

PHỤ LỤC 10.22 ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN D

PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG

Quy trình sắc ký lỏng sau đây được áp dụng cho định lượng vitamin D khi là dược chất, là một thành phần trong thực phẩm bổ sung, hoặc là một thành phần trong các dạng bào chế có trong dược điển.

Trong quá trình định lượng vitamin D, phải bảo vệ các dung dịch hoặc dẫn xuất từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn tránh không khí và ánh sáng bằng cách sử dụng khí trơ và thủy tinh màu.

Trong các quy trình dưới đây, sử dụng vitamin D (cholecalciferol hoặc ergocalciferol) làm chuẩn phải phù hợp với dạng hóa học đã nêu trong công thức bào chế của sản phẩm.

Quy trình 1

Quy trình 1 bao gồm quá trình chuẩn bị mẫu không cần điều chỉnh pH; sử dụng dimethyl sulfoxid để hòa tan các tá dược trong mẫu; sau đó chiết lỏng - lỏng bằng hexan và sử dụng sắc ký pha thuận với cột nhồi pha tĩnh aminopropyl-silan. Sử dụng quy trình 1 để xác định vitamin D là thành phần đơn lẻ hoặc kết hợp với các vitamin và khoáng chất khác trong công thức bào chế.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung dịch phù hợp hệ thống được chuẩn bị như sau:

Pha động: *n*-hexan-isopropanol (99 : 1).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 2 µg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong *n*-hexan (TT).

Dung dịch phù hợp hệ thống: Đun nóng một thể tích dung dịch chuẩn ở 60 °C trong 1 h để đồng phân hóa một phần vitamin D (cholecalciferol hoặc ergocalciferol) thành tiền chất tương ứng của nó.

Dung dịch thử với viên nén: Nghiền mịn ít nhất 20 viên. Lấy một lượng bột viên, không quá 7,5 g, tương đương với ít nhất 0,1 mg vitamin D ở dạng cholecalciferol hoặc ergocalciferol, vào ống ly tâm có nắp xoáy bằng polytef. Thêm khoảng 2 ml *dimethyl sulfoxid* (TT) và khoảng 3 ml *n*-hexan (TT) trên mỗi gram bột, lắc 45 min trên máy lắc trong cách thủy ở 60 °C (chú ý: thiết lập máy lắc phải đảm bảo các ống được trộn đều và mạnh để đạt độ thu hồi chính xác). Ly tâm ở tốc độ 3000 r/min trong 10 min và dùng pipet chuyển lớp hexan vào bình định mức. Thêm 3 ml *n*-hexan (TT) trên mỗi gram bột vào lớp *dimethyl sulfoxid*, lắc kỹ trong 5 min và dùng pipet chuyển lớp hexan vào cùng một bình định mức. Lặp lại quá trình chiết này 3 lần nữa. Pha loãng dịch chiết trong bình định mức bằng *n*-hexan (TT) đến vạch. Pha loãng dung dịch thu được, nếu cần, bằng *n*-hexan (TT) để thu được dung dịch có nồng độ cholecalciferol hoặc ergocalciferol là 2 µg/ml.

Dung dịch thử với nang: Chuyển toàn bộ thuốc trong ít nhất 20 nang vào bình chứa thích hợp, trộn đều và cân. Lấy một lượng thuốc trong nang, không quá 7,5 g, tương đương với ít nhất 0,1 mg vitamin D ở dạng cholecalciferol hoặc ergocalciferol, vào ống ly tâm có nắp xoáy bằng polytef (Chú ý: với nang gelatin cứng, cắt vỏ nang, chuyển vỏ và thuốc bên trong vào cối và nghiền thành khối đồng nhất. Lấy một phần lượng đồng nhất, tương đương với ít nhất 0,1 mg vitamin D ở dạng cholecalciferol hoặc ergocalciferol, vào ống ly tâm có nắp xoáy bằng polytef). Tiến hành tiếp theo như *dung dịch thử với viên nén* từ "Thêm khoảng 2 ml *dimethyl sulfoxid* (TT)"

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (15 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh aminopropyl-silan (NH₂) (3 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 100 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống, độ phân giải giữa pic ở dạng vitamin D và pic tiền chất tương ứng của nó không nhỏ hơn 10. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic vitamin D thu được từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không lớn hơn 3,0 %.

Tính hàm lượng cholecalciferol (C₂₇H₄₄O) hoặc ergocalciferol (C₂₈H₄₄O) trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng C₂₇H₄₄O hoặc C₂₈H₄₄O trong cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn và nhân với 1,09 là hệ số hiệu chỉnh để tính lượng tiền vitamin D trung bình có trong dung dịch thử.

Quy trình 2

Quy trình 2 sử dụng natri bicarbonate là chất chống oxy hóa (có sinh khí), lecithin là chất diện hoạt, dùng dimethyl sulfoxide và tiếp theo là dung dịch acid sulfuric trong methanol làm môi trường phân tán mẫu và dùng 2,2,4-trimethylpentan để chiết vitamin D khỏi nền mẫu. Sử dụng sắc ký pha thuận với cột nhồi pha tĩnh polyvinylalcol (L24). Quy trình này cũng phù hợp để xác định vitamin A và E có trong công thức (cần điều chỉnh lượng mẫu thử và bước sóng phát hiện).

