

Các chuyên luận
CAO DƯỢC LIỆU,
DẦU, TINH DẦU

CAO ĐẶC ACTISÔ***Extractum Cynarae spissum***

Cao đặc actisô được bào chế từ lá cây Actisô (*Cynara scolymus* L.) họ Cúc (Asteraceae) theo phương pháp thích hợp, để chế phẩm có hàm lượng cynarin ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Cao đặc actisô có thể chất mềm, đồng nhất. Màu nâu sẫm. Mùi đặc biệt. Vị hơi mặn chát và hơi đắng.

Định tính

A. Hòa tan 0,5 g chế phẩm trong khoảng 20 ml *ethanol* 96 % (TT), lọc. Dung dịch lọc A.

Lấy 1 ml dịch lọc A cho vào ống nghiệm, thêm 0,1 g bột *magnesi* (TT) và 2 ml *acid hydrochloric* (TT), để yên, xuất hiện màu hồng đến đỏ.

Lấy 1 ml dịch lọc A cho vào một ống nghiệm, thêm 0,5 ml *dung dịch acid hydrochloric* 1 N (TT) và 0,5 ml *dung dịch natri nitrit* 10 % (TT). Để lạnh ở 10 °C trong khoảng 20 min. Thêm 2 ml *dung dịch natri hydroxyd* 10 % (TT), sẽ xuất hiện màu hồng bền vững.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Acid formic khan - acid acetic khan - nước - ethyl acetat (5 : 5 : 10 : 100).

Dung dịch thử: Dịch lọc A được cô tới gần, hòa lẫn trong 10 ml ethanol 60 % (TT), lắc với 5 ml ethyl acetat (TT), tách lấy dịch chiết ethyl acetat làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan cynarin trong methanol (TT) để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 15 µl dung dịch thử và 10 µl dung dịch đối chiếu. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch natri nitrit 10 % (TT) sau đó vài phút phun dung dịch natri hydroxyd 10 % (TT).

Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử phải có một vết màu vàng (flavonoid) có giá trị R_f khoảng 0,30 và một vết màu hồng (giá trị R_f khoảng 0,55) tương đương với vết cynarin chuẩn trong sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu.

Cẩn không tan trong nước

Hòa tan 1,0 g chế phẩm trong 50 ml *nước cất*, lọc, rửa cặn bằng *nước cất* đến khi nước rửa không màu, thu cặn và sấy khô ở 100 °C đến 105 °C đến khối lượng không đổi. Lượng cặn không được quá 3,0 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

pH

Dung dịch cao đặc actisô 1 % (kl/tt) trong *nước* phải có pH từ 5,0 đến 6,0 (Phụ lục 6.2).

Mất khối lượng do làm khô

Không quá 20,0 %. Dùng 1,0 g chế phẩm sấy ở 70 °C đến khối lượng không đổi (Phụ lục 9.6).

Tro toàn phần

Không quá 35,0 %. Dùng 1,0 g chế phẩm (Phụ lục 9.8).

Định lượng

Cần khoảng 0,800 g cao, cho vào ống ly tâm và thêm 10 ml *nước cất*, trộn thật đều. Thêm 20 ml *dung dịch chì acetat* 10 % (TT), lắc đều và ly tâm với tốc độ 3000 r/min, trong 15 min. Gạn bỏ nước, trộn đều cặn với 5 ml *dung dịch acid acetic* 10 % (TT) rồi thêm 25 ml *dung dịch acid sulfuric* 1 N (TT). Chuyển hết dung dịch vào bình định mức màu nâu 100 ml, lắc đều trong 60 min, sau đó thêm *nước cất* đến vạch. Lấy 20 ml dung dịch này cho vào ống ly tâm và ly tâm với tốc độ 3000 r/min, trong 15 min. Lấy chính xác 2 ml dịch trong ở phía trên, cho vào bình định mức 50 ml. Thêm *methanol* (TT) đến vạch. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 325 nm (Phụ lục 3.1), dùng *methanol* (TT) làm mẫu trắng. Tính hàm lượng cynarin theo A (1 %, 1 cm), lấy 616 là giá trị A (1 %, 1 cm) của cynarin ở bước sóng 325 nm. Hàm lượng cynarin ($C_{25}H_{24}O_{12}$) không được nhỏ hơn 2,5 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, chống ẩm. Để nơi khô, mát.

CAO ĐẶC DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG***Extractum Phyllanthi amari spissum***

Cao đặc diệp hạ châu đắng được bào chế từ lá cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.) họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) bằng phương pháp thích hợp để chế phẩm có hàm lượng phyllanthin ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Thế chất mềm, dẻo, đồng nhất. Màu nâu sẫm đến đen. Mùi hương đặc biệt. Vị rất đắng.

Định tính

A. Lấy 0,5 g chế phẩm, thêm 50 ml *ethanol* 90 % (TT), lắc đều, đun hồi lưu trong cách thủy 30 min. Lọc, bay hơi dịch lọc trên cách thủy đến còn khoảng 10 ml, chuyển vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 2 ml dịch chiết để làm các phản ứng sau đây: Ống 1: Thêm 4 - 5 giọt *acid hydrochloric* (TT), rồi thêm một ít bột *magnesi* (TT), xuất hiện màu đỏ.

Ống 2: Thêm 3 - 4 giọt *dung dịch sắt* (III) *clorid* 9 % (TT), xuất hiện màu xanh tím.

B. Lấy 0,1 g chế phẩm, thêm 5 ml *nước*, đun sôi trong vài phút rồi lọc. Để nguội, lấy 2 ml dịch lọc thêm 2 - 3 giọt *dung dịch gelatin* 1 % (TT), xuất hiện tủa bông trắng.

C. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel 60F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Cloroform - methanol (7 : 3).

Dung dịch thử: Lấy 0,5 g chế phẩm, hòa tan trong 20 ml nước nóng, để nguội, kiềm hóa bằng amoniac (TT) đến pH 9 - 10, lắc dung dịch thu được với cloroform (TT) 2 lần, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform, bay hơi trên cách thủy đến còn khoảng 2 ml, dùng làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 5 g Diệp hạ châu đắng (mẫu chuẩn), thêm 100 ml nước, đun sôi nhẹ trong 30 min, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến còn 20 ml, để nguội, kiểm hóa bằng amoniac (TT) đến pH 9 - 10, lắc dung dịch thu được với cloroform (TT) 2 lần, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform, bay hơi trên cách thủy đến còn khoảng 2 ml, dùng làm dung dịch đối chiếu.

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên cùng bản mỏng 20 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí rồi phun thuốc thử Dragendorff (TT). Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

D. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel 60F₂₅₄.

Dung môi khai triển: n-Hexan - ethyl acetat (2 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 0,4 g chế phẩm, hòa tan trong 20 ml nước nóng, để nguội, lắc kỹ dung dịch thu được với cloroform (TT) 2 lần, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform, bay hơi trên cách thủy đến gần, hòa tan còn trong 1 ml ethanol (TT), dùng làm dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu (1): Lấy 4 g Diệp hạ châu đắng đã cắt nhỏ (mẫu chuẩn), thêm 100 ml nước, đun sôi nhẹ trong 30 min, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến còn 20 ml, để nguội, lắc dịch thu được với cloroform (TT) 2 lần, mỗi lần 20 ml. Gộp các dịch chiết cloroform, bay hơi trên cách thủy đến gần, hòa tan còn trong 1 ml ethanol (TT).

Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan phyllanthin chuẩn trong ethanol (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 2 mg/ml.

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên cùng bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí rồi phun dung dịch acid sulfuric 10 % (TT). Sấy bản mỏng ở 120 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường hoặc ánh sáng tử ngoại tại bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử phải có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) và (2).

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 20,0 % (Phụ lục 9.6, 1 g, 85 °C, 5 h).

Tro toàn phần

Không được quá 10,0 % (Phụ lục 9.8).

Tro không tan trong acid hydrocloric

Không được quá 0,15 % (Phụ lục 9.7).

Cẩn không tan trong nước

Hòa tan 1,0 g chế phẩm trong 50 ml nước cất nóng, lọc qua giấy lọc đã cân bì, rửa cẩn và giấy lọc bằng nước cất cho tới khi nước rửa không màu, sấy cẩn và giấy lọc ở 100 °C đến 105 °C trong 3 h, lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 min, cân nhanh để xác định khối lượng cẩn. Lượng cẩn không được quá 1,0 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

pH

Dung dịch chế phẩm 1,0 % trong nước phải có pH từ 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 6.2).

Kim loại nặng

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 9.4.8).

Lấy 1 g chế phẩm, tiến hành theo phương pháp 3. Dùng 2 ml dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT) để chuẩn bị mẫu đối chiếu.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động:

Pha động A: Methanol (TT).

Pha động B: Dung dịch acid phosphoric 0,1 % (TT).

Dung dịch chuẩn: Hoà tan phyllanthin chuẩn trong methanol (TT) để được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 30 μ g/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,2 g chế phẩm đã xác định độ ẩm vào bình định mức dung tích 50 ml, thêm 5 ml nước, lắc kỹ để phân tán mẫu đều. Thêm 30 ml methanol (TT), lắc siêu âm trong 30 min. Để nguội, bổ sung methanol (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm $\times$ 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 μ m).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 230 nm.

Tốc độ dòng: 1,3 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 - 25	65	35
25 - 26	65 $\rightarrow$ 80	35 $\rightarrow$ 20
26 - 34	80	20
34 - 35	80 $\rightarrow$ 65	20 $\rightarrow$ 35
35 - 45	65	35

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Ghi sắc ký đồ. Tính hàm lượng phyllanthin trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng C₂₄H₃₄O₆ trong phyllanthin chuẩn. Hàm lượng phyllanthin (C₂₄H₃₄O₆) không được ít hơn 0,5 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Bảo quản trong bao bì hút chân không, chống ẩm. Để nơi khô, mát.

CAO ĐẶC ĐÌNH LĂNG

Extractum Polysciacis fruticosae spissum

Cao đặc đình lăng được điều chế từ rễ cây Đình lăng (*Polyscias fruticosa* Harms), họ Nhân sâm (*Araliaceae*) bằng phương pháp thích hợp để chế phẩm có hàm lượng acid oleanolic ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Thế chất mềm dẻo, đồng nhất, màu nâu đen, mùi thơm.

Định tính

A. Hòa tan 1 g chế phẩm trong 20 ml *methanol* (TT) bằng cách dùng đũa thủy tinh khuấy kỹ, lắc siêu âm trong 15 min, lọc. Dung dịch lọc A.

