

Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D₃ y E en inyectables de uso veterinario

Noralba Sierra¹, Jaime H. Rojas^{1*}, Yvonne Cuadra¹, Andrea Sisa¹, Gloria Castro²

¹Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, ²Instituto Colombiano Agropecuario ICA

Se presentan en este artículo los resultados del desarrollo y de la validación de una metodología analítica para la cuantificación simultánea de vitamina A palmitato, vitamina D₃ y vitamina E acetato en inyectables de uso pecuario. El procedimiento consiste en una separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase inversa empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, metanol, agua (45:50:2.5), una columna C₁₈ a 45 °C y detección a una longitud de onda de 280 nm. Se encontró que el método es selectivo, lineal y preciso. Estas características junto con su sencillez hacen que el método sea adecuado y conveniente para el objetivo propuesto. La robustez de la metodología fue también investigada. El método validado se aplicó para la determinación de las vitaminas en tres productos inyectables del mercado colombiano con registro sanitario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Unitérminos:

- Vitamina A palmitato/ determinación
- Vitamina D₃/ determinación
- Vitamina E acetato/ determinación
- Cromatografía líquida de alta eficiencia
- Detección ultravioleta
- Inyectables/de uso veterinario/análisis cuantitativo.

*Correspondencia:

J. H. Rojas
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia
A.A. 14490
Bogotá - Colombia
E-mail: jhrojasb@unal.edu.co

INTRODUCCION

Las vitaminas son compuestos de naturaleza orgánica requeridos por los seres vivos en pequeñas cantidades y contribuyen al completo desarrollo de las funciones fisiológicas en los organismos vivos. Su deficiencia puede generar una serie de reacciones adversas para los seres vivos (Goodman, 2003). Su uso, como ocurre con el hombre, está bastante extendido en la crianza de animales para mejorar la producción de insumos así como para prevenir o curar algunas enfermedades en diferente especies animales como resultado de su deficiencia. La técnica de análisis de elección y más reportada por la literatura para la determinación de vitaminas es la técnica cromatográfica, gaseosa y de líquidos, principalmente esta última, utilizando la modalidad de fase

normal con columnas de sílica (Escriba *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2003) como en fase inversa, con columnas tradicionales C₁₈ o con columnas monolíticas (Tanaka *et al.*, 2002). Spencer y Purdy (1997) separaron las vitaminas D₂, D₃ y E acetato utilizando metanol-agua (90:10) como fase móvil adicionada de betaciclodextrina y una columna C₁₈. La misma fase estacionaria fue utilizada por Ceugni *et al.* (1998) para la separación y determinación de vitamina A y vitamina E utilizando como fase móvil una mezcla de metanol-agua (99:1). Utilizando metanol como fase móvil y una columna C₁₈, Qian y Sheng (1998) separan retinol acetato, vitamina D₃, vitamina E y provitamina D₂, utilizando una longitud de onda de 290 nm para la detección. Albalá-Hurtado *et al.* (1997) reportan la separación de vitamina A - *trans*-retinol y vitamina E - α -tocoferol sobre una columna C₁₈ utilizan-

do como fase móvil agua-acetonitrilo-metanol (4:1:95). La revisión de la literatura permite observar que la detección espectrofotométrica al ultravioleta es la más utilizada, aunque también se ha reportado el empleo de otros sistemas como detección fluorométrica (Collins, Chow, 1984; Gatti *et al.*, 2001) y amperométrica (Wang, Wang, 2001; Taibi, Nicotra, 2002). Brisaert y Vercaemmen (1999) emplean la densitometría con cromatografía en capa delgada sobre placas C_{18} de alta eficiencia para el análisis de tetrinoína en lociones. La determinación de vitamina A y vitamina E en productos pediátricos por CLAE en fase inversa fue reportada por Rodas *et al.* (2003). Otros investigadores reportan para el análisis de vitaminas oleosolubles el empleo de dodecil sulfato de sodio en cromatografía capilar electrocinética (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2002) y cromatografía líquida micelar (Momenbeik *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método de análisis cuantitativo para vitamina A palmitato, vitamina D_3 y vitamina E acetato por CLAE en fase inversa, empleando una columna de 3.9x300 mm con octadecilsilano como fase estacionaria y detección por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm.

