

PHỤ LỤC 12

12.1 LẤY MẪU DƯỢC LIỆU

Lấy mẫu dược liệu là việc lựa chọn, thu thập các mẫu dược liệu cho việc kiểm tra chất lượng.

Mức độ đại diện của các mẫu dược liệu được lấy có ảnh hưởng trực tiếp đến độ chính xác và độ đúng của việc kiểm tra.

Các yêu cầu chung về việc lấy mẫu dược liệu như sau:

Kiểm tra trước khi lấy mẫu

Kiểm tra đối chiếu tên và nguồn gốc nguyên liệu;

Kiểm tra đặc điểm và hình dạng bao gói;

Kiểm tra sự nguyên vẹn, sạch sẽ, mức độ nhiễm mốc và tạp chất lạ của bao bì.

Các bao gói không bình thường cần được kiểm tra riêng một cách kỹ càng.

Ghi chép chi tiết kết quả kiểm tra.

Cách thức lấy mẫu

Cách thức lấy mẫu

Tổng số bao gói dưới 5: Lấy mẫu từng bao gói.

Từ 5 đến dưới 100: Lấy mẫu 5 bao gói.

Từ 100 đến 1000: Lấy mẫu 5 % tổng số bao gói.

Trên 1000: Lấy 50 bao gói cộng thêm số bao gói bằng 1 % của tổng số bao gói vượt quá so với 1000 bao gói.

Dược liệu quý: Lấy mẫu từng bao gói, không kể số lượng các bao gói.

Dược liệu được lấy ở trên, giữa và cuối của mỗi bao gói bằng các phương tiện thích hợp (đối với bao gói lớn thì lấy sâu 10 cm dưới bề mặt của bao gói).

Đối với thuốc có kích thước lớn thì lấy mẫu đại diện thích hợp.

Khối lượng mẫu lấy

Nếu lượng dược liệu dưới 5 kg thì số lượng mẫu được lấy không ít hơn 3 lần số lượng đem thử nghiệm. Nếu lượng dược liệu lớn hơn 5 kg thì số lượng mẫu lấy được xác định như sau:

Thuốc thông thường: 250 g đến 500 g;

Thuốc bột: 200 g;

Thuốc quý: 5 g đến 10 g (trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng).

Tạo mẫu đồng nhất

Mẫu sau khi lấy được trộn đều để có một mẫu đồng nhất dùng cho thử nghiệm. Nếu khối lượng mẫu đồng nhất lớn hơn vài lần so với mẫu thử nghiệm thì làm một mẫu trung bình.

Nếu dược liệu có kích thước nhỏ thì lấy một mẫu trung bình bằng phương pháp chia 4 như sau: San bằng mẫu thành hình vuông, chia mẫu theo 2 đường chéo thành 4 phần bằng nhau. Lấy 2 phần đối diện và trộn đều. Làm lại thao tác chia 4 cho đến khi thu được số lượng vừa đủ để làm mẫu thử và mẫu lưu.

Trong trường hợp các dược liệu có kích thước lớn thì lấy mẫu trung bình bằng phương pháp khác thích hợp.

Khối lượng của mẫu đồng nhất hoặc mẫu trung bình không ít hơn 3 lần số lượng của mẫu đem thử nghiệm. Lượng mẫu này được chia làm 3 phần, 1/3 dùng để phân tích, 1/3 để kiểm tra và số còn lại làm mẫu lưu giữ lại ít nhất 01 năm.

12.2 NHỮNG QUY ĐỊNH CHUNG VỀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG DƯỢC LIỆU

Dược liệu trước khi đưa vào sử dụng đều phải đưa vào kiểm tra chất lượng và phải đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn đã đăng ký như tiêu chuẩn dược điển hoặc tiêu chuẩn cơ sở.