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung dịch phù hợp hệ thống được chuẩn bị như sau:

Pha động: *n-hexan - tert-butanol* (98,75 : 1,25).

Dung dịch acid sulfuric 3 N trong methanol: Thêm rất cẩn thận 9 ml *acid sulfuric* (TT) vào 80 ml *methanol* (TT) trong bình định mức 100 ml. Để nguội và thêm *methanol* (TT) đến vạch.

Dung dịch natri ascorbat-pyrogallol: Chuyển 10 g *natri ascorbat* (TT) và 5 g *pyrogallol* (TT) vào bình định mức 100 ml, thêm *nước* để hòa tan. Thêm 1,7 ml *acid sulfuric* (TT) và pha loãng đến vạch bằng *nước*.

Dung dịch lecithin: Dung dịch chứa 5 mg/ml *lecithin* (TT) trong 2,2,4-trimethylpentan (TT).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 1 µg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong 2,2,4-trimethylpentan (TT).

Dung dịch phù hợp hệ thống: Đun nóng một thể tích dung dịch chuẩn ở 60 °C trong 1 h để đồng phân hóa một phần vitamin D (cholecalciferol hoặc ergocalciferol) thành tiền chất tương ứng của nó.

Dung dịch thử với viên nén: Nghiền mịn ít nhất 20 viên nén. Lấy một lượng bột viên tương đương với ít nhất 0,1 mg vitamin D. Thêm 0,5 g *natri bicarbonat* (TT), 1,5 ml dung dịch lecithin và 12,5 ml 2,2,4-trimethylpentan (TT) và trộn đều trên máy lắc xoáy. Thêm 6 ml dung dịch natri ascorbat-pyrogallol, lắc chậm, và để khí thoát ra. Tiếp tục lắc cho đến khi ngừng sinh khí, sau đó lắc thêm 12 min. Thêm 6 ml *dimethyl sulfoxid* (TT), trộn trên máy lắc xoáy để tạo thành hỗn dịch và lắc trong 12 min. Thêm 6 ml dung dịch acid sulfuric 3 N trong methanol, trộn trên máy lắc xoáy để tạo thành hỗn dịch và lắc trong 12 min. Thêm 12,5 ml 2,2,4-trimethylpentan (TT), trộn trên máy lắc xoáy để tạo thành hỗn dịch và lắc trong 10 min. Ly tâm trong 10 min để phá vỡ nhũ tương và làm trong phần dịch phía trên. Nếu cần, pha loãng chính xác một thể tích phần dịch trong phía trên với 2,2,4-trimethylpentan (TT) để thu được nồng độ gần với nồng độ của dung dịch chuẩn.

Dung dịch thử với nang: Cân ít nhất 20 nang. Dùng lưỡi dao sắc, cẩn thận mở nang mà không làm mất vỏ và chuyển toàn bộ lượng thuốc bên trong vào cốc có mỏ 100 ml. Rửa sạch phần vỏ bằng ether và làm khô vỏ nang bằng luồng không khí khô. Cân vỏ nang rỗng và tính khối lượng của toàn bộ lượng thuốc bên trong nang. Lấy một lượng thuốc trong nang tương đương với ít nhất 0,1 mg vitamin D ghi trên nhãn dưới dạng cholecalciferol hoặc ergocalciferol. Tiến hành tiếp theo như *dung dịch thử với viên nén* từ “ Thêm 0,5 g *natri bicarbonat* (TT)....”

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh polyvinylalcol (L24) (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 40 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống, độ phân giải giữa pic ở dạng vitamin D và pic tiền chất tương ứng của nó không nhỏ hơn 4,0. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic vitamin D thu được từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không lớn hơn 3,0 %.

Tính hàm lượng cholecalciferol (C₂₇H₄₄O) hoặc ergocalciferol (C₂₈H₄₄O) trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng C₂₇H₄₄O trong cholecalciferol chuẩn hoặc hàm lượng C₂₈H₄₄O trong ergocalciferol chuẩn.

Quy trình 3

Quy trình 3 phù hợp với mẫu thử có tá dược tan hoặc phân hủy trong môi trường kiềm. Quy trình này bao gồm quá trình xà phòng hóa dung dịch thử, sau đó chiết lỏng-lỏng bằng hexan và làm sạch bằng

chiết pha rắn (SPE) dùng hỗn hợp *methylen clorid - isopropanol* (99,8 : 0,2) để rửa giải. Dung dịch chuẩn và dung dịch thử được tiến hành các bước tương tự nhau để bù lượng hao hụt trong quá trình xử lý mẫu. Dịch rửa giải sau đó mang đi bay hơi và hòa tan cần thu được trong acetonitril trước khi tiêm mẫu. Dùng sắc ký pha đảo để tách chất cần phân tích.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và thuốc thử được chuẩn bị như sau:

Pha động: *Acetonitril - methanol* (91:9).

Acid acetic loãng: Pha loãng 1 thể tích *acid acetic băng (TT)* thành 10 thể tích bằng *nước*.

Dung dịch phenolphthalein: Dung dịch chứa 10 mg/ml *phenolphthalein (TT)* trong *ethanol 96 % (TT)*.