Cho 5 ml dịch lọc A vào ống nghiệm, cô cạn, thêm 10 ml nước cất, bịt miệng ống nghiệm, lắc trong 15 s. Xuất hiện cặn bột bên ít nhất trong vòng 10 min.

Cho 1 ml dịch lọc A vào ống nghiệm sạch, cô cạn, hòa tan cân bằng 1 ml *cloroform* (TT). Thêm 1 ml *anhydrid acetic* (TT), thêm từ từ theo thành ống 1 ml *acid sulfuric* (TT). Xuất hiện vòng có màu từ hồng đến tím đậm giữa 2 lớp dung dịch.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel 60GF₂₅₄* đã hoạt hoá ở 100 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: *n-Butanol - acid acetic - nước* (4 : 1 : 5), lắc hỗn hợp trong 5 min, để yên, lấy lớp trên.

Dung dịch thử: Lấy 10 ml dịch lọc A cô đến cạn, hòa cân với 10 ml nước cất. Lắc dung dịch thu được với *diethyl ether* (TT) cho đến khi lớp ether không màu hoặc màu rất nhạt. Tiếp tục lắc lớp nước hai lần, mỗi lần với 10 ml *n-butanol bão hòa nước* (TT), gộp dịch chiết *n-butanol*, bốc hơi trên cách thủy đến cạn. Hòa cân với 1 ml *methanol* (TT) được dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 10 g rễ Đình lăng (mẫu chuẩn) đã cắt nhỏ, đun hồi lưu trên cách thủy sôi với 30 ml *methanol* (TT) trong 2 h, lọc. Lấy dịch *methanol* cất thu hồi dung môi và cô trên cách thủy đến cạn. Tiếp tục tiến hành chiết như mô tả tại phần Dung dịch thử, bắt đầu từ "hòa cân với 10 ml nước cất...".

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch *acid sulfuric* 10 % trong *ethanol* (TT), sấy bản mỏng ở 105 °C cho tới khi hiện rõ vết. Quan sát dưới ánh sáng thường và dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

C. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel 60GF₂₅₄* đã hoạt hoá ở 100 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: *Toluen - ethyl acetat* (7 : 3).

Dung dịch thử: Lấy 0,1 g chế phẩm, thêm 10 ml dung dịch *acid hydrochloric* 4 M (TT), đun hồi lưu trong 4 h. Để nguội, lọc, lắc dịch lọc 3 lần, mỗi lần với 10 ml *cloroform* (TT). Rửa dịch *cloroform* với nước cất đến pH trung tính. Tập trung dịch chiết *cloroform* và bốc hơi trên cách thủy đến còn khoảng 1 ml.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch *acid oleanolic* chuẩn 0,1 % trong *cloroform* (TT).

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch *acid sulfuric* 10 % trong *ethanol* (TT), sấy bản mỏng ở 105 °C cho tới khi hiện rõ vết. Quan sát dưới ánh sáng thường và dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết có cùng màu và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 20,0 % (Phụ lục 9.6, 1 g, 105 °C đến khối lượng không đổi).

Kim loại nặng

Không được quá 20 phần triệu.

Tiến hành phép thử giới hạn kim loại nặng (Phụ lục 9.4.8, phương pháp 3), sử dụng 1 g chế phẩm và 2 ml dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu Pb (TT).

Định lượng acid oleanolic

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: *Acetonitril - nước* (80 : 20).

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 5 g chế phẩm vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 40 ml dung dịch *acid hydrochloric* 4 M (TT), lắc siêu âm 10 min. Đun sôi hồi lưu trong 3 h, để nguội, lọc dịch thủy phân lấy cân. Dung 30 ml nước (chia làm 3 lần) tráng bình thủy phân và gộp nước rửa và lọc qua giấy lọc trên. Dung nước để rửa giấy lọc và cân đến khi nước rửa trung tính (thử bằng giấy quỳ). Sấy cân và giấy lọc ở 60 °C đến khô (khoảng 2 h). Thêm vào cân 30 ml *cloroform* (TT), đun sôi nhẹ trên cách thủy 5 min, lọc. Chiết lại cân như trên 2 lần nữa, tập trung các dịch chiết *cloroform*, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cân vừa đủ trong 5 ml *methanol* (TT), trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg acid oleanolic chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 8 ml *methanol* (TT), lắc kỹ để hòa tan, bổ sung *methanol* (TT) vừa đủ đến vạch, trộn đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) hoặc tương đương (cột Inertsil C18 là thích hợp).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 205 nm.

Tốc độ dòng: 1,3 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Tính hàm lượng acid oleanolic dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ của dung dịch acid oleanolic chuẩn.

Hàm lượng acid oleanolic (C₃₀H₄₈O₃) trong chế phẩm không được ít hơn 0,04 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, chống ẩm. Để nơi khô ráo, mát.

CAO ĐẶC ÍCH MẪU***Extractum Leonuri japonici spissum***

Cao đặc ích mẫu được bảo chế từ phần trên mặt đất của cây ích mẫu (*Leonurus japonicus* Houtt.), họ Bạc hà (Lamiaceae) bằng phương pháp thích hợp để chế phẩm có hàm lượng stachydrin ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Khối đồng nhất, màu đen, thể chất mềm, dẻo. Mùi hăng đặc biệt. Vị đắng.

Định tính

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel G*.

Dung môi khai triển: *n-Butanol - acid hydrochloric - ethyl acetat* (8 : 2 : 0,5).

Dung dịch thử: Lấy 3 ml dung dịch thử thu được trong phần Định lượng, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa cần trong 0,5 ml *ethanol* (TT) được dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu (1): Cân chính xác khoảng 1 g bột thô ích mẫu (mẫu chuẩn), chuyển vào túi giấy lọc, đặt vào bình Soxhlet và tiến hành chiết bằng *ethanol* (TT) trong khoảng 4 h. Lấy dịch chiết *ethanol*, cô dưới áp suất giảm đến còn khoảng 5 ml, chuyển vào cột chứa *nhôm oxyd trung tính* (TT) đã được chuẩn bị trước (lấy 10 g *nhôm oxyd trung tính* (TT), nhồi ướt bằng *ethanol* 95 % (TT) vào cột thủy tinh có khóa đường kính trong khoảng 1,5 - 1,8 cm để có chiều cao khoảng 4 cm trong cột). Rửa giải bằng 200 ml *ethanol* (TT), tập trung dịch rửa giải vào bình cầu 250 ml, cô cạn dưới áp suất giảm. Hòa tan cần trong 3 ml *ethanol* (TT), được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan stachydrin hydroclorid chuẩn trong *ethanol* (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 1 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun thuốc thử Dragendorff (TT) đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng giá trị R_f và màu sắc với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) và (2).

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 20,0 % (Phụ lục 9.6, 1 g, 85 °C, 5 h).

Tro toàn phần

Không được quá 30,0 % (Phụ lục 9.8).

Tro không tan trong acid

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 9.7).

Cặn không tan trong nước

Không được quá 10,0 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Hòa tan 1,0 g chế phẩm trong 50 ml nước cất nóng, lọc qua giấy lọc đã cân bì trước, rửa giấy lọc và cặn bằng nước cất

nóng đến khi nước rửa không màu, sấy cần và giấy lọc ở 100 - 150 °C trong 3 h, để nguội trong bình hút ẩm 30 min, cân nhanh để xác định khối lượng.

pH

5,0 đến 7,0 (Phụ lục 6.2).

Dùng dung dịch chế phẩm 1,0 % trong nước để đo.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

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

Dung dịch chuẩn: Hòa tan stachydrin hydroclorid trong *ethanol* (TT) để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,6 mg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài dung tích 100 ml, thêm 3 ml nước, lắc siêu âm để mẫu phân tán đều, thêm 60 ml *ethanol* (TT), lắc siêu âm trong 5 min, đun sôi hồi lưu trong cách thủy 2 h, để nguội, lọc lấy dịch lọc. Tráng rửa bình và giấy lọc bằng 150 ml *ethanol* (TT), gộp dịch rửa vào dịch lọc trên, cô dưới áp suất giảm đến còn khoảng 5 ml, chuyển vào cột chứa *nhôm oxyd trung tính* (TT) đã được chuẩn bị trước (lấy 10 g *nhôm oxyd trung tính* (TT), nhồi ướt bằng *ethanol* 95 % (TT) vào trong cột thủy tinh có khóa, đường kính 1,5 cm đến 1,8 cm để có chiều cao khoảng 4 cm trong cột). Rửa giải bằng 200 ml *ethanol* (TT), tập trung dịch rửa giải vào bình cầu 250 ml, cô cạn dưới áp suất giảm. Hòa tan cần vừa đủ trong 20 ml hỗn hợp *acetonitril - dung dịch acid acetic* 0,1 % (8 : 2), lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (15 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh aminopropyl liên kết silica gel (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại ở bước sóng 203 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành: Tiêm riêng biệt dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Dựa vào diện tích pic thu được từ dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng $C_7H_{13}NO_2.HCl$ trong stachydrin hydroclorid chuẩn, tính hàm lượng stachydrin hydroclorid trong chế phẩm.

Hàm lượng stachydrin hydroclorid không ít hơn 1,2 % ($C_7H_{13}NO_2.HCl$) tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, để nơi khô mát.

CAO KHÔ CHÈ DÂY***Extractum Ampelopsis siccus***

Cao khô chè dây được điều chế từ lá của cây Chè dây (*Ampelopsis cantoniensis* Planch.), họ Nho (Vitaceae) bằng phương pháp thích hợp để chế phẩm có tổng hàm lượng myricetin và dihydromyricetin ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Bột màu vàng nâu, vị đắng hơi chát.

Định tính

A. Lấy khoảng 1,0 g bột chế phẩm cho vào một ống nghiệm, thêm 10 ml *ethanol* 90 % (TT), lắc kỹ, đặt trên cách thủy khoảng 1 min cho tan, lọc. Lấy 1 ml dịch chiết cho vào ống nghiệm nhỏ, thêm một ít bột *magnesi* (TT) và 2 giọt *acid hydrochloric* (TT), dung dịch xuất hiện màu đỏ.
B. Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Điều kiện sắc ký: Dung dịch thử: Chuẩn bị như mục Định lượng.

Dung dịch chuẩn (1): Hòa tan dihydromyricetin chuẩn trong *methanol* (TT) để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,2 mg/ml.