MATERIAL Y METODOS

Equipos y materiales

Cromatógrafo líquido Waters 510, detector UV Waters Ass. 484, integrador Perkin Elmer LCI 100, inyector Rheodyne 20 microlitros, columnas μ Bondapak C_{18} 3,9x300 mm, 5 μ m y C_8 3,9x150 mm, 5 μ m, baño ultrasónico Branson 3210, espectrofotómetro UV/VIS Unicam UV2, cromatógrafo líquido Waters Milenium 32 con detector de arreglo de diodos.

Sustancias y reactivos

Vitamina A palmitato estándar USP, vitamina D_3 estándar USP, vitamina E acetato estándar USP, metanol y acetonitrilo HPLC Mallinckrodt, agua HPLC, butanol JT Baker RA, isopropanol JT Baker RA, tetrahidrofurano JT Baker RA y *n*-propanol JT Baker RA.

Muestras

Los productos inyectables comerciales analizados bajo las condiciones de la metodología analítica validada presentaban la composición indicada en el Cuadro 1. Las diluciones necesarias para su análisis final se realizaron con la fase móvil, procurando concentraciones finales

aproximadas de las vitaminas y cercanas a las concentraciones de los estándares de las vitaminas. Estas concentraciones fueron 120 UI/mL, 2 UI/mL y 70 μ g/mL para las vitaminas A palmitato, D_3 y E acetato, respectivamente.

CUADRO 1 – Composición de los productos inyectables analizados

Vitamina	Producto 1	Producto 2	Producto 3
A palmitato	500000 UI/mL	600000 UI/mL	500000 UI/mL
E acetato	50 mg/mL*	100 mg/mL	50 mg/mL*
D_3	—	75000 UI/mL	2000 UI/mL
Aceite csp	1 mL	1 mL	1 mL

*Agregada como antioxidante

Optimización del sistema cromatográfico

Para la estandarización de la metodología analítica se realizaron varios y diferentes ensayos en procura de obtener las mejores condiciones cromatográficas para la determinación de las vitaminas objeto del estudio. Se contemplaron principalmente aspectos relacionados con la influencia de la longitud de onda de la detección, el tipo de columna, la composición y flujo de la fase móvil y la temperatura de la separación. Para la selección de la longitud de onda se realizaron los espectros de absorción de las vitaminas en una mezcla de metanol y agua (94:6), una de las mezclas ensayadas en la selección de la fase móvil. De acuerdo a los espectros obtenidos se seleccionó 280 nm como longitud de onda para la detección cromatográfica de las vitaminas. Durante el proceso de selección de la fase móvil se estudiaron, de acuerdo a la literatura, diferentes mezclas de metanol-agua, acetonitrilo-metanol-agua, metanol-agua-tetrahidrofurano y metanol-agua-isopropanol-tetrahidrofurano, y flujos de 0,9, 1,0, 1,3 y 1,5 mL/min. En cuanto a la temperatura de la fase estacionaria se realizaron ensayos a 25, 35 y 45 °C. Para los ensayos anteriores se utilizaron dos diferentes tipos de columna, μ Bondapak C_8 de 3,9x150 mm y C_{18} de 3,9x300 mm. Como volumen de inyección se utilizó en todos los casos 20 μ L.

Las soluciones patrón de las vitaminas se prepararon en *n*-butanol, mientras que las diferentes diluciones para alcanzar las concentraciones adecuadas para el proceso cromatográfico se realizaron con la fase móvil.

Parámetros de idoneidad del sistema

Como paso previo al proceso de validación, se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema cromatográfico. Como parámetros de idoneidad, se evalua-

ron el factor de capacidad, el factor de separación o índice de retención relativa, la resolución y el factor de asimetría. Los valores hallados satisfacen los requerimientos generalmente aceptados (Tabla I). La resolución se calculó con referencia al producto de degradación más cercano para cada vitamina.