Kiểm tra chất lượng dược liệu bao gồm việc mô tả, định tính, các phép thử tinh khiết, xác định hàm lượng chất chiết được và định lượng hoạt chất trong dược liệu. Việc kiểm tra dược liệu được tiến hành theo quy định sau:

1. Lấy mẫu kiểm nghiệm (Phụ lục 12.1).

2. Sử dụng các mô tả của chuyên luận, một mẫu đối chiếu (dược liệu hay chất tinh khiết) thích hợp đã đạt yêu cầu chất lượng theo chuyên luận riêng để xác nhận kết quả kiểm nghiệm.

3. Nếu dược liệu được kiểm tra đã bị vụn nát thì dược liệu đó vẫn phải đáp ứng các yêu cầu chung, trừ yêu cầu về mô tả trong chuyên luận tương ứng.

4. Nếu dược liệu đòi hỏi phải được làm thành bột trước khi định tính, định lượng thì phải tán dược liệu đó thành bột, rây và trộn đều như được mô tả trong Phụ lục 3.5 và trong chuyên luận riêng.

5. Chỉ tiêu “Mô tả” bao gồm những mô tả về hình thái, kích thước, màu sắc, mùi vị, các đặc điểm của bề mặt, vết bề hay mặt cắt của dược liệu hoặc đặc điểm thể chất của dược liệu.

a. “Hình thái” là hình dạng của dược liệu khô. Thông thường dược liệu được quan sát mà không cần xử lý trước. Các loại dược liệu là lá hay hoa bị nhăn nheo, khô quần có thể được làm ẩm, làm mềm và trải phẳng trước khi quan sát. Đối với một vài loại quả và hạt nếu cần có thể được làm mềm và loại bỏ vỏ hạt để kiểm tra đặc điểm bên trong.

b. “Kích thước” là chiều dài, đường kính và độ dày của dược liệu. Tiến hành đo trên một số mẫu. Cho phép một vài mẫu có giá trị hơi cao hơn hoặc thấp hơn giá trị đã xác định. Sử dụng thước đo chia vạch tới milimét. Đối với hạt hay vật có kích thước nhỏ, xếp 10 hạt gần nhau theo một hàng trên một tờ giấy có chia vạch tới milimét, đo và tính giá trị trung bình.

c. “Màu sắc” của dược liệu được quan sát bằng mắt thường ở ánh sáng ban ngày. Màu có thể được mô tả bằng các sắc độ như “hơi”, “đậm” hay “nhạt” (ví dụ màu hơi vàng, màu vàng đậm, màu vàng nhạt). Nếu màu được mô tả là màu phối hợp của hai màu thì màu chính là màu ghi trước (ví dụ trong màu nâu vàng thì màu nâu là màu chính).

d. Đặc điểm bên ngoài, bề mặt vết bề hay cắt ngang của dược liệu thường được quan sát trên dược liệu chưa sơ chế. Nếu quan sát thấy những đường vân khác nhau trên mặt bề thì có thể cắt phẳng rồi quan sát.

e. “Mùi” của dược liệu được kiểm tra bằng cách ngửi trực tiếp hoặc sau khi bẻ gãy và vỡ nát. Cũng có thể ngửi sau khi làm ẩm dược liệu bằng nước nóng.

f. “Vị” của dược liệu được kiểm tra bằng cách nếm trực tiếp dược liệu hoặc nếm dịch chiết nước. *Nên cẩn thận khi nếm những vị thuốc có độc.*

6. Định tính là những phương pháp dùng để nhận biết dược liệu, bao gồm các kinh nghiệm truyền thống, phương pháp vi học và các phương pháp lý hóa.

a. Nhận biết dược liệu dựa theo kinh nghiệm bằng phương pháp đơn giản và truyền thống như sự chìm hay nổi trong nước, tiếng nổ, màu của ngọn lửa hay khói và mùi khi đốt cháy dược liệu v.v...

b. Định tính dược liệu bằng phương pháp vi học là việc quan sát đặc điểm của các tế bào, các mô của lát cắt, của bột hay (trong một vài trường hợp) của bề mặt dược liệu dưới kính hiển vi. (Phụ lục 12.18.)