Dung dịch chuẩn (2): Hòa tan myricetin chuẩn trong *methanol* (TT) để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,01 mg/ml.

Tiêm lần lượt dung dịch thử và các dung dịch chuẩn (1) và (2) vào hệ thống sắc ký theo các điều kiện đã nêu, ghi sắc ký đồ.

Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho 2 pic có thời gian lưu tương tự với thời gian lưu của pic dihydromyricetin và myricetin trên sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn (1) và (2).

C. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel GF₂₅₄* tráng sẵn (TT), hoạt hóa bản mỏng ở 105 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: *Toluen* - *ethyl acetat* - *aceton* - *acid formic* (5 : 2 : 2 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 0,1 g chế phẩm, thêm 10 ml *ethanol* (TT), lắc siêu âm trong 10 min, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 1 ml *ethanol* (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 1 g bột lá Chè dây (mẫu chuẩn), thêm 50 ml *ethanol* 70 % (TT), đun hồi lưu trên cách thủy 30 min, lọc, chiết lại bã như trên 1 lần nữa. Tập trung dịch chiết *ethanol*, cô trên cách thủy đến cạn. Khuấy kỹ cặn với *n-butanol* (TT) 3 lần, mỗi lần 10 ml, lọc, gộp dịch lọc *butanol*, cất thu hồi dung môi đến cạn, cô trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 1 ml *ethanol* (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 12 cm đến 14 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun hỗn hợp dung dịch *acid boric* (TT) 10 % và dung dịch *acid oxalic* (TT) 10 % (2 : 1) và sấy bản mỏng ở 100 °C đến khi xuất hiện các vết. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu và cùng giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Mất khối lượng do làm khô

Không quá 5,0 % (Phụ lục 9.6, 1 g, 100 °C, đến khối lượng không đổi).

Kim loại nặng

Không quá 25 phần triệu (Phụ lục 9.4.8, phương pháp 3). Dùng 1,0 g chế phẩm và 2,5 ml dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu Pb (TT).

Tro sulfat

Không quá 10,0 % (Phụ lục 9.9).

Giới hạn nhiễm khuẩn

Đáp ứng yêu cầu về Giới hạn nhiễm khuẩn đối với thuốc đông dược có nguồn gốc từ động, thực vật (Phụ lục 13.6, phương pháp đĩa thạch).

Tổng số vi sinh vật hiếu khí: Không quá 10^4 CFU/g.

Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g.

Không được có vi khuẩn gây bệnh *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Cân chính xác khoảng 5 g chế phẩm vào bình nón nút mài 200 ml đã được tiệt trùng và đã cân bì. Thêm một lượng dung dịch *natri clorid* 0,9 % vô trùng vừa đủ để thu được dung dịch có nồng độ 10^{-1} , lắc đều. Từ dung dịch trên pha loãng thành các dung dịch có nồng độ 10^{-2} , 10^{-3} ... rồi tiến hành thử theo Phụ lục 13.6.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: *Acetonitril* - dung dịch *acid phosphoric* 0,01 M (25 : 75).

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1 g chế phẩm cho vào một bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml *methanol* (TT), lắc siêu âm 15 min, để nguội, thêm *methanol* (TT) đến vạch, lắc đều. Ly tâm lấy dịch trong, hút chính xác 2 ml dịch trong ở phía trên cho vào bình định mức 25 ml, thêm *methanol* (TT) đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan dihydromyricetin và myricetin chuẩn trong *methanol* (TT) để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 0,04 mg dihydromyricetin trong 1 ml và 0,025 mg myricetin trong 1 ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (250 mm × 4 mm), nhồi pha tinh C (5 µm). Cột Lichrosorb RP 18 là thích hợp.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 260 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng.

Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu. Dựa vào diện tích pic của dihydromyricetin và myricetin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử, nồng độ các dung dịch chuẩn để tính hàm lượng dihydromyricetin và myricetin trong chế phẩm.

Tổng hàm lượng dihydromyricetin ($C_{15}H_{12}O_8$) và myricetin ($C_{15}H_{10}O_8$) không dưới 30,0 % (theo khối lượng) tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Bảo quản trong bao bì kín, để nơi khô ráo thoáng mát.

CAO KHÔ HUYẾT GIÁC***Extractum Dracaenae siccus***

Cao khô Huyết giác được điều chế từ phần gỗ có chứa nhựa của cây Huyết giác *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep hoặc *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S.C.Chen, họ Huyết giác (Dracaenaceae) bằng cách chiết bằng ethanol 96 % hay bằng dung môi thích hợp khác. Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Bột màu nâu đỏ, mùi thơm nhẹ đặc trưng, vị hơi chát. Không tan trong nước, ether và các dung dịch acid loãng; tan trong methanol, ethanol và các dung dịch kiềm loãng.

Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel HF₂₅₄ chứa 0,3 % natri carboxymethylcellulose, hoạt hóa ở 105 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: Cloroform - methanol (99 : 1).

Dung dịch thử: Lấy khoảng 0,5 g chế phẩm, thêm 25 ml ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) (TT) lắc siêu âm trong 15 min. Để nguội, lọc, giữ lại cặn cho phép thử B. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn, hòa cặn trong 1 ml cloroform (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 3 g bột Huyết giác (mẫu chuẩn) cho vào bình nón, thêm 20 ml ethanol 96 % (TT), lắc siêu âm trong 15 min, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Thêm vào cặn 25 ml ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) (TT) lắc siêu âm trong 15 min. Để nguội, lọc, giữ lại cặn cho phép thử B. Cô dịch lọc trên cách thủy đến cạn, hòa cặn trong 1 ml cloroform (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol. Sấy bản mỏng ở 110 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel HF₂₅₄ chứa 0,3 % natri carboxymethylcellulose, hoạt hóa ở 105 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: Ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) - ethyl acetat (10 : 1).

Dung dịch thử: Lấy cặn thu được ở phần dung dịch thử trong phép thử A, để trên cách thủy cho bay hơi hết ether dầu hỏa, thêm 25 ml ethyl acetat (TT), lắc siêu âm trong 15 min, để nguội, lọc. Cô dịch lọc trên cách thủy đến khi còn khoảng 5 ml, để nguội rồi chuyển lên cột thủy tinh đường kính khoảng 10 mm có chứa 1 g chất nhồi polyamid đã được xử lý, kích thước hạt 14 - 20 µm, được nhồi ướt. Rửa giải bằng 100 ml ethanol 50 % (TT) với tốc độ 1,5 ml/min, loại bỏ dịch rửa giải. Tiếp tục rửa giải bằng 50 ml ethanol (TT) với tốc độ 1,5 ml/min, gộp

dịch rửa giải, cô trên cách thủy đến cạn, hòa cặn trong 1 ml cloroform (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy cặn thu được ở phần dung dịch đối chiếu trong phép thử A, tiến hành chiết như mô tả ở phần Dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol (TT). Sấy bản mỏng ở 110 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Xử lý polyamid: Lấy polyamid vào cốc có mỏ, thêm ethanol 96 % (TT) ngập bề mặt, khuấy đều, sau khi hết bọt khí thì chuyển toàn bộ hỗn hợp vào cột thủy tinh có khóa, đường kính thích hợp (từ 10 mm trở lên), dùng ethanol 90 - 95 % (TT) để rửa cho đến khi dịch rửa trong suốt. Rửa tiếp bằng hỗn hợp dung dịch natri hydroxyd 5 % - nước cất (2,5 : 1) có chứa 2,5 % acid acetic (TT), cuối cùng rửa bằng nước cất đến khi nước rửa trung tính, lấy polyamid đã rửa ra để khô ở nhiệt độ phòng.

C. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel 60F₂₅₄, hoạt hóa ở 105 °C trong 30 min.

Dung môi khai triển: Toluen - ethyl acetat (9 : 1).

Dung dịch thử: Hòa tan 0,15 g chế phẩm trong 10 ml ethanol 96 % (TT) được dung dịch chấm sắc ký.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 1 g bột Huyết giác (mẫu chuẩn) cho vào bình nón, thêm 10 ml ethanol 96 % (TT), lắc siêu âm trong 10 min, lọc, dùng dịch lọc làm dung dịch chấm sắc ký.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol (TT). Sấy bản mỏng ở 110 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng ở ánh sáng thường và dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

D. Trong phần định lượng, sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic có cùng thời gian lưu với thời gian lưu của pic loureirin B trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Độ hấp thụ

Cân chính xác khoảng 20 mg chế phẩm vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml ethanol (TT), lắc kỹ để hòa tan, thêm ethanol (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc. Loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu, hút chính xác 5,0 ml dịch lọc sau vào bình định mức 100 ml, thêm ethanol (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều. Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được (Phụ lục 4.1) ở bước sóng 284 nm, mẫu trắng là ethanol (TT).

Độ hấp thụ đo được không được dưới 0,40.

Cẩn không tan trong ethanol

Không được quá 1,5 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Cân chính xác khoảng 1,0 g chế phẩm vào bình nón nút mài 100 ml, thêm 50 ml *ethanol* (TT), ngâm trong 30 min, tiếp tục lắc mạnh để hòa tan trong 20 min. Lọc qua giấy lọc (đã được sấy ở 105 °C trong 3 h và cân trước), rửa cân bằng *ethanol* (TT) đến khi dịch lọc không màu. Sấy giấy lọc và cân ở 105 °C trong 3 h. Để nguội trong bình hút ẩm 30 min và cân nhanh.

Tro toàn phần

Không được quá 1,0 % (Phụ lục 9.8, phương pháp 1).

Kim loại nặng

Không quá 20 phần triệu (Phụ lục 9.4.8).

Lấy 1 g chế phẩm, tiến hành thử theo phương pháp 3. Dùng 2 ml dung dịch chỉ màu 10 phần triệu Pb (TT) để chuẩn bị dung dịch đối chiếu.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 7,0 % (Phụ lục 9.6).

(1 g; 100 °C; 5 h).

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Dung dịch acid acetic 1 % - acetonitril (61 : 39), điều chỉnh tỷ lệ nếu cần.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 3,5 g chế phẩm vào bình định mức 50 ml, thêm 40 ml *methanol* (TT), lắc siêu âm trong 15 min, để nguội, thêm *methanol* (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu, hút chính xác 5,0 ml dịch lọc sau vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan Loureirin B chuẩn trong *methanol* (TT) để được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,45 mg/ml. Hút chính xác 5,0 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml, thêm pha động vừa đủ đến vạch, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (250 mm × 4,6 mm), nhồi pha tĩnh C (5 µm) hoặc tương đương. Cột Inertsil ODS-3 là thích hợp. Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 276 nm.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành:

Tiêm riêng biệt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã nêu, ghi lại thời gian lưu, diện tích của pic loureirin B. Dựa vào diện tích pic của loureirin B trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng $C_{18}H_{26}O_5$ trong loureirin B chuẩn để tính hàm lượng loureirin B trong chế phẩm.