TABLA I – Parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico

Parámetro	Vitamina A	Vitamina D ₃	Vitamina E
Factor de capacidad (>2)	3,96	5,07	11,46
Factor de separación (>1)	3,66	1,15	1,19
Resolución (>1,5)	2,90	2,31	8,2
Factor de asimetría (<2)	1,1	1,1	1,2

RESULTADOS Y DISCUSION

En la selección de la fase móvil y utilizando diferentes combinaciones de ésta desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, diferentes flujos, diferente columna y diferente temperatura, se obtuvieron resultados variables con cada una de ellas. Los resultados se analizaron principalmente desde tres puntos de vista, selectividad, simetría de las señales y tiempo de corrida. En algunos casos la separación o resolución de las señales debidas a las vitaminas no fue adecuada, en otros casos las señales fueron asimétricas, mientras que en otros los tiempos de corrida para una separación adecuada fueron demasiado altos. Por ejemplo, con una fase móvil metanol-agua 95:5, columna C₁₈, 1,5 mL/min y 45 °C, se obtuvieron señales simétricas, adecuada resolución pero con un tiempo de corrida de 35 minutos. Otras fases móviles estudiadas estaban compuestas por mezclas de metanol y agua en proporciones 99:1, 96:4, 94:6, 95:5 y 90:10 con columnas C₈ o C₁₈ y tempera-

TABLA II - Condiciones optimizadas para la determinación de vitaminas A palmitato, D₃ y E acetato

Parámetro	Condiciones estandarizadas
Columna	µBondapak C ₁₈ 3,9 x 300 mm
Longitud de onda	280 nm
Temperatura	45 °C
Fase móvil	CH ₃ CN-MetOH-H ₂ O (45:50:2.5)
Flujo	1,5 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

turas de 25, 35 y 45 °C. En otras, se incluyó un tercer componente, bien tetrahidrofurano, acetonitrilo o isopropanol.

De acuerdo con los diferentes ensayos realizados, se establecieron para la validación las siguientes condiciones cromatográficas (Tabla II).

Con el sistema anterior los tiempos de retención para las tres vitaminas fueron aproximadamente 6,1, 7,9 y 16,6 minutos para la vitamina D₃, vitamina E acetato y vitamina A palmitato, respectivamente.

Validación de la metodología analítica

Selectividad

La selectividad del método para las tres vitaminas con la fase móvil óptima se indica en el cromatograma obtenido con una mezcla de ellas (Figura 1), donde se observa que la resolución es adecuada. El estudio se realizó con concentraciones aproximadas de 120 UI/mL, 2 UI/mL y 70 µg/mL para cada una de las tres vitaminas, A, D₃ y E, respectivamente.

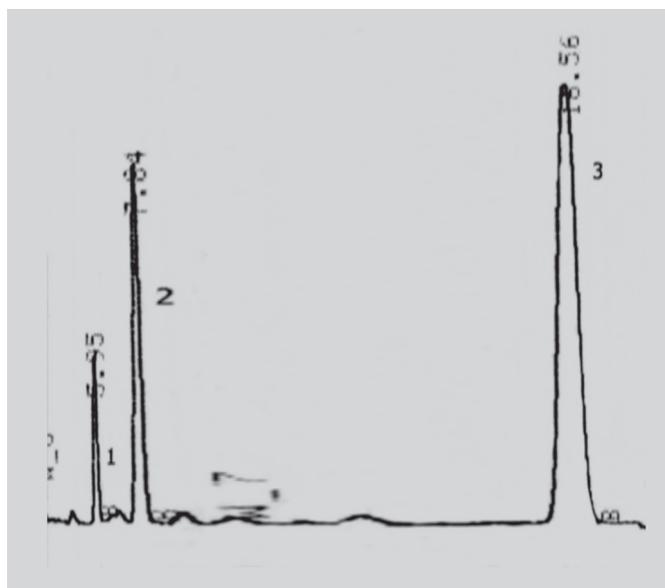


FIGURA 1 - Cromatograma obtenido para las vitaminas D₃ (1, t_R=5,95), E acetato (2, t_R=7,84) y A palmitato (3, t_R=18,56), bajo las condiciones estandarizadas.

