D3 e 25-hidroxitamina D3 nos alimentos. No entanto, o uso de vários aditivos eluentes, como metilamina, ácido fórmico e formato de amônio, também contribui para os efeitos de matriz e o desempenho da análise, afetando precisão e robustez. No trabalho de Svarc *et al.*³¹, pela primeira vez, experimentos contínuos de infusão pós-coluna de vitamina D3-[d6] marcada isotopicamente foram realizados para avaliar a supressão de íons em uma ampla variedade de alimentos (salmão, queijo, gordura de porco, carne de porco e gema de ovo). Os autores relataram com sucesso o uso de um padrão interno estável isotopicamente marcado (deuterado) em um experimento de infusão pós-coluna, quando uma matriz em branco não está disponível. Usando infusão pós-coluna, puderam avaliar o efeito que diferentes aditivos dos eluentes (metilamina/ácido fórmico, formiato de amônio/ácido fórmico e formiato de amônio) têm na supressão de íons em extratos de diferentes matrizes de alimentos. Apesar de uma preparação completa da amostra consistindo em saponificação, LLE, SPE e derivatização com PTAD, observaram uma enorme quantidade de supressão de íons, o que influencia na abundância de vit D3.

Os resultados coletados usando cinco métodos analíticos, empregando DAD/UV e detectores MS/MS foram avaliados com materiais de referência internos (salmão, queijo, gordura de porco, carne de porco e gema de ovo) e padronizados (leite em pó integral, homogeneizado de carne e ovo inteiro em pó). O efeito de matriz foi significativo ao analisar a vitamina D3 na maioria das matrizes alimentares usando o padrão interno marcado com deutério. Devido ao seu tempo de retenção mais curto, o padrão interno de vitamina D3

deuterado não pode eliminar totalmente o efeito de matriz ao analisar a vitamina D₃ na maioria dos alimentos. Em contraste, os padrões internos de carbono marcados isotopicamente, vit D₃-[d₆], permitiram eluição simultânea de vitamina D₃ e 25(OH)D₃ e seus correspondentes padrões internos, resultando em recuperações de 100% e uma cromatografia robusta. Os materiais de referência internos mostraram uma consistência no nível de vitamina D usando detecção de UV-DAD e detecção de MS/MS. Embora o uso do padrão interno marcado com ¹³C₅ reduza os efeitos da matriz, é necessário um método padronizado para acordar sobre o verdadeiro valor da vitamina D nos alimentos, especialmente para carnes e ovoprodutos.³¹

As condições cromatográficas dos métodos encontram-se na Tabela 1.

5. Considerações Finais

Os artigos de revisão de métodos analíticos proporcionam um panorama atualizado das técnicas existentes e dessa forma facilitam a atividade dos analistas, uma vez que neles são relatadas as etapas de otimização para a implantação de um método, e os resultados obtidos, tanto os positivos quanto os negativos. Dessa forma, economiza-se tempo e evita-se trabalho e gastos desnecessários.

Na maioria dos trabalhos aqui citados, os autores afirmam a necessidade de métodos padronizados para a análise de vitamina D em alimentos, especialmente para a análise de vitamina D de ocorrência natural, que depende da eficácia do método de extração. Também é necessária a existência de materiais de referência certificados (MRC) para essa análise em matrizes alimentares, incluindo a validação de medições para a vitamina D endógena e outras formas desta vitamina.

A análise de vitamina D por CLAE-EM tem se mostrado eficaz pela maior seletividade e sensibilidade, permitindo identificação e quantificação dos metabólitos. Porém os métodos por detecção por UV e fluorescência ainda sejam bastante usados devido aos altos custos de aquisição e manutenção de um espectrômetro de massas.