Dung dịch kali hydroxyd: Hòa tan cẩn thận 14 g *kali hydroxyd (TT)* trong hỗn hợp gồm 31 ml *ethanol (TT)* và 5 ml *nước*. Dùng dung dịch trong ngày.

Dung môi chiết: *Methylen clorid - isopropanol* (99,8 : 0,2).

Cột chiết: Cột nhồi silica với tỷ lệ khối lượng chất hấp phụ trên thể tích cột là 500 mg/2,8 ml hoặc tương đương. Chú ý: để cân bằng cột, đầu tiên rửa cột bằng 4,0 ml hỗn hợp *methylen clorid-isopropanol* (4:1) trước, sau đó rửa tiếp bằng 5,0 ml dung môi chiết, không để cột khô.

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,2 mg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong *ethanol (TT)*. Dùng trong vòng 4 tuần sau khi pha, bảo quản trong tủ đá.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng một thể tích dung dịch chuẩn gốc bằng *ethanol (TT)* để thu được nồng độ cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn là 5 µg/ml (dùng dung dịch thu được trong ngày). Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào bình nón dung tích 125 ml có nút mài.

Thêm 15,0 ml *nước* và 15,0 ml dung dịch kali hydroxyd, đậy nút và lắc 30 min trong cách thủy ở 60 °C. Để nguội về nhiệt độ phòng và chuyển lượng chứa trong bình nón sang bình chiết dung tích 250 ml. Thêm 15,0 ml *nước* vào bình nón, đậy nút, lắc mạnh và chuyển toàn bộ lượng nước này vào bình chiết. Tráng bình nón bằng 60 ml *n-hexan (TT)* và chuyển dịch tráng vào bình chiết. Đậy nút bình chiết, lắc mạnh trong 90 s và để yên trong 15 min đến khi các lớp tách ra và rút bỏ lớp nước. Thêm 15,0 ml *nước* vào lớp hexan trong bình chiết, đậy nút và lắc mạnh. Để yên trong 10 min đến khi các lớp tách ra và rút bỏ lớp nước. Thêm 1 giọt dung dịch phenolphthalein và 15,0 ml *nước* vào bình chiết. Thêm từng giọt acid acetic loãng, vừa thêm vừa lắc đều cho đến khi lớp nước thành trung tính. Để yên trong 10 min đến khi các lớp tách ra và rút bỏ lớp nước. Lọc lớp hexan qua *natri sulfat khan (TT)* vào bình cầu 100 ml (dùng một miếng bông nhỏ hỗ trợ). Tráng phễu và natri sulfat khan bằng vài mililit *n-hexan (TT)*, và thu dịch rửa vào cùng bình cầu. Làm bay hơi hexan trong bình cầu trên thiết bị cô cất quay ở 50 °C đến khô. Thêm ngay 2,0 ml dung môi chiết để hòa tan cần. Chuyển dung dịch này sang cột chiết pha rắn mới được cân bằng xong. Tráng bình cầu bằng 1,0 ml dung môi chiết và chuyển vào cột. Rửa giải cột bằng 2,0 ml dung môi chiết, và loại bỏ phần này. Tiếp tục rửa giải cột bằng 7,0 ml dung môi chiết và thu dịch rửa giải vào một bình thích hợp. Đặt bình vào bể nước ấm được duy trì ở 42°C và làm bay hơi dung môi bằng dòng khí nitrogen. Thêm ngay 2,0 ml *acetonitril (TT)* để hòa cần và sử dụng dung dịch thu được để tiêm sắc ký.

Dung dịch thử cho viên nén: Nghiền mịn ít nhất 20 viên. Lấy một lượng bột viên tương đương với 10 µg cholecalciferol hoặc ergocalciferol vào bình nón dung tích 125 ml có nút mài. Tiến hành tiếp theo như dung dịch chuẩn từ "Thêm 15,0 ml *nước* và 15,0 ml dung dịch kali hydroxyd...".

Dung dịch thử cho nang: Cân ít nhất 20 nang. Dùng lưỡi dao sắc, cẩn thận mở nang mà không làm mất vỏ và chuyển toàn bộ lượng thuốc bên trong vào cốc có mỏ 100 ml. Rửa sạch phần vỏ bằng ether và làm khô vỏ bằng luồng không khí khô. Cân vỏ nang rỗng và tính khối lượng của toàn bộ lượng thuốc bên trong nang. Lấy một lượng thuốc trong nang tương đương với 10 µg ergocalciferol hoặc cholecalciferol vào bình nón dung tích 125 ml có nút mài. Tiến hành tiếp theo như dung dịch chuẩn từ "Thêm 15,0 ml *nước* và 15,0 ml dung dịch kali hydroxyd...".

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm).

Nhiệt độ cột: 27 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 0,7 ml/min.

Thể tích tiêm: 15 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic chính thu được từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không lớn hơn 4,0 %.

Tính hàm lượng cholecalciferol ($C_{27}H_{44}O$) hoặc ergocalciferol ($C_{28}H_{44}O$) trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng $C_{27}H_{44}O$ trong cholecalciferol chuẩn hoặc hàm lượng $C_{28}H_{44}O$ trong ergocalciferol chuẩn.