La misma mezcla de las vitaminas se sometió a la acción de la luz y del aire para su análisis al cabo de 20 días. En los dos casos, los resultados demostraron la ausencia de interferencia de los productos de descomposición obtenidos en la determinación de cada una de las tres vitaminas. En la Figura 2 se presenta el cromatograma obtenido en el caso de la exposición de la mezcla durante 20 días a la luz natural.

Por otra parte, los cromatogramas obtenidos con la

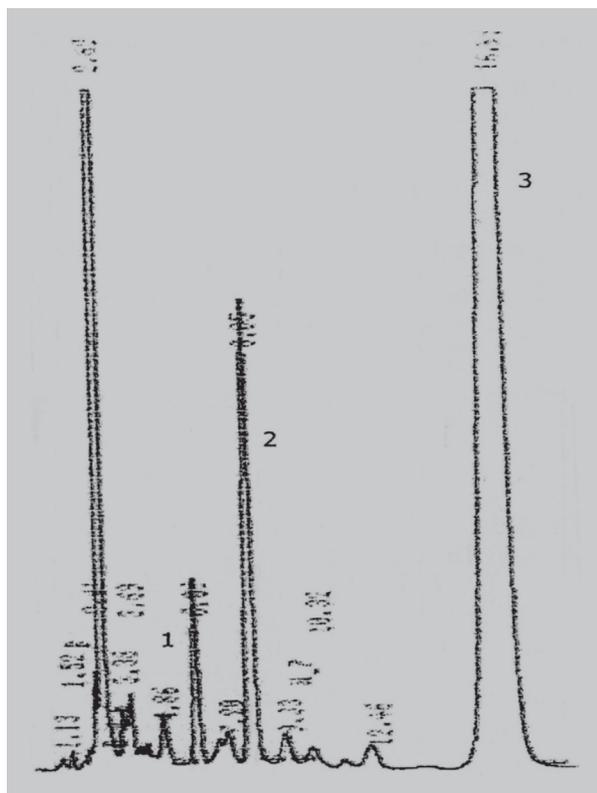


FIGURA 2 - Cromatograma obtenido para las vitaminas D₃ (1), E acetato (2) y A palmitato (3) luego de exposición por 20 días a la luz del día.

matriz oleosa de cada uno de los tres productos evaluados no indican ninguna clase de interferencia con los tiempos de retención de las señales debidas a cada una de las vitaminas.

Linealidad

La proporcionalidad en la respuesta para la vitamina A palmitato se verificó con concentraciones entre 180,0 a 450,0 UI/mL, observándose la falta de proporcionalidad por arriba de 200,0 UI /mL. Por lo anterior se estudiaron 5 niveles de concentración entre 80,0 y 160,0 UI/mL, mediante el trabajo con tres réplicas, tanto para el sistema como para el método.

En esta parte del estudio, para la vitamina D₃ se utilizaron concentraciones entre 0,5 y 3,0 UI/mL y entre 48,0 y 117,0 µg/mL para la vitamina E acetato. En los dos casos se trabajaron igualmente 5 niveles de concentración y tres réplicas para cada nivel.

En la Tabla III se indican las ecuaciones de las recetas de regresión obtenidas para las tres vitaminas, tanto para el sistema como para el método.

Los límites superior (LS) e inferior (LI), calculados de acuerdo al error estándar para el intercepto y para la pendiente en el estudio de linealidad del sistema y en el estudio de linealidad del método se indican en la Tabla IV. Los valores experimentales de t, confrontados con los valores de la tabla, indican en todos los casos convergencia al

TABLA III - Ecuaciones de regresión para vitamina A palmitato, vitamina D₃ y vitamina E acetato

Vitamina	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación
A palmitato	Sistema $Y = 13762,62 X + 88464,5$	$r = 0,9917$
	Método $Y = 14752,79 X + 10273,4$	$r = 0,9907$
D ₃	Sistema $Y = 27804,13 X + 1089,7$	$r = 0,9915$
	Método $Y = 29321,42 X + 865,5$	$r = 0,9940$
E acetato	Sistema $Y = 3189,89 X - 4522,2$	$r = 0,9904$
	Método $Y = 2913,77 X + 94,28,0$	$r = 0,9964$

TABLA IV - Valores de intercepto y pendiente para la linealidad del sistema y del método¹