Referências Bibliográficas

- Phillips, K. M.; Byrdwell, W. C.; Exler, J.; Harnly, J. M.; Holden, J. M.; Holick, M. F.; Hollis, B. W.; Horst, R. L.; Lemar, L.E.; Patterson, K. Y.; Tarrago-Trani, M. T.; Wolf, W. R.; Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D₃ in selected US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 527. [[Crossref](#)]
- Lim, K.; Thadhani, R.; Vitamin D Toxicity. *Brazilian Journal of Nephrology*, **2020**, *42*, 238. [[Crossref](#)]
- Hiemstra T.; Lim K.; Thadhani R.; Manson JE.; Vitamin D and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **2019**, *104*, 403. [[Crossref](#)]
- Guerra, V.; Viera Neto; O.M, Laurindo, A.F.; Paula, F. J.; Moyses Neto, M.; Hypercalcemia and renal function impairment associated with vitamin D toxicity: case report. *Brazilian Journal of Nephrology* **2016**, *38*, 466. [[Crossref](#)]
- Chagas, S. C. C.; Moreira, F.S. M.; Barbosa, I.C.F.; Leal Júnior, O. S.; Leal, L. B.; Santana, D. P.; Critical analysis on the use of cholecalciferol as a COVID-19 intervention: a narrative review. *São Paulo Medical Journal* **2021**, *139*, 81. [[Crossref](#)]
- LIPS, P. Vitamin D physiology. *Biophysics & Molecular Biology*, **2006**, *92*, 4. [[Crossref](#)] [[Pubmed](#)]
- Preamor, M.O.; Furlaneto, T.W.F. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabolologia* **2006**, *50*, 25. [[Crossref](#)]
- CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolologia* **2011**, *55*, 566. [[Crossref](#)]
- JÄPELT, R.B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **2013**, *4*, 136. [[Crossref](#)] [[Pubmed](#)]
- GOMES, F.P.; SHAW, P.N.; WHITFIELD, K.; HEWAVITHARANA, A.K. Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *891*, 211. [[Crossref](#)]
- OVESEN, L., BROT, C., JAKOBSEN, J., Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Annals of Nutrition and Metabolism* **2003**, *47*, 107. [[Crossref](#)] [[Pubmed](#)]
- ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B.; Leite para Adultos - Mitos e Fatos Frente à Ciência, 1a. ed., Varela: São Paulo, 2009, p. 222.
- AOAC, 2007b. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Method 992.26—Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in Ready-to-Feed Milk-Based Infant Formula, 18th ed. Gaithersburg, MD.
- AOAC, 2007c. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Method 995.05—Vitamin D in Infant Formulas and Enteral Products, 18th ed. Gaithersburg, MD.
- AOAC, 2007d. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Method 2002.05—Determination of cholecalciferol (vitamin D₃) in selected foods, 18th ed. Gaithersburg, MD.
- AOAC, 2007a. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Method 982.29—Vitamin D in Mixed Feeds, Premixes, and Pet Foods, 18th ed. Gaithersburg, MD.
- CHEN, T.C., TURNER, A.K., HOLICK, M.F. A method for the determination of the circulating concentration of vitamin D. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1990**, *1*, 272. [[Crossref](#)] [[Pubmed](#)]
- HOLLIS, B.W.; Em *Vitamin D*; Feldman, D., Pike, J., Glorieux, F., eds.; Elsevier: San Diego, 2005, cap.58.
- JAKOBSEN, J., CLAUSEN, I., LETH, T., OVESEN, L., A new method for the determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in meat. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, *17*, 777. [[Crossref](#)]

20. MATTILA, P.H., PIIRONEN, V.I., EUUSI-RAUVA, E.J., KOIVISTOINEN, P.E. Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol contents of fish and fish products. *Journal of Food Composition and Analysis* **1995**, *8*, 232. [[Crossref](#)]
21. MATTILA, P., LAMPI, A.-M., RONKAINEN, R., TOIVO, J., PIIRONEN, V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry* **2002**, *76*, 293. [[Crossref](#)]
22. VIÑAS, P.; BRAVO-BRAVO, M.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode-array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection. *Talanta* **2013**, *115*, 806. [[Crossref](#)]
23. KUMAR, S.; CHAWLA, D.; TRIPATHI, A.K. An improved and sensitive method for vitamin D3 estimation by RP-HPLC. *Pharmaceutica Analytica Acta* **2015**, *6*, 6. [[Crossref](#)]
24. GENTILI, A., CARETTI, F., BELLANTE, S., Ventura, S., CANEPARI, S., CURINI, R. Comprehensive Profiling of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Milk from Different Animal Species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1628. [[Crossref](#)]
25. FARAG, A.M.; RIZK, M.S.; EL-BASSEL, H.A.; YOUSSEF, M.H. Determination of vitamin D3 content in high, low and zero fat food using high performance liquid chromatography. *Medical Journal of Cairo University*, **2018** *86*, 3911. [[Link](#)]
26. MANDRIOLI, M.; BOSELLI, E.; FIORI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Vitamin D3 in high-quality cow milk: an Italian case study. *Foods* **2020**, *9*, 548. [[Crossref](#)]
27. KWAK, B.-M.; JEONG, I.-S.; LEE, M.-S.; AHN, J.-H.; PARK, J.-S. Rapid determination of vitamin D₃ in milk-based infant formulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *165*, 569. [[Crossref](#)]
28. TRENNERY, V. C., PLOZZA, T., CARIDI, D., MURPHY, S. The determination of vitamin D3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* **2011**, *125*, 1314. [[Crossref](#)]
29. RAKUSA, J.T., SRECNİK, E., ROSKAR, R. Novel HPLC-UV Method for simultaneous determination of Fat-soluble Vitamins and Coenzyme Q10 in Medicines and Supplements. *ACTA Chim. Slov* **2017**, *64*, 523. [[Crossref](#)] [[Pubmed](#)]
30. WOOLLARD, D.C.; INDYK, H.R.; GILL, B.D. Significance of previtamin D chromatographic resolution in the accurate determination of vitamin D₃ by HPLC-UV. *Journal of Food Composition and Analysis* **2019**, *79*, 1. [[Crossref](#)]
31. SVARC, P. L., BARNKOB, L. L., JAKOBSEN J. Quantification of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in food – The impact of eluent additives and labelled internal standards on matrix effects in LC-MS/MS analysis. *Food Chemistry* **2021**, *357*, 129588. [[Crossref](#)]