Hàm lượng loureirin B ($C_{18}H_{26}O_5$) trong chế phẩm không ít hơn 0,45 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, để nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh sáng.

CAO KHÔ LÁ BẠCH QUẢ

Extractum Folii Ginkgo siccus

Cao khô lá bạch quả được bào chế từ lá cây Bạch quả (*Ginkgo biloba* L.), họ Bạch quả (*Ginkgoaceae*) theo phương pháp thích hợp để chế phẩm có hàm lượng flavonol glycosid và terpen lacton ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Cao thuốc" (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Bột có màu nâu vàng nhạt hoặc nâu đậm. Vị hơi đắng.

Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G60F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Ethyl acetat - butan-2-on - acid formic - nước (5 : 3 : 1 : 1).

Dung dịch thử: Lấy 0,2 g chế phẩm, thêm 15 ml *n-butanol* (TT), ngâm trong cách thủy âm 15 min, thỉnh thoảng lắc đều, để nguội, lọc, bay hơi dịch lọc tới gần khô. Hòa tan cặn trong 6 ml *ethanol* 95 % (TT) được dung dịch thử.

Dung dịch đối chiếu: Lấy 0,2 g cao khô Bạch quả (mẫu chuẩn), chiết bằng cách tương tự như dung dịch thử, được dung dịch đối chiếu.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt 10 µl mỗi dung dịch trên lên bản mỏng. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra để khô trong không khí, phun dung dịch nhôm clorid 3 % trong *ethanol* (TT), sấy bản mỏng ở 120 °C trong 10 min. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm. Các vết phát huỳnh quang thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel 60 F₂₅₄ tráng sẵn nhúng khoảng 2 s trong dung dịch gồm 8 g natri acetat (TT) hòa trong 200 ml *methanol* (TT), sau đó sấy ở 70 °C trong 10 min.

Dung môi khai triển: Toluen - ethyl acetat - aceton - *methanol* (10 : 5 : 5 : 0,6).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt 15 µl mỗi dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong mục Terpen lacton lên bản mỏng. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng, phun anhydrid acetic (TT), sấy bản mỏng ở 160 °C trong 10 min, để nguội. Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm.

Các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

C. Trong phần Định lượng flavonol glycosid toàn phần: Thời gian lưu của các pic quercetin, isorhamnetin và kaempferol trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng với thời gian lưu của các chất đó trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Tỷ lệ diện tích pic của quercetin và kaempferol là 0,8 đến 1,2 và tỷ lệ diện tích pic của isorhamnetin và quercetin phải lớn hơn 0,15.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5,0 % (Phụ lục 12.16, dùng 1 g chế phẩm để tiến hành thử).

Cẩn sau khi nung

Không được quá 0,8 %.

Lấy một chén sứ hoặc chén platin nung tới đỏ trong 30 min. Để nguội trong bình hút ẩm rồi cân. Lấy chính xác 1 g chế phẩm rải đều vào chén nung, đốt nhẹ để than hóa hoàn toàn, để nguội, làm ẩm cân bằng 0,5 ml đến 1 ml *acid sulfuric* (TT). Đốt nhẹ cho đến khi không còn khói trắng bay lên, rồi đem nung trong lò nung ở 500 °C đến 600 °C cho đến khi vô cơ hóa hoàn toàn (cân màu trắng hay xám nhạt). Để nguội trong bình hút ẩm và cân, nung lại ở 500 °C đến 600 °C đến khối lượng không đổi.

Kim loại nặng

Không được quá 20 phần triệu.

Tiến hành phép thử giới hạn kim loại nặng (Phụ lục 9.4.8, phương pháp 3), sử dụng 1 g chế phẩm và 2 ml *dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu Pb* (TT) để chuẩn bị dung dịch đối chiếu.

Acid ginkgolic toàn phần

Không được quá 10 phần triệu tính theo chế phẩm khô kiệt. Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - dung dịch acid acetic băng 1 % (90 : 10).

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 g chế phẩm vào bình nón nút mài, thêm chính xác 50 ml *ether dầu hòa* (60 °C đến 90 °C) (TT) và cân. Đun hồi lưu trong 2 h, để nguội, cân lại, bù khối lượng bị mất bằng *ether dầu hòa* (60 °C đến 90 °C) (TT), lắc kỹ, lọc. Lấy chính xác 25 ml dịch lọc, thu hồi dung môi tới khô trong chân không, thêm chính xác 2 ml *methanol* (TT), đậy kín và lắc đều.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan một lượng acid ginkgoneolic chuẩn trong *methanol* (TT) để có dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 5 µg/ml.

Hòa tan một lượng acid ginkgolic toàn phần trong *methanol* (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 100 µg/ml để làm dung dịch chuẩn cho việc nhận dạng các pic.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (10 µm) hoặc tương đương (cột RP 18 là thích hợp).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 310 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn. Tính số đĩa lý thuyết của cột. Số đĩa lý thuyết của cột không được ít hơn 4000 tính theo pic acid ginkgoneolic.

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Xác định tổng diện tích pic của các acid ginkgolic trong dung dịch thử, xác định những pic này bằng cách đối chiếu với những pic tương ứng thu được trên sắc ký đồ của

dung dịch chuẩn chứa acid ginkgolic toàn phần, tính hàm lượng acid ginkgolic toàn phần theo acid ginkgoneolic.

Định lượng flavonol glycosid toàn phần

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - dung dịch acid phosphoric 0,4 % (55 : 45).

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 35 mg chế phẩm, thêm 25 ml hỗn hợp *methanol* (TT) và *dung dịch acid hydrochloric 25 %* (TT) (4 : 1). Đun hồi lưu trên cách thủy trong 30 min, làm nguội đến nhiệt độ phòng ngay lập tức, chuyển toàn bộ hỗn hợp vào bình định mức 50 ml, pha loãng bằng *methanol* (TT) tới vạch, lắc đều, lọc, dùng dịch lọc làm dung dịch thử.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan lần lượt quercetin chuẩn, kaempferol chuẩn và isorhamnetin chuẩn trong *methanol* (TT) để có dung dịch có nồng độ chính xác lần lượt khoảng 30 µg, 30 µg và 20 µg/ml mỗi chất trên. Hoặc cân chính xác 35 mg cao khô Bạch quả chuẩn đã biết hàm lượng quercetin, kaempferol và isorhamnetin, tiến hành theo như mô tả ở mục *Dung dịch thử* để chuẩn bị dung dịch chuẩn.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) hoặc tương đương (cột RP 18 là thích hợp).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 360 nm.

Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn. Tính số đĩa lý thuyết của cột. Số đĩa lý thuyết của cột không được ít hơn 2500 tính theo pic quercetin.

Tiến hành sắc ký lần lượt dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Tính hàm lượng quercetin, kaempferol và isorhamnetin dựa vào diện tích các pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn, sau đó chuyển đổi thành hàm lượng flavonol glycosid toàn phần (X %) theo công thức (1) sau đây:

$$X(\%) = (X_q + X_k + X_{iso}) \times 2,51 \times \frac{100}{(100 - b)} \quad (1)$$

Trong đó:

X_q là hàm lượng quercetin (%).

X_k là hàm lượng kaempferol (%).

X_{iso} là hàm lượng isorhamnetin (%).

2,51 là hệ số chuyển đổi.

b là độ ẩm của chế phẩm thử (%).

Hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo flavonol glycosid (P.t.1 = 756,7) không được ít hơn 24,0 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Terpen lacton

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - nước theo chương trình dung môi.

Các dung dịch chuẩn: Hòa tan lần lượt bilobalid chuẩn, ginkgolid A, B, C chuẩn (cân chính xác) trong *methanol*

(TT) để được các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ lần lượt như sau để xây dựng đường chuẩn:

Dung dịch chuẩn 1: Dung dịch có chứa bilobalid 1,0 mg/ml, ginkgolid A 0,5 mg/ml, ginkgolid B 0,5 mg/ml, ginkgolid C 0,5 mg/ml.

Dung dịch chuẩn 2: Dung dịch có chứa bilobalid 0,5 mg/ml, ginkgolid A 0,25 mg/ml, ginkgolid B 0,25 mg/ml, ginkgolid C 0,25 mg/ml.

Dung dịch chuẩn 3: Dung dịch có chứa bilobalid 0,25 mg/ml, ginkgolid A 0,125 mg/ml, ginkgolid B 0,125 mg/ml, ginkgolid C 0,125 mg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác 0,15 g chế phẩm, thêm 10 ml nước, lắc rửa trong cách thủy âm, thêm 2 giọt dung dịch acid hydrochloric 2 % (TT), chiết 4 lần với ethyl acetat (TT), lần thứ nhất với 15 ml, ba lần tiếp theo mỗi lần với 10 ml, gộp các dịch chiết ethyl acetat và rửa với 20 ml dung dịch natri acetat 5 % (TT), rửa lớp dung dịch natri acetat bằng 10 ml ethyl acetat (TT). Gộp các dịch chiết và dịch rửa ethyl acetat, rửa 2 lần, mỗi lần bằng 20 ml nước, tách lớp nước và rửa bằng 10 ml ethyl acetat (TT). Gộp tất cả các dịch ethyl acetat, cất thu hồi dung môi tới gần khô hoặc cô trên cách thủy đến gần. Dùng methanol (TT) để hòa tan và chuyển toàn bộ cân vào bình định mức 5 ml và thêm methanol (TT) đến vạch.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (0,25 m × 4,6 mm), nhồi pha tĩnh C (5 μm) dùng cho sắc ký.

Detector tán xạ bay hơi: 105 °C, khí nitrogen 2 L/min.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Nước (% tt/tt)	Methanol (% tt/tt)
0 → 45	75 → 52	25 → 48
45 → 45,1	52 → 75	48 → 25
45 → 50	75	25

Kiểm tra sự thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn bilobalid. Tính số đĩa lý thuyết của cột. Số đĩa lý thuyết của cột không ít hơn 2500 tính theo pic bilobalid.

Tiến hành sắc ký lần lượt với các dung dịch chuẩn ở trên, ghi sắc ký đồ, tính diện tích pic. Về đồ thị tương quan giữa logarit (ln) của nồng độ và logarit (ln) của diện tích pic của từng chất.