Quy trình 4

Quy trình 4 áp dụng cho các dạng bào chế lỏng. Quy trình này bao gồm chiết lỏng - lỏng bằng hexan, sau đó bay hơi hexan và hoàn nguyên phần còn lại trong hỗn hợp *tetrahydrofuran* - *acetonitril* (1 : 1). Dùng sắc ký pha đảo để tách chất cần phân tích.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung môi pha loãng được chuẩn bị như sau:

Pha động: *Methanol* - *acetonitril* - *n-hexan* (46,5 : 46,5 : 7,0).

Dung môi pha loãng: *Tetrahydrofuran* - *acetonitril* (1 : 1).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 5 µg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong dung môi pha loãng.

Dung dịch thử: Chuyển một thể tích chính xác mẫu thử tương đương với 50 µg cholecalciferol hoặc ergocalciferol vào bình chiết dung tích 500 ml chứa sẵn 10 ml *nước* và 20 ml *ethanol* (TT). Thêm 150 ml *ether dầu hỏa* 50 - 70 °C (TT), đậy kín và lắc trong 1 min. Thêm tiếp 150 ml *ether dầu hỏa* 50 - 70 °C (TT), đậy kín, lắc và để yên cho tách lớp. Loại bỏ lớp *nước*. Rút dịch chiết *ether dầu hỏa* và làm khan qua *natri sulfat khan* (TT) vào bình cầu dung tích 500 ml. Làm bay hơi *ether dầu hỏa* trong bình cầu trên thiết bị cô cất quay ở 65 °C đến khô. Cô cất quay bình cầu trên cách thủy ở 65 °C đến khô. Thêm ngay 10,0 ml dung môi pha loãng, lắc xoay để hòa tan cặn và lọc.

Điều kiện sắc ký:

Sử dụng 2 cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) mắc nối tiếp.

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic chính thu được từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không lớn hơn 5,0 %.

Tính hàm lượng cholecalciferol ($C_{27}H_{44}O$) hoặc ergocalciferol ($C_{28}H_{44}O$) trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng $C_{27}H_{44}O$ trong cholecalciferol chuẩn hoặc hàm lượng $C_{28}H_{44}O$ trong ergocalciferol chuẩn và nhân với 1,09 là hệ số hiệu chỉnh để tính lượng tiền vitamin D trung bình có trong dung dịch thử.

Quy trình 5

Quy trình 5 bao gồm quá trình hòa tan vitamin D trong toluen và tiêm sắc ký. Quy trình này áp dụng cho sản phẩm có nền mẫu đơn giản, ví dụ như vitamin nguyên chất và các nguyên liệu, không cần xử lý phòng hóa và tan trong toluen. Dùng sắc ký pha thuận để tách chất cần phân tích.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung dịch phù hợp hệ thống được chuẩn bị như sau:

Hexan đã khử nước: Chuẩn bị cột sắc ký kích thước, 8 cm × 60 cm, nhồi 500 g silic dùng cho sắc ký kích thước từ 50 µm đến 250 µm, được hoạt hóa bằng cách sấy khô ở 150 °C trong 4 h. Cho 500 ml *hexan* (TT) đi qua cột sắc ký và thu dịch rửa giải vào bình thủy tinh có nút mài.

Pha động: Pha loãng 3 thể tích *pentanol* (TT) thành 1000 thể tích bằng *hexan đã khử nước*.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Dung dịch chứa 250 mg vitamin D kiểm tra tính phù hợp hệ thống (hỗn hợp của cholecalciferol và trans-cholecalciferol trong dầu lạc) trong 10 ml hỗn hợp *toluen* - *pha động* (1 : 1). Đun hồi lưu dung dịch này ở 90 °C trong 45 min và để nguội (Chú ý: Dung dịch này chứa cholecalciferol, pre-cholecalciferol và trans-cholecalciferol).

Với các dung dịch gốc dưới đây, dùng dụng cụ thủy tinh có hoạt tính thấp, hòa tan không đun nóng và chuẩn bị các dung dịch trong ngày).

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,6 mg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong toluen (TT).

Dung dịch chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng pha động để thu được dung dịch chứa 120 µg/ml cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn.

Dung dịch thử gốc: Dung dịch chứa 0,6 mg/ml cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong toluen (TT).

Dung dịch thử: Pha loãng dung dịch thử gốc bằng pha động để thu được dung dịch chứa 120 µg/ml cholecalciferol hoặc ergocalciferol.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh A (5 µm).

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm.

Tốc độ dòng: Điều chỉnh để đáp ứng yêu cầu kiểm tra tính phù hợp của hệ thống.

Thể tích tiêm: 5 - 10 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ dung dịch phù hợp hệ thống, thời gian lưu tương đối so với cholecalciferol của pre-cholecalciferol khoảng 0,4 và của *trans*-cholecalciferol khoảng 0,5; độ phân giải giữa pic pre-cholecalciferol và pic *trans*-cholecalciferol không nhỏ hơn 1,0; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic cholecalciferol thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng cholecalciferol (C₂₇H₄₄O) hoặc ergocalciferol (C₂₈H₄₄O) trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng C₂₇H₄₄O trong cholecalciferol chuẩn hoặc hàm lượng C₂₈H₄₄O trong ergocalciferol chuẩn.