c. Định tính lý học là việc xác định các chỉ số như độ tan, tỉ trọng, chiết xuất, năng suất quay cực v.v... của các dược liệu (Phụ lục 6).

d. Định tính hóa học là phép thử một vài thành phần trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học. Phương pháp tiến hành được trình bày ở các chuyên luận dược liệu cụ thể.

e. Định tính sắc ký là việc sử dụng các phương pháp sắc ký như sắc ký lớp mỏng, sắc ký khí, sắc ký lỏng hiệu năng cao... để phát hiện một số thành phần có trong dược liệu; so sánh với chất chuẩn hay thành phần trong dược liệu chuẩn. Phương pháp tiến hành được trình bày ở Phụ lục 5 và các chuyên luận dược liệu cụ thể.

f. Định tính huỳnh quang là quan sát sự phát huỳnh quang của bề mặt hay mặt cắt dược liệu hoặc của dịch chiết dược liệu ở điều kiện thường hay sau khi cho tác dụng với acid, kiềm hay thuốc thử. Trừ khi có quy định riêng trong chuyên luận, mẫu thử được quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 366 nm, cách nguồn sáng khoảng 10 cm.

g. Trừ những qui định trong chuyên luận riêng, định tính vi thăng hoa thường được tiến hành như sau: Đặt một vòng kim loại đường kính khoảng 2 cm, cao khoảng 8 mm lên một tấm kim loại mỏng có kích thước hơi lớn hơn. Trải một lớp mỏng bột dược liệu trong vòng kim loại và đặt kín bằng một phiến kính bên trên đặt một miếng bông tẩm nước lạnh. Đặt tấm kim loại đã có dược liệu này lên một lưới amiant có 1 lỗ tròn đường kính khoảng 2 cm sao cho vòng kim loại có dược liệu nằm trên lỗ này. Đun nóng nhẹ phía dưới lỗ cho đến khi bột dược liệu bị cháy xém. Nhấc phiến kính ra và để nguội. Quan sát hình dạng và màu sắc của tinh thể chất được thăng hoa đọng lại trên phiến kính bằng kính hiển vi và/hoặc tiến hành phản ứng hóa học thích hợp đối với chất đã được thăng hoa.

7. Thử tinh khiết là cách kiểm tra độ tinh khiết của dược liệu. Tùy từng dược liệu mà thử tinh khiết có thể bao gồm một số hay tất cả các chỉ tiêu dưới đây:

a. Mất khối lượng do làm khô (Phụ lục 9.6 hay 12.13).

b. Tro toàn phần và tro không tan trong acid hydrocloric (Phụ lục 9.7 và 9.8).

c. Các tạp chất hữu cơ, các bộ phận khác của dược liệu, các dược liệu bị biến màu, hư thối (Phụ lục 12.11).

d. Tỉ lệ vụn nát của dược liệu (Phụ lục 12.12).

e. Hàm lượng kim loại nặng (Phụ lục 9.4.11).

f. Dư lượng các chất bảo vệ thực vật (Phụ lục 12.17).

g. Xác định chất chiết được là xác định hàm lượng các chất trong dược liệu có thể chiết được bằng dung môi (nước, ethanol hay một dung môi khác) (Phụ lục 12.10).

8. Định lượng là việc xác định hàm lượng của một hay một số chất có trong dược liệu bằng phương pháp hóa học, lý học hoặc sinh học. Định lượng bao gồm cả việc xác định hàm lượng chất béo (Phụ lục 12.9), tinh dầu (Phụ lục 12.7) và xác định hoạt lực bằng các phép thử sinh học.

12.3 PHÉP THỬ XÁC ĐỊNH CHIẾT KIẾT ALCALOID

Các phép thử sau đây được dùng để xác định alkaloid đã được lấy kiệt hay chưa.