Tiêm dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã mô tả, ghi sắc ký đồ, thời gian lưu và diện tích pic từng chất.

Hàm lượng mỗi terpen lacton được tính dựa trên diện tích pic trong dung dịch thử và đường chuẩn tương ứng, cụ thể như sau:

Nồng độ (mg/ml) của terpen lacton trong dung dịch thử được tính theo công thức (2) sau đây:

$$C(\text{mg/ml}) = e^{\left(\frac{\ln A - b}{a}\right)} \quad (2)$$

Trong đó:

C là nồng độ terpen lacton (mg/ml) trong dung dịch thử, A là diện tích pic của terpen lacton.

a, b là các giá trị tìm được từ phương trình hồi qui tuyến tính ($y = ax + b$) của terpen lacton tương ứng thu được từ đường chuẩn sau khi đã chuyển đổi sang ln.

Hàm lượng phần trăm của mỗi terpen lacton được tính theo công thức (3) sau đây:

$$P(\%) = \frac{C}{1000} \times 10 \times 100 \times \frac{100}{m \times (100 - b)} \quad (3)$$

Trong đó:

P là hàm lượng phần trăm (kl/kl) của mỗi terpen lacton, C là nồng độ terpen lacton (mg/ml) trong dung dịch thử được tính từ đường chuẩn như trên,

m là khối lượng cân (g) của mẫu thử,

b là độ ẩm của mẫu thử (%).

Hàm lượng terpen lacton toàn phần bằng tổng hàm lượng mỗi terpen lacton được tính ở trên.

Hàm lượng terpen lacton toàn phần trong chế phẩm không được ít hơn 6,0 % tính theo tổng hàm lượng của bilobalid ($C_{15}H_{18}O_8$), ginkgolid A ($C_{20}H_{24}O_9$), ginkgolid B ($C_{20}H_{24}O_{10}$), ginkgolid C ($C_{20}H_{24}O_{11}$), tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, tránh ánh sáng.

DẦU GẮC

Oleum Momordicae

Dầu ép từ màng đỏ phơi hay sấy khô của hạt cây Gấc (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng), họ Bí (Cucurbitaceae).

Tính chất

Chất lỏng sánh, trong, màu đỏ, mùi thơm ngọt đặc biệt, vị béo không khé cò. Có thể có cần carotenoid khi để lâu hoặc khi để ở nhiệt độ 0 °C đến 5 °C.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: 0,916 đến 0,925 (Phụ lục 6.5, phương pháp dùng picnomet).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: 1,470 đến 1,472 (Phụ lục 6.1).

Chỉ số iod

72 đến 88 (Phụ lục 7.5, phương pháp iod bromid).

Độ nhiễm khuẩn

Đáp ứng yêu cầu đối với thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (Phụ lục 13.6). Cụ thể như sau:

Tổng số vi sinh vật hiếu khí: Không được quá 10^1 CFU/ml.
 Tổng số nấm: Không được quá 10^2 CFU/ml.
 Không được quá 10^2 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 ml.
 Không được có *Salmonella* trong 10 ml.
 Không được có *E. coli*, *S. aureus* trong 1 ml.

Định tính

A. Định tính β -caroten và lycopene: Trong phép thử định lượng β -caroten và lycopene, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic β -caroten và lycopene trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

B. Định tính acid linoleic và acid oleic: Trong phép thử định lượng acid béo không no, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic acid oleic và acid linoleic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Định lượng

Định lượng β -caroten và lycopene

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Hỗn hợp dung môi acetonitril - methanol - dicloromethan được sử dụng theo chương trình dung môi.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan lycopene và β -caroten chuẩn trong dicloromethan (TT) để được dung dịch chứa lycopene và β -caroten có nồng độ lần lượt chính xác khoảng 10 $\mu\text{g/ml}$ và 5 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 1 g chế phẩm vào bình định mức 25 ml, thêm 10 ml ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) (TT), lắc kỹ cho tan, thêm ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) (TT) đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 2,0 ml dung dịch thu được chuyển vào một cột thủy tinh (dài khoảng 20 cm, đường kính trong khoảng 1,2 cm, phía dưới có vòi khóa để điều chỉnh tốc độ dòng) có chứa 1 g bột nhôm oxyd trung tính (cỡ hạt 63 - 200 μm và đã được sấy ở 120 °C trong 3 h để hoạt hóa). Cho 20 ml ether dầu hỏa (40 °C đến 60 °C) (TT) chảy qua cột với tốc độ khoảng 30 giọt/phút. Hứng lấy dịch chiết ether dầu hỏa, tiếp tục cho 30 ml dicloromethan (TT) chảy qua cột với tốc độ như trên. Gộp dịch chiết dicloromethan và dịch chiết ether dầu hỏa, làm bay hơi dung môi đến gần khô bằng dòng khí nitrogen. Dùng dicloromethan (TT) để hòa tan và chuyển toàn bộ cân vào bình định mức thủy tinh màu nâu 20 ml, thêm dicloromethan (TT) đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch thử.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm $\times$ 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (10 μm).

Nhiệt độ cột: 30 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 476 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl .

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Acetonitril (% tt/tt)	Methanol (% tt/tt)	Dicloromethan (% tt/tt)
0 - 15	100 - 20	0 - 10	0 - 70
16 - 25	20	10	70

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống. Tiêm 6 lần lặp lại hỗn hợp dung dịch hai chuẩn lycopene và β -caroten có nồng độ lần lượt là 10 $\mu\text{g/ml}$ và 5 $\mu\text{g/ml}$, độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic lycopene và β -caroten không được lớn hơn 2,0 %.

Tiêm dung dịch thử và dung dịch chuẩn, ghi thời gian lưu và diện tích pic của lycopene và β -caroten trong mỗi dung dịch. Tính hàm lượng lycopene và β -caroten trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và nồng độ lycopene và β -caroten trong dung dịch chuẩn.

Hàm lượng lycopene ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) không được dưới 0,05 %, β -caroten ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) trong chế phẩm không được dưới 0,1 % dầu Gác.

Định lượng acid béo không no

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Dung dịch chuẩn nội: Hòa tan acid pentadecanoic trong *n*-hexan (TT) để được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 100 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg mỗi chất chuẩn acid linoleic, acid oleic cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong *n*-hexan (TT) và thêm *n*-hexan (TT) đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch hỗn hợp acid linoleic, acid oleic có nồng độ mỗi chất khoảng 500 $\mu\text{g/ml}$. Lấy 100 μl dung dịch trên cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy, đệm cao su, thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội. Loại dung môi *n*-hexan bằng khí nitrogen. Thêm vào ống nghiệm 2 ml dung dịch natri hydroxyd 0,5 N trong methanol (TT), đậy kín nắp, đun trong cách thủy ở 70 °C trong 20 min, cho tiếp 2 ml dung dịch boron trifluorid 20 % trong methanol, sục khí nitrogen, đun trong cách thủy ở 70 °C trong 30 min. Chiết bằng *n*-hexan (TT) 3 lần, mỗi lần 5 ml. Gộp dịch chiết *n*-hexan, làm bay hơi dung môi bằng dòng khí nitrogen có gia nhiệt ở 60 °C đến gần khô, hòa tan cân bằng 1 ml *n*-hexan (TT).

Dung dịch thử: Cân chính xác 500 mg chế phẩm cho vào bình định mức có thể tích 100 ml, hòa tan bằng *n*-hexan (TT) và thêm *n*-hexan (TT) đến vạch, lắc đều, lấy chính xác 0,1 ml cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy, thêm 1 ml dung dịch chất chuẩn nội. Loại dung môi bằng khí nitrogen. Sau đó tiến hành tương tự như mô tả ở phần Dung dịch chuẩn bắt đầu từ câu "Thêm vào ống nghiệm 2 ml... hòa tan cân bằng 1 ml *n*-hexan (TT)".

Điều kiện sắc ký khí:

Cột sắc ký khí mao quản HP-1 kích thước (30 m $\times$ 0,32 mm $\times$ 0,25 μm) hoặc tương đương.

Detector ion hoá ngọn lửa, nhiệt độ: 290 °C.

Tốc độ dòng khí detector: Hydrogen là 35 ml/min, không khí là 400 ml/min.

Nhiệt độ buồng tiêm mẫu 250 °C.

Nhiệt độ cột: Nhiệt độ ban đầu 100 °C giữ trong 2 min, tăng đến 200 °C với tốc độ 10 °C/min, giữ trong 3 min;

tăng đến 250 °C với tốc độ 5 °C/min, giữ trong 5 min.

Khí mang nitrogen với tốc độ dòng 1 ml/min.

Bơm mẫu theo kiểu chia dòng với tỷ lệ 5 : 1.

Thể tích tiêm: 1 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống. Tiêm 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối của các tỷ lệ diện tích pic giữa acid linoleic và acid oleic với diện tích pic của chuẩn nội không được lớn hơn 1,5 %.

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Ghi thời gian lưu và diện tích pic acid linoleic, acid oleic, chuẩn nội trong mỗi dung dịch. Độ phân giải giữa pic methyl linoleat và pic methyl oleat không dưới 1,5.

Tính hàm lượng của acid linoleic, acid oleic theo tỷ lệ diện tích giữa pic acid tương ứng so với pic chuẩn nội thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ acid linoleic và acid oleic trong dung dịch chuẩn.

Hàm lượng acid linoleic ($C_{18}H_{32}O_2$) không được dưới 10 %, acid oleic ($C_{18}H_{34}O_2$) không được dưới 30 %.

Bảo quản

Trong bao bì kín, để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

DẦU MÙ U

Oleum Calophylli inophylli

Dầu ép từ hạt của cây Mù u (*Calophyllum inophyllum* L.), họ Bứa (*Clusiaceae*) đã được tinh chế loại bỏ phần "nhựa".

Mô tả

Dầu lỏng sánh, màu vàng tới vàng đậm, mùi thơm hắc đặc trưng.

Tỉ trọng tương đối

0,9135 đến 0,9275 (Phụ lục 6.5, phương pháp dùng picnomet).

Chỉ số acid

1 đến 45 (Phụ lục 7.2).

Chỉ số xà phòng

171 đến 228 (Phụ lục 7.7).

Định tính

A. Lấy 0,5 ml chế phẩm, thêm vào 2 ml ether ethylic (TT), lắc đều cho tan. Thêm 2 ml ethanol 95 % (TT) lắc đều cho tan. Chia đều dung dịch vào 2 ống nghiệm.