Quy trình 6

Quy trình 6 bao gồm quá trình hòa tan mẫu trong pha động và tiêm sắc ký. Quy trình này áp dụng cho cholecalciferol và ergocalciferol đã được hòa tan trong dầu thực vật, polysorbate 80 hoặc propylen glycol - là những chất không gây tương tác đến tiền chất tương ứng của vitamin D vì vậy không ảnh hưởng đến định lượng. Sử dụng sắc ký pha thuận với cột nhồi pha tĩnh A và yêu cầu phù hợp hệ thống là phải tách được dạng *trans* ra khỏi tiền chất của vitamin D.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử được chuẩn bị như sau:

Pha động: Hexan - pentanol (997 : 3).

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong toluen (TT), và pha loãng bằng pha động để thu được dung dịch có nồng độ 50 µg/ml (dùng dung dịch trong ngày).

Dung dịch chuẩn A: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng pha động để thu được dung dịch có nồng độ 5 µg/ml. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ không quá 0 °C.

Dung dịch chuẩn B: Chuyển 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình cầu có lắp sinh hàn hồi lưu. Loại bỏ không khí bằng khí nitrogen và đun hồi lưu 1 h trong cách thủy dưới dòng khí nitrogen để thu được dung dịch chứa cholecalciferol và pre-cholecalciferol (hoặc pre-ergocalciferol và ergocalciferol). Để nguội, dùng pha động chuyển dần dung dịch từ bình cầu vào bình định mức 50 ml và thêm pha động đến vạch.

Dung dịch thử: Pha loãng một thể tích chính xác mẫu thử bằng pha động để thu được dung dịch chứa 5 µg/ml cholecalciferol (hoặc ergocalciferol).

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh A (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm.

Tốc độ dòng: 1 - 2 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 - 20 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn B, thời gian lưu tương đối so với cholecalciferol của pre-cholecalciferol khoảng 0,4 (thời gian lưu tương đối so với ergocalciferol của

pre-ergocalciferol khoảng 0,8); độ phân giải giữa pic pre-cholecalciferol và pic cholecalciferol không nhỏ hơn 1,0 (hoặc độ phân giải giữa pic pre-ergocalciferol và pic ergocalciferol không nhỏ hơn 1,0); độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic cholecalciferol (hoặc ergocalciferol) thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tính hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol (F_C) theo công thức sau:

$$F_C = C_S / r_S$$

C_S : nồng độ của cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong dung dịch chuẩn A ($\mu\text{g/ml}$).

r_S : diện tích pic cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn A.

Tính hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol (F_{pre}):

Tính nồng độ, C'_S ($\mu\text{g/ml}$), của cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong dung dịch chuẩn B theo công thức sau:

$$C'_S = F_C \times r'_S$$

F_C : hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol.

r'_S : diện tích pic cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn B.

Tính nồng độ, C'_{pre} ($\mu\text{g/ml}$) của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol theo công thức sau:

$$C'_{pre} = C_S - C'_S$$

C_S : nồng độ cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong dung dịch chuẩn A ($\mu\text{g/ml}$).

C'_S : nồng độ cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong dung dịch chuẩn B ($\mu\text{g/ml}$).

Tính hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol (F_{pre}) theo công thức sau:

$$F_{pre} = C'_{pre} / r_p$$

C'_{pre} : nồng độ của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol ($\mu\text{g/ml}$).

r_p : diện tích pic pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn B.

Tính hàm lượng phần trăm cholecalciferol ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$) hoặc ergocalciferol ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$) trong mẫu thử theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng phần trăm} = \{[(F_C \times r_C) + (F_{pre} \times r_{pre})] / C_U\} \times 100$$

F_C : hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol.

r_C : diện tích pic của cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

F_{pre} : hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol.

r_{pre} : diện tích pic của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

C_U : nồng độ theo lý thuyết của cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

Quy trình 7

Quy trình 7 bao gồm quá trình xử lý mẫu thử, sau đó chiết lỏng - lỏng bằng hỗn hợp ether - ether dầu hỏa, làm bay hơi ether - ether dầu hỏa và hòa tan cần trong hỗn hợp *toluen - pha động* (1 : 4). Quy trình này áp dụng cho dung dịch trong dầu và viên nang chứa dung dịch vitamin D trong dầu (dầu này không có tác động đến tiền chất tương ứng của vitamin D vì vậy không ảnh hưởng đến định lượng). Sử dụng sắc ký pha thuận với cột nhồi pha tĩnh A và yêu cầu phù hợp hệ thống là phải tách được dạng *trans* ra khỏi tiền chất của vitamin D.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và thuốc thử được chuẩn bị như sau:

Hexan đã khử nước: Chuẩn bị cột sắc ký kích thước, 8 cm × 60 cm, nhồi 500 g silic dùng cho sắc ký kích thước từ 50 μm đến 250 μm , được hoạt hóa bằng cách sấy khô ở 150 °C trong 4 h. Cho 500 ml *hexan* (TT) đi qua cột sắc ký và thu dịch rửa giải vào bình thủy tinh có nút mài.