Vitamina	Parámetro	Sistema			Método		
		t exp	LS	LI	t exp	LS	LI
A palmitato	Intercepto	1,45	220422,1	-43493,2	0,15	161117,9	-140571,1
	Pendiente	27,78	14832,9	12692,3	26,28	15965,5	15340,0
D ₃	Intercepto	0,516	5648,9	-3469,5	0,46	4885,6	-3172,6
	Pendiente	27,48	29989,9	25180,2	32,70	31253,2	27389,6
E acetato	Intercepto	-0,42	18644,4	-27688,8	0,50	50125,0	-31269,0
	Pendiente	25,45	3460,6	2919,1	13,56	3378,2	2449,4

¹ t tabulado (gl=13, $\alpha=0,05$): 2,1604

t exp: valor de t experimental, LS: límite superior, LI : límite inferior

origen y un valor de pendiente significativamente diferente de cero. Se observa además que el valor cero se encuentra dentro de los límites calculados para el intercepto.

Los valores de F experimentales en los ensayos de linealidad del método indican una regresión altamente significativa en todos los casos (Tabla V).

De acuerdo a los resultados, los valores experimentales de F hallados para la regresión en los seis casos son mayores que el valor F de la tabla (4,76), con lo cual se concluye que la regresión es estadísticamente significativa. De otra parte, los valores experimentales para el desvío o falta de ajuste con menores al valor la tabla (3,71) indicando así que el desvío no es significativo.

Precisión

Los resultados obtenidos a nivel de repetibilidad condujeron a valores de coeficientes de variación de 0,63, 1,13 y 0,81% para la vitamina A palmitato, vitamina D₃ y vitamina E acetato, respectivamente. Estos valores son inferiores a 2, valor normalmente aceptado para la precisión e indican una adecuada repetibilidad. La precisión como precisión intermedia se evaluó entre días (tres días) y entre analistas (dos analistas), para tres concentraciones, equivalentes al 80, 100 y 120%. En la Tabla VI se reportan los valores de F experimentales obtenidos mediante el análisis de varianza de los resultados.

El análisis de varianza permite concluir que no hay diferencias de los resultados entre días, entre analistas, ni entre réplicas. Por supuesto, se encontró diferencia significativa entre concentraciones.

Robustez

La robustez de la metodología se estableció realizando pequeñas variaciones en algunos parámetros del método como temperatura, fase móvil, tiempo de inyección y longitud de onda. En la Tabla VII se reportan los resultados obtenidos con la vitamina A palmitato. Se observa que la diferencia calculada entre la media de las áreas obtenidas cuando el parámetro se encontraba en el nivel nominal o estandarizado (denominado valor superior) y la media de las áreas obtenidas cuando se encontraba en el nivel alternativo o nuevo valor (denominado valor inferior) fue mayor de 21058,5, valor que corresponde a la diferencia del producto de la desviación estándar de la precisión del método por la raíz cuadrada de 2 para los factores flujo y longitud de onda y menor para los otros tres factores (Quattrochi *et al.*, 1992). Para la vitamina A palmitato, se concluye de esta forma que el método es sólido frente a las variaciones realizadas de temperatura, composición de la fase móvil y tiempo de análisis. Por el contrario, los factores flujo y longitud de onda son críticos y merecen especial atención y control cuando se aplique la metodología en análisis de rutina.

TABLA V - Valores de F experimentales, Anova de la regresión lineal

Fuente	Vitamina A		Vitamina D ₃		Vitamina E	
	Sistema	Método	Sistema	Método	Sistema	Método
Regresión	771,69	890,67	755,08	1075,26	647,84	183,77
Desvío	2,60	1,94	1,42	0,07	3,32	1,04

F tabulado regresión ($gl_1/gl_2 = 1/13$, $\alpha = 0,05$): 4,70

F tabulado desvío ($gl_1/gl_2 = 3/10$, $\alpha = 0,05$): 3,71

TABLA VI - Valores experimentales de F para la precisión intermedia

Fuente	gl	Vitamina A	Vitamina D ₃	Vitamina E	F tab ¹
Analistas	1	2,42	0,22	1,22	4,18
Días	2	2,17	1,67	2,39	3,33
Concentraciones	2	935,82	12852,23	1376,45	3,33
Réplicas	1	0,01	1,32	1,12	4,18