Ống 1: Thêm 2 giọt đến 3 giọt dung dịch sắt (III) clorid 5 % trong ethanol (TT), lắc đều, dung dịch có màu xanh dương đậm.

Ống 2: Thêm 0,5 ml dung dịch kali hydroxyl 0,5 N trong ethanol (TT), lắc đều, thêm vài giọt thuốc thử diazo (TT). Dung dịch có màu đỏ cam.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Toluene - ethyl acetat (8 : 2)

Dung dịch thử: Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong 5 ml ether ethylic (TT).

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 0,1 g dầu Mù u (mẫu chuẩn) trong 5 ml ether ethylic (TT). Nếu không có dầu Mù u mẫu chuẩn thì hòa tan calophyllolid chuẩn trong ether ethylic (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 0,06 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng khoảng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 12 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng.

Nếu dùng dung dịch calophyllolid làm dung dịch đối chiếu thì quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm, trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết có cùng màu và giá trị R_f với vết của calophyllolid trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Nếu dùng dung dịch dầu mù u làm dung dịch đối chiếu: Phun lên bản mỏng dung dịch vanilin - acid sulfuric (TT). Sấy bản mỏng ở 100 °C đến 105 °C trong khoảng 5 min. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu và cùng giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng.

Pha động A: Acetonitril.

Pha động B: Dung dịch acid acetic 2,5 %.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,24 g chế phẩm cho vào bình định mức 20 ml, làm ấm ở 60 °C trong 10 min rồi thêm 12 ml hỗn hợp methanol - nước (9 : 1), siêu âm trong 15 min. Bổ sung hỗn hợp methanol - nước (9 : 1) đến vừa đủ 20,0 ml. Lọc dung dịch thu được qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn: Pha các dung dịch calophyllolid chuẩn trong methanol (TT) có nồng độ khoảng 175; 87,5 và 35 µg/ml. Lọc các dung dịch thu được qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) (cột Zorbax SB-C18 là phù hợp).

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 270 nm.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0	20	80
30	80	20
35	20	80
40	20	80

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch calophyllolid chuẩn 87,5 (µg/ml). Hệ số đối xứng thu được từ pic calophyllolid phải nằm trong khoảng 0,8 - 1,5, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích

pic calophyllolid trong 6 lần tiêm lặp lại không được quá 2,0 %, số đĩa lý thuyết tính theo pic calophyllolid phải không được dưới 200000.

Tiêm lần lượt các dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Ghi các sắc ký đồ và diện tích pic.

Vẽ đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa diện tích pic calophyllolid và nồng độ của calophyllolid trong các dung dịch chuẩn và xác lập phương trình hồi quy tuyến tính, dựa vào đó tính nồng độ calophyllolid trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

Tính hàm lượng phần trăm (kl/kl) calophyllolid, $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_5$, trong chế phẩm theo công thức:

$$X \% (\text{g}/100 \text{ g}) = 2C_1/m_1$$

Trong đó:

C_1 là nồng độ calophyllolid trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

m_1 là khối lượng dầu (mg).

Chế phẩm phải chứa không dưới 0,36 % (kl/kl) calophyllolid ($\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_5$).

Bảo quản

Giữ trong chai đầy, đậy nắp kín. Bảo quản nơi mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU BẠC HÀ

Aetheroleum Menthae arvensis

Được lấy từ các bộ phận trên mặt đất của cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.), họ Bạc hà (Lamiaceae), bằng phương pháp cất kéo hơi nước và đã được làm khan nước.

Tính chất

Chất lỏng, trong, không màu hoặc vàng nhạt, mùi thơm đặc biệt, vị cay mát.

Rất dễ tan trong ethanol, cloroform và ether, tan trong 2 đến 3 thể tích ethanol 70 %.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,890 đến 0,922 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,455 đến 1,465 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -40° đến -20° (Phụ lục 6.4).

Định tính

Nhỏ 1 giọt tinh dầu lên lỗ khay sứ, thêm 3 giọt đến 5 giọt acid sulfuric (TT) và vài tinh thể vanilin (TT), sẽ xuất hiện màu đỏ cam, thêm 1 giọt nước sẽ chuyển sang màu tím.

Kiểm tra các chất pha trộn trong tinh dầu

A. Ethanol: Lấy 5 ml tinh dầu cho vào ống nghiệm. Thêm từ từ từng giọt nước cất (không lắc). Phần tinh dầu ở trên phải trong suốt, không được đục.

B. Nhựa và dầu béo: Nhỏ vài giọt tinh dầu lên giấy lọc, hơ nóng giấy lọc trên bếp điện, giấy phai không có vết dầu loang.

C. Dầu hòa, dầu mazut: Trong một ống đong đựng khoảng 80 ml ethanol 80 % (TT), nhỏ từng giọt (không lắc) cho đến hết 10 ml tinh dầu, dung dịch phải trong, không có phần không tan nổi ở trên.

Định lượng

A. Định lượng menthol este hóa

Cân chính xác khoảng 3 g tinh dầu, thêm 6 ml ethanol 96 % (TT) và trung hòa bằng dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CĐ), chỉ thị là dung dịch phenolphthalein (TT). Thêm chính xác 20 ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CĐ) và đun nóng 60 min trong cách thủy có lắp ống sinh hàn ngược. Để nguội, pha loãng với 50 ml nước cất mới đun sôi để nguội, rồi chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrochloric 0,5 N (CĐ) cho đến khi mất màu. Song song tiến hành một mẫu trắng trong cùng điều kiện.

1 ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ) tương ứng với 0,09915 g menthyl acetat ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2$). Hàm lượng phần trăm menthol este của tinh dầu được tính theo công thức:

$$\frac{(V_1 - V_2) \times 9,915}{G}$$

Trong đó:

V_1 là số ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ) dùng để xà phòng hóa tinh dầu dùng trong mẫu thử;

V_2 là số ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ) dùng trong mẫu trắng;

G là khối lượng tinh dầu lấy để thử (g).

B. Định lượng menthol toàn phần

Lấy chính xác 5 ml tinh dầu cho vào một bình acetyl hóa, thêm 5 g anhydrid acetic (TT) và 1 g natri acetat khan (TT), đun sôi 60 min. Sau khi nguội, thêm 20 ml nước cất, vừa đun vừa lắc 15 min trên cách thủy. Để nguội, chuyển vào bình gạn, loại bỏ lớp nước, rửa lớp tinh dầu 2 lần, mỗi lần 20 ml dung dịch natri clorid 10 % (TT). Sau đó, rửa lại nhiều lần bằng nước cất, mỗi lần 10 ml, cho đến khi nước rửa có phản ứng trung tính với giấy quỳ. Làm khan tinh dầu bằng natri sulfat khan (TT). Lọc.

Cân chính xác khoảng 1,5 g tinh dầu đã acetyl hóa, hòa tan trong 3 ml ethanol 96 % (TT) và trung hòa bằng dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CĐ), với chỉ thị màu là dung dịch phenolphthalein (TT). Sau đó thêm chính xác 20 ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol (CĐ). Đun trong cách thủy 60 min với ống sinh hàn ngược. Để nguội, thêm 50 ml nước cất mới đun sôi để nguội, rồi chuẩn độ bằng dung dịch acid hydrochloric 0,5 N (CĐ) cho đến khi mất màu.

1 ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ) tương ứng với 0,07814 g menthol ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$). Hàm lượng phần trăm menthol toàn phần trong tinh dầu được tính theo công thức:

$$\frac{V \times 7,814}{G - (0,021 \times V)}$$

Trong đó:

V là số ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N (CĐ) dùng để xà phòng hóa tinh dầu đã acetyl hóa;

G là khối lượng tinh dầu đã acetyl hóa (g).

Tinh dầu Bạc hà phải chứa ít nhất 55,0 % menthol toàn phần và từ 3,0 % đến 9,0 % menthol este hóa, biểu thị bằng menthyl acetat.

Bảo quản

Trong bao bì kín, tránh ánh sáng, để ở nơi mát.

TINH DẦU BẠCH ĐÀN

Aetheroleum Eucalypti

Lấy từ lá của nhiều loài Bạch đàn (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Eucalyptus exserta* F. Muell.) và một số loài Bạch đàn khác, họ Sim (Myrtaceae), bằng cách cắt kéo hơi nước, sau đó tinh chế bằng phương pháp cất lại.

Tính chất

Chất lỏng trong, không màu hay màu vàng nhạt, mùi đặc biệt, vị cay sau mát. Dễ tan trong ethanol 70 %.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,900 đến 0,925 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,454 đến 1,470 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực

Ở 20 °C: Từ 0 ° đến +10 ° (Phụ lục 6.4).

Aldehyd

Cho 10 ml tinh dầu vào bình nón nút mài dung tích 100 ml. Thêm vào đó 5 ml toluen (TT) và 4 ml dung dịch hydroxylamin hydroclorid trong ethanol 60 % (TT). Lắc mạnh và chuẩn độ ngay bằng dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 % (CĐ) đến khi màu đỏ chuyển sang màu vàng. Tiếp tục lắc và chuẩn độ tới khi lớp dưới có màu vàng bền vững sau khi đã lắc mạnh 2 min và để yên cho tách lớp; phản ứng xảy ra hoàn toàn trong khoảng 15 min. Lập lại quy trình định lượng như trên với 10 ml tinh dầu khác, dùng dung dịch đã chuẩn độ sơ bộ ở trên thêm 0,5 ml dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 % (CĐ) làm chuẩn màu cho điểm kết thúc định lượng. Lượng dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 % (CĐ) dùng cho chuẩn độ không được quá 2,0 ml.

Định lượng

Dùng bình Cassia có dung tích 100 ml, ở cổ có khắc ngăn 4 ml và chia độ từng 0,1 ml. Cho vào bình 3,0 ml tinh dầu và 75 ml dung dịch resorcin (TT). Lắc hỗn hợp trong 15 min. Để yên cho tách thành 2 lớp, cho thêm dung dịch resorcin (TT) vào bình sao cho lớp tinh dầu nằm vào khoảng chia độ ở cổ bình. Sau 1 h, đọc thể tích tinh dầu không kết hợp với resorcin. Nhiệt độ của tinh dầu lấy để thử và nhiệt độ của phần tinh dầu không kết hợp với resorcin (TT) lúc đọc kết quả phải giống nhau.