Pha động: Pha loãng 3 thể tích *pentanol* (TT) thành 1000 thể tích bằng *hexan đã khử nước* (TT).

Dung dịch butyl hydroxytoluen: Dung dịch chứa 10 mg/ml *butyl hydroxytoluen* (TT) trong *hexan* dùng cho sắc ký (TT).

Dung dịch kali hydroxyd trong nước: Dung dịch chứa 1 g/ml *kali hydroxyd* (TT) trong *nước* mới đun sôi (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch kali hydroxyd trong ethanol: Hòa tan 3 g kali hydroxyd (TT) trong 50 ml nước mới đun sôi. Thêm 10 ml ethanol 96 % (TT) và pha loãng thành 100 ml bằng nước mới đun sôi (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch natri ascorbat: Dung dịch chứa 175 mg/ml acid ascorbic (TT) trong dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch natri sulfid: Hòa tan 12 g natri sulfid (TT) trong 20 ml nước và pha loãng thành 100 ml bằng glycerin (TT).

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,5 mg/ml ergocalciferol chuẩn hoặc cholecalciferol chuẩn trong toluen (TT) (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch chuẩn A: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng pha động để thu được dung dịch có nồng độ 20 µg/ml (Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ không quá 0°C).

Dung dịch chuẩn B: Chuyển 4 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình cầu có lắp sinh hàn hồi lưu và thêm 2 hoặc 3 tinh thể butyl hydroxytoluen (TT). Loại bỏ không khí bằng khí nitrogen và đun hồi lưu trong cách thủy ở 90 °C trong 45 min dưới ánh sáng dịu và khí nitrogen để thu được dung dịch chứa vitamin D và tiền chất của vitamin D. Để nguội, dùng pha động chuyển dần dung dịch từ bình cầu vào bình định mức 100 ml và thêm pha động đến vạch.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Cân chính xác 100 mg vitamin D kiểm tra tính phù hợp hệ thống (hỗn hợp của cholecalciferol và trans-cholecalciferol trong dầu lạc) vào bình định mức 10 ml. Thêm hỗn hợp toluen - pha động (1 : 4) đến vạch và trộn đều. Đun hồi lưu một phần dung dịch này ở 90 °C trong 45 min và để nguội.

Dung dịch thử: Lấy ít nhất 10 nang, thêm hỗn hợp gồm 10 ml dung dịch natri ascorbat và 2 giọt dung dịch natri sulfid và đun hồi lưu trên cách thủy trong 10 min. Sau đó nghiền nát bất kỳ chất rắn nào còn lại bằng thìa thủy tinh và tiếp tục đun trong 5 min. Để nguội và thêm 25 ml ethanol 96 % (TT) và 3 ml dung dịch kali hydroxyd trong nước. Đun hồi lưu hỗn hợp trên cách thủy trong 30 min. Làm nguội nhanh dưới vòi nước chảy và chuyển hỗn hợp đã xà phòng hóa sang bình chiết hình nón. Tráng bình xà phòng hóa 2 lần, mỗi lần với 15 ml nước, sau đó tráng tiếp bằng 10 ml ethanol 96 % (TT) và cuối cùng là 2 lần, mỗi lần với 50 ml ether (TT) (Sử dụng ether trong vòng 24 h sau khi mở nắp). Chuyển toàn bộ dịch tráng bình vào bình chiết và lắc mạnh trong 30 s, để yên cho đến khi cả hai lớp trong (bình chiết 1).

Chuyển pha nước sang bình chiết thứ hai (bình chiết 2), thêm hỗn hợp gồm 10 ml ethanol 96 % (TT) và 50 ml ether dầu hỏa 50 - 70 °C (TT) và lắc mạnh. Để yên cho tách lớp, chuyển pha nước sang bình chiết mới (bình chiết 3) và chuyển pha ether dầu hỏa sang bình chiết 1. Tráng bình chiết 2 hai lần, mỗi lần với 10 ml ether dầu hỏa 50 - 70 °C (TT) và chuyển toàn bộ dịch tráng ether dầu hỏa này vào bình chiết 1. Lắc pha nước trong bình chiết 3 với 50 ml ether dầu hỏa 50 - 70 °C (TT) và chuyển pha ether dầu hỏa vào bình chiết 1.

Rửa phần dịch chiết ether - ether dầu hỏa trong bình chiết 1 ba lần, mỗi lần bằng cách lắc mạnh với 50 ml dung dịch kali hydroxyd trong ethanol và sau đó rửa tiếp với 50 ml nước bằng cách lắc mạnh cho đến khi nước rửa cuối cùng trung tính với phenolptalein.

Để loại hết những giọt nước còn lại trong dịch chiết ether - ether dầu hỏa, thêm 2 dải giấy lọc dài 9 cm vào bình chiết 1 và lắc. Chuyển dịch chiết ether - ether dầu hỏa đã rửa sạch vào bình cầu, tráng bình chiết 1 và giấy bằng ether dầu hỏa 50 - 70 °C (TT). Chuyển dịch tráng ether dầu hỏa, vào cùng bình cầu, thêm 100 µl dung dịch butyl hydroxytoluen và trộn đều. Cô quay trong chân không, trong nồi cách thủy ở nhiệt độ không quá 40 °C đến khô. Làm nguội bình cầu dưới vòi nước chảy và đưa nitrogen vào để phục hồi áp suất. Ngay lập tức, hòa tan cẩn trọng một thể tích chính xác hỗn hợp toluen - pha động (1 : 4) để thu được nồng độ vitamin D khoảng 25 µg/ml.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh A (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm.