¹ F tabulado analistas y réplicas ($gl_1/gl_2 = 1/29$, $\alpha = 0,05$): 4,18

F tab días y concentraciones ($gl_1/gl_2 = 2/29$, $\alpha = 0,05$): 3,33
grados de libertad del error = 29 (gl_2)

En el caso de las otras vitaminas, los valores de comparación hallados para la vitamina D₃ y para la vitamina E acetato fueron 696,04 y 2457,33 respectivamente. De esta forma se encontraron como factores críticos para la vitamina D₃, la temperatura, el flujo de la fase móvil y la longitud de onda de la determinación. Para la vitamina E acetato, los factores críticos fueron la composición de la fase móvil y la longitud de onda.

El método validado se aplicó satisfactoriamente para la determinación de vitamina A palmitato en el Producto 1, de las tres vitaminas en el Producto 2 y de las vitaminas A palmitato y D₃ en el Producto 3. Para los análisis, cantidades pesadas de las muestras se diluyeron inicialmente con isopropanol y finalmente, para su inyección, alícuotas adecuadas de estas diluciones se diluyeron con la fase móvil y posterior filtración por membranas de 0,45 µm. En la Tabla VIII se indica la composición de los productos y los resultados de la valoración.

CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología analítica por CLAE en fase inversa para la determinación de vitamina A palmitato, vitamina D₃ y vitamina E acetato de uso veterinario. Durante la etapa de validación, la metodología demostró ser precisa, lineal, reproducible y selectiva frente a los auxiliares de formulación de los productos inyectables así como frente a los productos de descomposición obtenidos por exposición a la luz directa y al aire. Estas características la hacen adecuada y confiable para el objetivo propuesto. Además de ello, la metodología presentada es sencilla, se realiza en un tiempo adecuado respecto de otras encontradas en la literatura, y se lleva a cabo con instrumental y materiales de uso corriente y disponible en la mayoría de los laboratorios de control, no requiriéndose de equipos o detectores especiales. La metodología validada permite la determinación de las vitaminas, solas o en mezcla, en inyectables de uso veterinario

TABLA VII - Influencia de la variación de algunos parámetros en la respuesta

Parámetro	1	2	3	4	5	6	Diferencia ¹
Temperatura	45	45	45	43	43	43	8778
Fase móvil ²	45:50:2,5	45:48:4,5	45:48:4,5	45:50:2,5	45:50:2,5	45:48:4,5	8502
Flujo mL/min	1,5	1,3	1,3	1,5	1,3	1,5	-30070
λ (nm)	280	278	280	278	278	280	64151
t (min)	0	0	60	60	0	60	8779
Area obtenida	1654978	1545999	1686916	1545583	1686916	1629056	

valor de comparación: desviación estándar del método x $\sqrt{2}$ = 21058,5

¹media del límite superior – media del límite inferior

²CH₃CN:MetOH:Agua

TABLA VIII - Composición y resultados analíticos en porcentaje de los productos evaluados

Producto	Vitamina A palmitato		Vitamina D ₃		Vitamina E acetato	
	Etiquetado	Hallado	Etiquetado	Hallado	Etiquetado	Hallado
	UI/mL	%	UI/mL	%	mg/mL	%
1	500000	95	0	NA	50,0 ¹	NA ²
2	600000	94	75000	93	100,0	96
3	500000	89	2000	95	50,0 ¹	NA ²
Vehículo oleoso	csp ³ 1 mL		csp ³ 1 mL		csp ³ 1 mL	

¹ agregado como antioxidante

² no aplica

³ cantidad suficiente para

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-LANIP por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

RESUMO

Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de vitaminas A, D₃ e E em injetáveis de uso veterinário

Neste artigo se apresentam os resultados do desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a determinação simultânea de palmitato de vitamina A, vitamina D₃ e vitamina E em injetáveis para uso de acetato na pecuária. O procedimento consiste na separação cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, utilizando como fase móvel mistura de acetonitrila, metanol, água (45:50:2.5), coluna C₁₈ a 45 °C e detecção em comprimento de onda de 280 nm. O método mostrou-se seletivo, linear e preciso. As características e a facilidade de execução do método indicam que ele é adequado e conveniente para o objetivo proposto. A robustez do método também foi pesquisada. O método validado foi aplicado para a determinação de vitaminas em três produtos injetáveis do mercado colombiano com registro no ICA (Instituto Colombiano Agropecuário).