Hàm lượng phần trăm cineol trong tinh dầu (X%) tính theo công thức:

$$X\% = \frac{(3 - a) \times 100}{b}$$

Trong đó:

a là thể tích tinh dầu đọc được (ml);

b là thể tích mẫu thử (ml).

Tinh dầu Bạch đàn phải có ít nhất 60 % (tt/tt) cineol ($C_{10}H_{18}O$).

Bảo quản

Tránh ánh sáng, đựng đầy lọ, đậy nút kín, để nơi, mát.

TINH DẦU GỪNG

Aetheroleum Zingiberis

Tinh dầu thu được từ thân rễ cây Gừng (*Zingiber officinale* Rosc.), họ Gừng (Zingiberaceae) bằng phương pháp cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong, màu vàng nhạt đến vàng, mùi thơm gừng đặc trưng, vị hơi cay nóng, dễ tan trong ether, cloroform, tan trong ethanol 96 %.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,865 đến 0,885 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,484 đến 1,494 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -15° đến -48° (Phụ lục 6.4).

Định tính

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: n-Hexan - ether (3 : 7).

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 1 % trong cloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch tinh dầu gừng (mẫu chuẩn) 1 % trong cloroform (TT).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký cho tới khi dung môi đi được khoảng 10 cm. Lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch vanilin 1 % trong acid sulfuric (TT). Sấy bản mỏng ở nhiệt độ 105 °C trong 5 min. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết chính cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Cẩn sau khi bay hơi

Không quá 5 g/l (Phụ lục 12.8).

Bảo quản

Đóng đầy, đựng trong chai nút kín, để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU HỒI*Aetheroleum Anisi stellati*

Lấy từ quả chín đã phơi khô của cây Hồi (*Illicium verum* Hook.f.), họ Hồi (Illiciaceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng không màu hay màu vàng nhạt, mùi hơi đặc biệt, vị ngọt. Kết tinh khi để lạnh.

Tan trong 1 đến 3 thể tích ethanol 90 % (dung dịch trong suốt hoặc hơi đục), tan trong ether, ether dầu hòa.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,978 đến 0,988 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,552 đến 1,560 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -2° đến 1° (Phụ lục 6.4).

Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 0,1 % trong cloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch anethol 0,1 % trong cloroform (TT) hoặc dung dịch tinh dầu Hồi (mẫu chuẩn) 0,1 % trong cloroform (TT).

Dung môi khai triển: Ether dầu hòa (30 °C đến 60 °C) - ether (95 : 5).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm. Lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch mới pha vanilin 1 % trong acid sulfuric (TT). Sấy bản mỏng ở 105 °C trong 5 min. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử sẽ xuất hiện một vết lớn nhất màu đỏ, sau chuyển sang màu tím (với R_f khoảng 0,49 đến 0,50) cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của anethol trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu. Nếu dùng tinh dầu Hồi mới cất để chuẩn bị dung dịch đối chiếu thì trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

B. Điểm đông đặc: Tinh dầu phải có điểm đông đặc không dưới 15 °C (Phụ lục 6.6) tương ứng với hàm lượng từ 85 % đến 95 % anethol ($C_{10}H_{12}O$).

Bảo quản

Đựng trong bình đóng đầy, nút kín. Để chỗ mát, tránh ánh sáng.

Chú ý

Nếu bị đục hoặc kết tinh, đun nóng trên cách thủy và lắc trước khi dùng.

TINH DẦU HÚNG CHANH*Aetheroleum Plectranthi amboinici***Tinh dầu Tàn dày lá**

Tinh dầu thu được từ lá tươi của cây Húng chanh [*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.], họ Bạc hà (Lamiaceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong suốt, có màu vàng đến màu vàng sẫm, đôi khi có ánh xanh nhạt. Mùi đặc biệt, vị cay nóng. Dễ tan trong cloroform, ether dầu hòa, ethanol 96 %.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,890 đến 0,920 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,480 đến 1,510 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -25° đến -3° (Phụ lục 6.4).

Định tính

A. Hòa tan 2 giọt tinh dầu trong 5 ml ethanol 90 % (TT), thêm 2 giọt dung dịch sắt (III) clorid 3 %, dung dịch phải có màu xanh rêu đậm.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Ether dầu hòa - ethyl acetat (80 : 20).

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 0,1 % trong cloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch tinh dầu Húng chanh (mẫu chuẩn) 0,1 % trong cloroform (TT).

Cách tiến hành: Chấm 20 µl mỗi dung dịch trên lên bản mỏng. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch vanilin 1 % trong acid sulfuric (TT) mới pha. Sấy bản mỏng ở 105 °C trong 5 min. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử sẽ xuất hiện các vết: 2 vết màu tím có R_f khoảng 0,55 đến 0,70; một vết màu hồng đỏ có R_f khoảng 0,45 và một vết màu xanh đậm có R_f khoảng 0,33 cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Cẩn sau khi bay hơi

Không quá 0,5 % (theo khối lượng) (Phụ lục 12.8).

Cân 2 g chế phẩm, thêm 5 ml nước. Bốc hơi trên cách thủy đến khô, sấy chén ở nhiệt độ 100 °C đến 105 °C trong 1 h. Lượng cặn còn lại không được quá 1,0 mg.

Bảo quản

Trong bình nút kín, để chỗ mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU HƯƠNG NHU TRẮNG*Aetheroleum Ocimi gratissimi*

Lấy từ cành mang lá, hoa, quả của cây Hương nhu trắng (*Ocimum gratissimum* L.), họ Bạc hà (Lamiaceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong, màu vàng nhạt. Mùi thơm đặc trưng, vị cay, nóng, nếm có cảm giác tê lưỡi.

Đễ tan trong ethanol, ether hoặc acid acetic băng. Thực tế không tan trong nước.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 1,030 đến 1,050 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,530 đến 1,540 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -15,6° đến 20,2° (Phụ lục 6.4).

Định tính

A. Hòa tan 2 giọt tinh dầu trong 5 ml ethanol 90 % (TT), thêm 2 giọt dung dịch sắt (III) clorid (TT) 3 %, dung dịch phải có màu xanh rêu thẫm.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Toluene - ethyl acetat (9 : 1).

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 0,1 % trong chloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung eugenol chuẩn hoặc tinh dầu Hương nhu trắng (mẫu chuẩn) làm dung dịch đối chiếu với nồng độ tương đương dung dịch thử.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 20 µl mỗi dung dịch trên, triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun dung dịch sắt (III) clorid (TT) 3 %. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ, dung dịch thử xuất hiện vết màu nâu sẫm với giá trị R_f khoảng 0,81 - 0,82 tương ứng với vết eugenol, hoặc dung dịch thử và dung dịch đối chiếu xuất hiện các vết có cùng màu sắc và giá trị R_f.

Các phenol tan trong nước

Lấy 1 ml tinh dầu, thêm 20 ml nước nóng, lắc đều, để nguội. Lọc qua giấy lọc ẩm. Thêm 1 giọt dung dịch sắt (III) clorid 10,5 % (TT) vào dịch lọc, không được có màu xanh lam hoặc đỏ tía ngoại trừ một màu xanh lục xám không bền.

Kim loại nặng

Không được quá 10 phần triệu.

Lấy 1 g tinh dầu để chuẩn bị dung dịch thử. Dùng 1,0 ml dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu để chuẩn bị dung dịch đối chiếu. Cách tiến hành: Xem chuyên luận "Tinh dầu quế".

Định lượng

Lấy chính xác 5,0 ml tinh dầu vào một bình Cassia 100 ml. Thêm 75 ml dung dịch kali hydroxyd 5 % (TT), lắc trong 5 min. Đun nóng trên cách thủy trong 10 min, thỉnh thoảng lắc. Để nguội đến khi 2 lớp chất lỏng tách ra, thêm từ từ dung dịch kali hydroxyd 5 % (TT) đến khi lớp tinh dầu không phản ứng đáng kể lên tới phần chia độ ở cổ bình. Quay

tròn và vỗ nhẹ bình để các giọt tinh dầu bám vào thành bình nổi lên. Sau khi để yên từ 12 h đến 24 h, xác định thể tích tinh dầu không phản ứng [a (ml)].

Hàm lượng phần trăm eugenol toàn phần trong tinh dầu (X%) được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{(5 - a) \times 100}{5}$$

Tinh dầu phải chứa ít nhất 60 % (tt/tt) eugenol (C₁₀H₁₂O₂) toàn phần.

Bảo quản

Đựng trong bình nút kín, đóng đầy. Để nơi khô, mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU LONG NÃO***Aetheroleum Cinnamomi camphorae***

Lấy từ gỗ và lá của cây Long não [*Cinnamomum camphora* (L.) Presl. = *Laurus camphora* L.], họ Long não (Lauraceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng không màu hay màu vàng nhạt, mùi thơm đặc biệt của long não.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,923 đến 0,930 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,461 đến 1,470 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ +17° đến +22° (Phụ lục 6.4).

Kiểm tra các chất pha trộn trong tinh dầu

A. Ethanol: Lấy 1 ml tinh dầu cho vào ống nghiệm, đầy bằng nút bông xốp, ở giữa bông có tinh thể fuchsin (TT), rồi đun nóng tinh dầu, nếu có ethanol sẽ làm bông chuyển sang màu đỏ.

B. Dầu béo: Nhỏ vài giọt tinh dầu lên giấy lọc, hơi nóng giấy lọc, giấy phải không có vết dầu loang.

C. Dầu mỡ: Lấy 1 ml tinh dầu cho vào ống đong 10 ml chia vạch, cho tiếp 9 ml ethanol 80 % (TT). Dung dịch phải trong suốt, không vẩn đục.

Định lượng

Trong một bình cầu 300 ml có nút mài, cân chính xác khoảng 0,45 g tinh dầu và hòa tan trong 15 ml ethanol không có aldehyd (TT). Thêm từ từ 80 ml dung dịch 2,4-dinitrophenylhydrazin trong acid hydrocloric (TT). Lắp ống sinh hàn ngược, đun trên cách thủy 4 h. Để nguội, thêm 100 ml dung dịch acid sulfuric 2 % (TT). Để yên 24 h ở chỗ tối. Lọc lấy tủa trên một phễu thủy tinh xốp đã cân trước. Tráng bình cầu 2 lần (mỗi lần với 10 ml dịch lọc) để lấy hết tủa. Rửa tủa và bình 6 lần, mỗi lần với 10 ml nước. Sấy phễu thủy tinh xốp chứa tủa trong tủ sấy

ở 80 °C trong một giờ. Để nguội trong bình hút ẩm, rồi cân tủa 2,4-dinitrophenylhydrazon thu được.