Các alkaloid được chiết bằng nước hoặc dung môi là ethanol - nước

Sau khi chiết ít nhất 3 lần, lấy 0,1 ml đến 0,2 ml của dịch chiết tiếp theo, acid hoá bằng *dung dịch acid hydrocloric 2 M (TT)*, thêm 0,05 ml *dung dịch kali tetraiodomercurat (TT)* (thuốc thử Mayer) hoặc thêm 0,05 ml *dung dịch kali iodobismuthat (TT)* (thuốc thử Dragendorff) đối với các alkaloid thuộc họ Cà. Không được có tủa hay tạo dung dịch đục. Trong trường hợp dung môi chiết có độ cồn lớn hơn 25 % trở lên thì sau khi acid hoá, cần bay hơi hết dung môi (bằng cách đặt khay sứ chứa dịch chiết lên nồi cách thủy nóng) rồi mới thêm thuốc thử tạo tủa.

Các alkaloid được chiết bằng dung môi hữu cơ

Sau khi chiết ít nhất 3 lần, lấy 1 ml đến 2 ml dịch chiết tiếp theo, thêm 1 ml đến 2 ml *dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT)*, bay hơi hết dung môi hữu cơ, chuyển phần dịch lỏng còn lại vào một ống nghiệm và thêm 0,05 ml *dung dịch kali tetraiodomercurat (TT)* (thuốc thử Mayer) hoặc thêm 0,05 ml *dung dịch kali iodobismuthat (TT)* (thuốc thử Dragendorff) đối với các alkaloid thuộc họ Cà hoặc thêm 0,05 ml *dung dịch iod-kali iodid (TT)* (thuốc thử Boucharlat) đối với emetin. Không được thấy có tủa đục rõ tạo thành trong dung dịch.

12.4 ĐỊNH LƯỢNG ALDEHYD TRONG TINH DẦU

Cân chính xác khoảng 1 g tinh dầu cần xác định aldehyd vào một ống thủy tinh có nút mài (kích thước khoảng 150 mm × 25 mm), thêm 5 ml *toluen (TT)* và 15 ml *dung dịch hydroxylamin trong ethanol (TT)*, lắc mạnh và định lượng ngay với *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 % (CD)* cho tới khi màu đỏ chuyển sang màu vàng. Tiếp tục lắc và định lượng tới khi lớp dưới có màu vàng bền vững của chỉ thị sau khi đã lắc mạnh 2 min và để yên cho tách lớp; phản ứng xảy ra hoàn toàn trong khoảng

15 min. Kết quả chuẩn độ cho một giá trị tương đối về hàm lượng aldehyd trong mẫu.

Lập lại quy trình định lượng như trên, dùng dung dịch thử sơ bộ ở trên thêm 0,5 ml *dung dịch kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol 60 % (CF)* làm chuẩn màu cho điểm kết thúc định lượng. Tính hàm lượng aldehyd từ lần xác định thứ hai. Dùng đương lượng đã cho trong chuyên luận riêng.

12.5 ĐỊNH LƯỢNG CINEOL TRONG TINH DẦU

Cân 3,00 g mẫu thử vừa được làm khan bằng *natri sulfat khan (TT)* vào một ống nghiệm khô, thêm 2,10 g *o-cresol (TT)* đã chảy lỏng. Đặt ống nghiệm vào trong thiết bị xác định nhiệt độ đông đặc (Phụ lục 6.6) và làm lạnh, khuấy liên tục. Khi sự kết tinh bắt đầu, nhiệt độ hơi tăng lên một chút; ghi nhiệt độ cao nhất đạt được (t_1).

Làm chảy hỗn hợp trên nổi cách thủy nhưng không được để nhiệt độ vượt quá 5 °C so với nhiệt độ t_1 . Đặt lại ống nghiệm vào trong thiết bị đã được duy trì ở nhiệt độ dưới t_1 5 °C.