UNITERMOS: Palmitato de vitamina A/determinação. Vitamina D₃/determinação. Acetato de vitamina E/determinação. Cromatografia líquida de alta eficiência. Detecção no ultravioleta. Injetáveis/ de uso veterinário/ análise quantitativa.

REFERÊNCIAS

- ALBALÁ-HURTADO, S.; NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.; MARINÉ-FONT, A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 778, p. 243-246, 1997.
- BRISAERT, G.M.; PLAIZIR-VERCANMEN, M. Densitometric thin layer chromatographic analysis of tetrinoin and erythromycin in lotion for topical use in acne treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 48, p. 53-58, 1999.
- CEUGNI, C.; LEPETIT, L.; DE VIGUERIE, N.L.; JAMMES, H.; PEYROT, N.; RIVIÈRE, M. Single-run analysis of retinal isomers, retinol and photooxidation products by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 810, p. 237-240, 1998.
- COLLINS, C.A.; CHOW, C.K. Determination of vitamin A and vitamin A acetate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, v. 317, p. 349-354, 1984.
- DELGADO-ZAMARREÑO, M.M.; GONZÁLEZ-MAZA, I.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; CARABIAS-MARTINEZ, R., Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 953, p. 257-262, 2002.
- DUARTE, R. M.; IHA, M.H.; PIRES, M.L. Liquid chromatographic determination of geometrical retinol isomers and carotene in enteral feeding formulas. *J. Chromatogr. A*, v.1021, p. 125-132, 2003.
- ESCRIBA, A.; STEVE, J.; FARRÉ, R.; FRIGOLA, A. Determination of lipophilic vitamins in cooked meals, milk and milk products. *J. Chromatogr. A*, v. 947, p. 313-318, 2002.
- GATTI, R.; GIOIA, M-G.; DI PIETRA, A.M.; CINI, M. Determination of retinoids in galenicals by column liquid chromatography with fluorescence and diode-array detection. *J. Chromatogr. A*, v.905, p. 345-350, 2001.
- MARCUS, R.; COULSTON, A. M. Vitaminas. In: Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas de la terapéutica*. 10 ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2003. v. 2, p. 1765-1772.
- MOMENBEIK, F.; MOMENI, Z.; KHORASANI, J.H. Separation and determination of Vitamins E and A in multivitamin syrup using micellar liquid chromatography and simplex optimization. *J. Pharm. Biomed. Appl.*, v. 37, p. 383-387, 2005.
- QIAN, H.; SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 825, p. 127-133, 1998.

- QUATROCHI, O.A.; ABELAIRA, S.I.; LABA, R.F. *Introducción a la HPLC. Teoría y Práctica*, Buenos Aires, 1992. p. 324-327.
- RODAS, B.; MORERA, S.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *J. Chromatogr. A*, v. 1018, p. 197-202, 2003.
- SPENCER, B.J.; PURDY, W.C. Comparison of the separation of fat-soluble vitamins using β -cyclodextrins in high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 782, p. 227-235, 1997.
- TAIBI, G.; NICOTRA, M.A. Development and validation of a fast and sensitive chromatographic assay for all-*trans*-retinol and tocopherols in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B*, v. 780, p. 261-267, 2002.
- TANAKA, N.; KOBAYASHI, H.; ISHIZUKA, N.; MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; HOSOYA, K.; IKEGAMI, T. Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J. Chromatogr. A*, v. 965, p. 35-49, 2002.
- WANG, L-H.; WANG, J.F. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retynil acetate in pharmaceutical by RP-LC with electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 25, p. 785-793, 2001.

Recebido para publicação em 20 de dezembro de 2006.

Aceito para publicação em 29 de novembro de 2007.