1 g tủa tương ứng với 0,458 g camphor ($C_{10}H_{16}O$).

Hiệu lượng phần trăm camphor trong tinh dầu (X%) được tính bằng công thức:

$$X(\%) = \frac{(a \times 45,8)}{b}$$

trong đó:

a là khối lượng tủa thu được (g);

b là khối lượng tinh dầu lấy để thử (g).

Tinh dầu phải chứa ít nhất 35,0 % camphor.

Bảo quản

Trong lọ thủy tinh nút kín. Để chỗ mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU NGHỆ

Aetheroleum Curcumae

Tinh dầu thu được từ thân rễ cây Nghệ (*Curcuma longa* L.), họ gừng (Zingiberaceae) bằng phương pháp cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong, màu vàng nhạt đến vàng cam, mùi nghệ đặc trưng, dễ tan trong ether, cloroform, ethyl acetat, acetone, methanol, ethanol.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,925 đến 0,935 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,4850 đến 1,5250 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -27° đến -24° (Phụ lục 6.4).

Định tính

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 1 % trong cloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch tinh dầu Nghệ (mẫu chuẩn) 1 % trong cloroform (TT).

Dung môi khai triển: Toluene - ethyl acetat (97 : 3).

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên thành vạch dài 3 mm. Triển khai sắc ký cho tới khi dung môi đi được khoảng 10 cm. Lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng và phun dung dịch vanilin - acid sulfuric (TT). Sấy bản mỏng ở nhiệt độ 105 °C trong 5 min. Quan sát dưới ánh sáng thường. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết chính cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Cẩn sau khi bay hơi

Không quá 5 g/l (Phụ lục 12.8).

Bảo quản

Đóng đầy, đựng trong chai nút kín, để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

TINH DẦU QUẾ

Aetheroleum Cinnamomi

Lấy từ vỏ thân hoặc vỏ cành Quế (*Cinnamomum cassia* Presl. = *Cinnamomum aromaticum* Ne) hoặc một số loài Quế khác (*Cinnamomum* spp.), họ Long não (Lauraceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong, màu vàng đến nâu đỏ (chuyển màu dần theo thời gian). Mùi thơm, vị cay nóng rất đặc trưng. Dễ tan trong ethanol 70 % và acid acetic khan.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 1,040 đến 1,072 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,590 đến 1,610 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -1° đến +1° (Phụ lục 6.4).

Định tính

A. Lấy 4 giọt tinh dầu trộn với 4 giọt acid nitric (TT) ở nhiệt độ dưới 5 °C, xuất hiện tinh thể trắng hoặc vàng sáng.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Cyclohexan - ethyl acetat (9 : 1).

Dung dịch thử: Dung dịch tinh dầu 0,1 % trong cloroform (TT).

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch tinh dầu Quế (mẫu chuẩn) 0,1 % trong cloroform (TT).

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 10 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí, phun dung dịch 2,4-dinitrophenylhydrazin (TT). Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết có cùng màu sắc (màu da cam) và cùng giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Rosin

Trộn 1,0 ml tinh dầu quế với 5 ml ethanol 95 % (TT), sau đó thêm 3 ml dung dịch chì acetat bão hòa hòa ethanol mới pha chế. Không được có tủa xuất hiện.

Kim loại nặng

Không được quá 40 phần triệu.

Dung dịch thử: Lấy 1,0 ml chế phẩm vào 1 chén bằng sứ hoặc thạch anh, có nắp đậy, carbon hóa bằng cách nung nhẹ. Để nguội, thêm 2 ml acid nitric (TT) và 5 giọt acid sulfuric (TT). Đốt nóng cẩn thận cho đến khi hết khói trắng bay ra, than hóa bằng cách nung ở 500 °C đến 600 °C. Để nguội, thêm 2 ml acid hydrochloric (TT), bốc hơi tới khô trên cách thủy. Làm ẩm cân bằng 3 giọt acid hydrochloric (TT), thêm 10 ml nước nóng và làm ẩm trong 2 min. Sau đó thêm 1 giọt dung dịch phenolphthalein (TT), thêm từng giọt amoniac đậm đặc (TT) cho đến khi dung dịch xuất hiện màu hồng nhạt, thêm 2 ml acid acetic loãng (TT), lọc nếu cần, rửa phễu và cân bằng 10 ml nước. Chuyển dịch lọc

và dịch rửa vào ống thử Nessler, thêm nước vừa đủ 50 ml.
Dung dịch đối chiếu: Bốc hơi hỗn hợp 2 ml *acid nitric* (TT), 5 giọt *acid sulfuric* (TT) và 2 ml *acid hydrochloric* (TT) trên cách thủy, làm ẩm cân bằng 3 giọt *acid hydrochloric* (TT). Sau đó tiến hành như chỉ dẫn với dung dịch thử, sau đó thêm 4,0 ml *dung dịch chỉ mẫu 10 phần triệu Pb* (TT) và thêm nước vừa đủ 50 ml.

Cách tiến hành: Thêm 1 giọt *dung dịch natri sulfid* (TT₁) vào dung dịch thử và dung dịch đối chiếu, lắc mạnh, để yên 5 min. So sánh màu của 2 ống nghiệm bằng cách nhìn dọc ống hoặc quan sát trên nền trắng. Dung dịch thử không được đậm màu hơn dung dịch đối chiếu.

Định lượng

Lấy chính xác 10,0 ml tinh dầu, cho vào bình Cassia 100 ml, thêm 50 ml *dung dịch natri sulfit bão hòa* (TT) mới pha đã trung tính [thêm từng giọt *dung dịch natri bisulfít 30 %* (TT) vào *dung dịch natri sulfit* cho đến khi trung tính, chỉ thị là *dung dịch phenolphthalein* (TT)], trộn đều. Thêm 2 giọt *dung dịch phenolphthalein* (TT) và đun nóng ngay trong cách thủy, lắc liên tục. Thêm từng giọt *dung dịch natri bisulfít 30 %* (TT) để làm mất màu dung dịch đang đun, thêm vài giọt *phenolphthalein* (TT) nữa và tiếp tục đun trong 15 min. Khi dung dịch đun mất màu hoàn toàn, lấy bình ra, để nguội ở nhiệt độ phòng; hoặc thêm từng giọt *dung dịch natri bisulfít 30 %* (TT) để làm mất màu đỏ tạo thành khi đun nóng. Làm lại quá trình trên cho đến khi không có màu đỏ trong dung dịch đun, lấy bình ra để nguội và để yên cho tách lớp. Thêm *dung dịch natri sulfit trung tính bão hòa* cho đến khi lớp tinh dầu nổi lên phần chia vạch ở cổ bình. Để yên 18 h cho đến khi phân lớp rõ. Đọc thể tích của lớp tinh dầu đã tách ra (a ml). Hàm lượng phần trăm của aldehyd cinnamic (X%) trong tinh dầu tính theo công thức sau:

$$X(\%) = (10 - a) \times 10$$

Tinh dầu Quế phải chứa ít nhất 85,0 % (tt/tt) aldehyd cinnamic.

Bảo quản

Đựng trong bình nút kín, đóng đầy. Để nơi khô, mát, nhiệt độ không quá 25 °C. Tránh ánh sáng.

TINH DẦU TRÂM

Aetheroleum Cajuputi

Tinh dầu lấy từ lá tươi của cây Trâm gió, còn gọi là cây Chè đồng (*Melaleuca cajuputi* Powell), họ Sim (Myrtaceae), bằng cách cất kéo hơi nước.

Tính chất

Chất lỏng trong, không màu hay màu lục nhạt đến vàng nhạt. Mùi đặc biệt. Tan trong 1 đến 2 thể tích ethanol 80 %.

Tỷ trọng

Ở 20 °C: Từ 0,900 đến 0,925 (Phụ lục 6.5).

Chỉ số khúc xạ

Ở 20 °C: Từ 1,466 đến 1,472 (Phụ lục 6.1).

Góc quay cực riêng

Ở 20 °C: Từ -3° đến -1° (Phụ lục 6.4).

Giới hạn aldehyd

Cho 10 ml tinh dầu vào bình nón nút mài dung tích 100 ml. Thêm vào đó 5 ml *toluen* (TT) và 4 ml *dung dịch hydroxylamin hydroclorid trong ethanol 60 %* (TT). Lắc mạnh và chuẩn độ ngay bằng *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 %* (CD) đến khi màu đỏ chuyển sang màu vàng. Tiếp tục lắc và chuẩn độ tới khi lớp dưới có màu vàng bền vững sau khi đã lắc mạnh 2 min và để yên cho tách lớp; phản ứng xảy ra hoàn toàn trong khoảng 15 min. Lập lại quy trình định lượng như trên với 10 ml tinh dầu khác, dùng dung dịch đã chuẩn độ sơ bộ ở trên thêm 0,5 ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 %* (CD) làm chuẩn màu cho điểm kết thúc định lượng. Lượng *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 %* (CD) dùng cho chuẩn độ không được quá 2,0 ml.

Định tính

A. Cho vào 1 ống nghiệm khô 1 ml tinh dầu (đã làm khan trước bằng *natri sulfat khan* (TT)) và 1 ml *acid phosphoric* (TT). Đặt ống nghiệm vào một cốc nước đá và khuấy kỹ trong vài phút, sẽ thấy một hợp chất cộng được tạo thành có thể chất như kem, màu từ trắng ngà đến đỏ cam tùy theo độ tinh khiết của tinh dầu.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mong: Silica gel GF₂₅₄.

Dung môi khai triển: Benzen - ethyl acetat (9 : 1).

Dung dịch thử: Tinh dầu pha loãng trong *dicloromethan* (TT) với tỷ lệ 1 : 1.

Dung dịch đối chiếu: Cineol pha loãng trong *dicloromethan* (TT) với tỷ lệ 1 : 1.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên cùng một bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng, phun thuốc thử *vanilin - sulfuric* (TT). Sấy bản mỏng ở 105 °C trong 5 min đến 10 min. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có vết chính có cùng màu và cùng giá trị R_f với vết cineol của dung dịch đối chiếu.

Định lượng

Định lượng theo phương pháp đo điểm đông đặc của hợp chất cộng giữa cineol và O-cresol (Phụ lục 12.5).

Hàm lượng cineol (C₁₀H₁₈O) trong tinh dầu trâm phải không ít hơn 40,0 %.

Bảo quản

Trong bình nút kín, để chỗ mát, tránh ánh sáng.