Khi sự kết tinh lại xảy ra hoặc khi nhiệt độ của hỗn hợp hạ xuống 3 °C dưới t_1 , khuấy liên tục; ghi nhiệt độ cao nhất mà hỗn hợp đông lại (t_2). Lập lại quá trình này cho tới khi 2 giá trị cao nhất thu được (t_2) chênh nhau không quá 0,2 °C. Nếu xảy ra quá trình chậm đông, thêm 1 tinh thể nhỏ của hỗn hợp gồm 3,00 g *cineol (TT)* và 2,10 g *o-cresol (TT)* đã chảy lỏng, để tạo sự kết tinh. Nếu t_2 thấp hơn 27,4 °C, lập lại thí nghiệm sau khi thêm 5,10 g hỗn hợp này.

Bảng 12.5.1

t_2 (°C)	% cineol (kl/kl)	t_2 (°C)	% cineol (kl/kl)
24	45,5	40	67,0
25	47,0	41	68,5
26	48,5	42	70,0
27	49,5	43	72,5
28	50,5	44	74,0
29	52,0	45	76,0
30	53,5	46	78,0
31	54,5	47	80,0
32	56,0	48	82,0
33	57,0	49	84,0
34	58,5	50	86,0
35	60,0	51	88,5
36	61,0	52	91,0
37	62,5	53	93,5
38	63,5	54	96,0
39	65,0	55	99,0

Xác định phần trăm cineol (kl/kl) tương ứng với điểm đông (t_2) từ Bảng 12.5.1 và ta có các giá trị trung gian bằng phương pháp nội suy. Nếu có cho thêm 5,10 g hỗn hợp

cineol và *o-cresol*, tính phần trăm (kl/kl) của cineol từ biểu thức $2 \times (A - 50)$; trong đó A là giá trị tương ứng cho một điểm đông của t_2 được lấy từ Bảng 12.5.1.

12.6 ĐỊNH LƯỢNG TANINOID TRONG ĐƯỢC LIỆU

Có thể áp dụng 1 trong 2 phương pháp sau:

Phương pháp 1

Cân chính xác một khối lượng bột dược liệu đã rây qua rây số 355 và chứa khoảng 1 g taninoid, cho vào một bình nón, thêm 150 ml *nước* và đun trên cách thủy trong 30 min. Để nguội, chuyển hỗn hợp vào bình định mức 250 ml. Thêm *nước* vừa đủ tới vạch, để lắng, lọc phần dịch lỏng qua giấy lọc đường kính 125 mm, bỏ 50 ml dịch lọc đầu. Phần dịch lọc thu được dùng làm dung dịch thử.

Xác định chất chiết được trong nước toàn phần

Lấy chính xác 25 ml dung dịch thử đem bốc hơi đến khô, sấy cân ở 105 °C trong 3 h. Để nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân, được khối lượng T_1 (g).

Xác định chất chiết được trong nước không liên kết với bột da

Lấy chính xác 100 ml dung dịch thử, thêm 6 g *bột da khô*. Lắc đều trong 15 min và lọc. Lấy chính xác 25 ml dịch lọc đem bốc hơi đến khô, sấy cân ở 105 °C trong 3 h. Để nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân, được khối lượng T_2 (g).

Xác định bột da tan trong nước

Lấy chính xác 100 ml *nước cất*, thêm 6 g *bột da khô*. Lắc đều trong 15 min và lọc. Lấy chính xác 25 ml dịch lọc bốc hơi đến khô, sấy cân ở 105 °C trong 3 h. Để nguội trong bình hút ẩm chứa silica gel. Cân, được khối lượng T_0 (g). Hàm lượng phần trăm (%) taninoid trong dược liệu được tính theo công thức:

$$\frac{(T_1 - T_2 + T_0) \times 10}{a} \times 100$$

Trong đó:

a là khối lượng dược liệu (g).

Phương pháp 2

Tiến hành thử nghiệm trong điều kiện tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg acid galic chuẩn vào một bình định mức 100 ml màu nâu, thêm *nước* để hòa tan và vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 50 ml màu nâu, thêm *nước* vừa đủ, lắc đều (dung dịch có nồng độ acid galic khoảng 0,05 mg/ml).