Tốc độ dòng: 1 - 2 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 - 20 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký dung dịch phù hợp hệ thống, dung dịch chuẩn A, B và dung dịch thử.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống, thời gian lưu tương đối so với cholecalciferol của pre-cholecalciferol khoảng 0,4 và của *trans*-cholecalciferol khoảng 0,5; độ phân giải giữa pic pre-cholecalciferol và pic *trans*-cholecalciferol không nhỏ hơn 1,0; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic cholecalciferol không lớn hơn 2,0 %.

Tính hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol (F_D) theo công thức sau:

$$F_D = C_S / r_S$$

C_S : nồng độ của cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong dung dịch chuẩn A ($\mu\text{g/ml}$).

r_S : diện tích pic cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn A.

Tính hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol (F_{pre}):

Tính nồng độ của cholecalciferol hoặc ergocalciferol, C'_S ($\mu\text{g/ml}$), trong dung dịch chuẩn B theo công thức sau:

$$C'_S = F_D \times r'_S$$

F_D : hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol.

r'_S : diện tích pic cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn B.

Tính nồng độ của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol, C'_{pre} ($\mu\text{g/ml}$), theo công thức sau:

$$C'_{pre} = C_S - C'_S$$

C_S : nồng độ cholecalciferol chuẩn hoặc ergocalciferol chuẩn trong dung dịch chuẩn A ($\mu\text{g/ml}$).

C'_S : nồng độ cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong dung dịch chuẩn B ($\mu\text{g/ml}$).

Tính hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol (F_{pre}) theo công thức sau:

$$F_{pre} = C'_{pre} / r_p$$

C'_{pre} : nồng độ của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol ($\mu\text{g/ml}$).

r_p : diện tích pic pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn B.

Tính hàm lượng phần trăm cholecalciferol ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$) hoặc ergocalciferol ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$) trong mẫu thử theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng phần trăm} = \{[(F_D \times r_C) + (F_{pre} \times r_{pre})] / C_U\} \times 100$$

F_D : hệ số đáp ứng của cholecalciferol hoặc ergocalciferol.

r_C : diện tích pic của cholecalciferol hoặc ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

F_{pre} : hệ số đáp ứng của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol.

r_{pre} : diện tích pic của pre-cholecalciferol hoặc pre-ergocalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử.

C_U : nồng độ theo lý thuyết của cholecalciferol hoặc ergocalciferol trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

Quy trình 8

Quy trình 8 phù hợp để xác định cholecalciferol trong dầu hoặc chất nền béo. Quy trình này bao gồm hai hệ thống sắc ký, một để làm sạch mẫu và một để định lượng vitamin D. Các dung dịch chuẩn, dung dịch chuẩn nội và dung dịch thử được xà phòng hóa, sau đó chiết lỏng-lỏng với hỗn hợp *ether* - *hexan* (1:1). Làm bay hơi dịch chiết và hoàn nguyên trong dung dịch butyl hydroxytoluen.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch chuẩn nội và thuốc thử được chuẩn bị như sau:

Hexan đã khử nước: Chuẩn bị cột sắc ký kích thước 8 cm $\times$ 60 cm, nhồi 500 g silic dùng cho sắc ký kích thước từ 50 μm đến 250 μm , được hoạt hóa bằng cách sấy khô ở 150 $^{\circ}\text{C}$ trong 4 h. Cho 500 ml *hexan* (TT) đi qua cột sắc ký và thu dịch rửa giải vào bình thủy tinh có nút mài.

Dung dịch A: Pentanol - hexan đã khử nước (3 : 997).

Dung dịch B: Acetonitril - nước - acid phosphoric (96 : 3,8 : 0,2).

Dung dịch butyl hydroxytoluen: Dung dịch chứa 10 mg/ml *butyl hydroxytoluen* (TT) trong *hexan* dùng cho sắc ký (TT).

Dung dịch kali hydroxyd trong nước: Hòa tan 800 g *kali hydroxyd* (TT) trong 1000 ml *nước* mới đun sôi (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch kali hydroxyd trong ethanol: Hòa tan 3 g kali hydroxyd (TT) trong 50 ml nước mới đun sôi. Thêm 10 ml ethanol 96 % (TT) và pha loãng thành 100 ml bằng nước mới đun sôi (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch acid ascorbic: Dung dịch chứa 100 mg/ml acid ascorbic (TT) trong nước (sử dụng dung dịch trong ngày).

Dung dịch chuẩn nội: Dung dịch chứa 5 µg/ml ergocalciferol chuẩn trong ethanol 96 % (TT).

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 5 µg/ml cholecalciferol chuẩn trong ethanol 96 % (TT).

Dung dịch chuẩn: Chuyển 2,0 ml dung dịch chuẩn gốc và 2,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình cầu. Tiến hành tiếp như mô tả ở dung dịch thử (1) từ "Thêm 5 ml dung dịch acid ascorbic,...".

Dung dịch thử (1): Lấy 4,00 g dầu thử vào bình cầu. Thêm 5 ml dung dịch acid ascorbic, 100 ml ethanol 96 % (TT) và 10 ml dung dịch kali hydroxyd trong nước và trộn đều. Đun hồi lưu hỗn hợp trên cách thủy trong 30 min. Thêm 100 ml dung dịch natri clorid (TT) 10 mg/ml. Làm nguội nhanh dưới vòi nước chảy và chuyển hỗn hợp đã xà phòng hóa vào bình chiết 500 ml, tráng bình xà phòng hóa bằng 75 ml dung dịch natri clorid (TT) 10 mg/ml, sau đó tráng tiếp bằng 150 ml hỗn hợp ether - hexan (1 : 1). Gộp tất cả dịch tráng vào bình chiết ở trên, lắc mạnh bình chiết trong 30 s và để yên cho đến khi cả hai lớp trong suốt. Bỏ lớp dưới. Rửa phần dịch chiết ether - hexan bằng cách lắc mạnh với 50 ml dung dịch kali hydroxyd trong ethanol, sau đó rửa tiếp 3 lần, mỗi lần với 50 ml dung dịch natri clorid (TT) 10 mg/ml.

Lọc lớp dịch chiết ether - hexan qua 5 g natri sulfat khan (TT) trên giấy lọc nhanh vào bình cầu cất quay 250 ml. Rửa bộ lọc bằng 10 ml hỗn hợp ether - hexan (1: 1) và gộp dịch rửa vào cùng bình cầu. Làm bay hơi dung môi ở áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 30 °C và bơm đầy khí nitrogen vào bình khi quá trình bay hơi kết thúc hoặc làm bay hơi dung môi dưới dòng khí nitrogen thổi nhẹ ở nhiệt độ không quá 30°C. Hòa tan cặn thu được trong 1,5 ml dung dịch butyl hydroxytoluen (chú ý: Có thể cần làm ấm nhẹ trong bể siêu âm để hòa tan cặn, phần lớn cặn trắng là cholesterol).

Dung dịch thử (2): Lấy 4,00 g dầu thử và 2,0 ml dung dịch chuẩn nội vào bình cầu. Tiến hành tiếp như mô tả ở dung dịch thử (1) từ "Thêm 5 ml dung dịch acid ascorbic,...".

Tiến hành làm sạch các dung dịch chuẩn, dung dịch thử (1) và (2), sử dụng hệ thống sắc ký thứ nhất như sau:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh là nhóm nitril liên kết với silica (CN) (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 1,1 ml/min.

Thể tích tiêm: 350 µl.

Pha động: Dung dịch A.

Thu riêng phần dịch rửa giải thu được từ trước và sau 2 min so với thời gian lưu của cholecalciferol vào một ống thủy tinh có chứa 1 ml dung dịch butyl hydroxytoluen và đậy kín. Làm bay hơi từng ống dưới dòng khí nitrogen ở nhiệt độ không quá 30 °C. Hòa tan cặn trong 1,5 ml acetonitril (TT).

Các dung dịch thu được sau khi làm sạch lần lượt là dung dịch chuẩn sau làm sạch, dung dịch thử (1) sau làm sạch và dung dịch thử (2) sau làm sạch được sử dụng để tiêm vào hệ thống sắc ký thứ hai như sau:

Cột kích thước (15 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 265 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 200 µl.

Pha động: Dung dịch B.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn sau làm sạch, độ phân giải giữa pic cholecalciferol và pic ergocalciferol không nhỏ hơn 1,4; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic cholecalciferol thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng vitamin D (µg/g) trong mẫu thử theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng vitamin D (µg/g)} = (R_U/R_S) \times (C_S/C_U)$$

R_S : Tỷ lệ giữa diện tích pic cholecalciferol và diện tích pic chuẩn nội trong dung dịch chuẩn sau làm sạch.

C_S : nồng độ cholecalciferol chuẩn trong dung dịch chuẩn sau làm sạch ($\mu\text{g/ml}$).

C_U : nồng độ dầu trong dung dịch thử (2) sau làm sạch (g/ml).

R_U : Tỷ lệ giữa diện tích pic cholecalciferol và diện tích pic chuẩn nội trong dung dịch thử (2) sau làm sạch, được tính như sau:

$$R_U = r_{u2} / [r_{is2} - (r_{is1} \times r_{u2} / r_{u1})]$$

r_{u2} : diện tích pic của cholecalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử (2) sau làm sạch.

r_{is2} : diện tích pic của chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch thử (2) sau làm sạch.

r_{is1} : diện tích pic của chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch thử (1) sau làm sạch.

r_{u1} : diện tích pic của cholecalciferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử (1) sau làm sạch.

(Nếu $r_{is1} = 0$ do không có pic tại vị trí chất chuẩn nội trên sắc ký đồ của dung dịch thử (1) sau làm sạch, thì $R_U = r_{u2} / r_{is2}$)