Xây dựng đường chuẩn: Hút chính xác lần lượt 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml dung dịch chuẩn vào các bình định mức 25 ml riêng biệt màu nâu, thêm vào mỗi bình 1 ml *thuốc thử phosphomolybdotungstic (TT)*, sau đó thêm lần lượt 11 ml, 10 ml, 9 ml, 8 ml, 7 ml *nước* vào các bình tương ứng, thêm *dung dịch natri carbonat 29 %* đến

vạch, lắc đều. Đo độ hấp thụ của các dung dịch thu được ở 760 nm (Phụ lục 4.1), chuẩn bị song song một mẫu trắng. Xây dựng đường chuẩn với độ hấp thụ là trục tung và nồng độ dung dịch là trục hoành.

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng bột dược liệu (theo qui định của chuyên luận riêng) vào bình định mức 250 ml màu nâu, thêm 150 ml nước, để qua đêm, sau đó lắc siêu âm trong 10 min, để nguội, thêm nước vừa đủ, lắc đều, để lắng. Lọc, bỏ 50 ml dịch lọc đầu, hút chính xác 20 ml dịch lọc vào bình định mức 100 ml màu nâu, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều.

Tiến hành

Hàm lượng phenol toàn phần: Hút chính xác 2 ml dung dịch thử vào bình định mức 25 ml màu nâu. Thêm 1 ml thuốc thử phosphomolybdotungstic (TT), trộn đều, thêm 10 ml nước, thêm dung dịch natri carbonat 29 % đến vạch, lắc đều, đo độ hấp thụ của dung dịch thu được như phương pháp trên và tính toán hàm lượng phenol theo acid galic trong dung dịch thử dựa trên đường chuẩn đã xây dựng.

Hàm lượng polyphenol không liên kết với casein: Hút chính xác 25 ml dung dịch thử vào bình nón nút mài 100 ml đã có 0,6 g casein, đậy kín. Đặt bình trong cách thủy ở nhiệt độ 30 °C trong 1 h, lắc đều, để nguội. Lọc, loại bỏ khoảng 5 ml dịch lọc đầu tiên, hút chính xác 2 ml dịch lọc sau cho vào bình định mức 25 ml màu nâu. Thêm 1 ml thuốc thử phosphomolybdotungstic (TT), trộn đều, thêm 10 ml nước và pha loãng bằng dung dịch natri carbonat 29 % đến vạch, lắc đều, đo độ hấp thụ của dung dịch thu được như phương pháp trên và tính toán hàm lượng phenol theo acid galic trong dung dịch dựa trên đường chuẩn đã xây dựng.

Tính kết quả

Hàm lượng taninoid tính theo acid galic trong dược liệu được tính theo công thức:

Taninoid toàn phần = (Hàm lượng phenol toàn phần) - (Hàm lượng polyphenol không liên kết với casein).

12.7 ĐỊNH LƯỢNG TÍNH DẦU TRONG DƯỢC LIỆU

Tính dầu trong dược liệu được định lượng bằng cách cất kéo hơi nước trong dụng cụ cất như mô tả ở Hình 12.7. Dịch cất được hứng vào một ống chia độ, sử dụng xylen để giữ lại tinh dầu, pha nước được chảy tự động trở lại bình cất.

Dụng cụ

Dụng cụ định lượng tính dầu bao gồm các bộ phận sau:

a) Một bình cầu thủy tinh đáy tròn có cổ ngắn với đường kính trong khoảng 29 mm.

b) Bộ phận ngưng cất (xem hình 12.7) nối kín được với bình cất, được làm từ thủy tinh có hệ số giãn nở thấp, bao gồm các bộ phận sau:

Khóa K' có một lỗ thông khí, nhánh K có một lỗ đường kính khoảng 1 mm trùng khớp với lỗ thông khí, bề mặt

cuối của nhánh K là thủy tinh mài có đường kính trong 10 mm.

Bầu hình quả lê J có thể tích 3 ml.

Ống JL chia vạch đến 0,01 ml.

Bầu tròn L có thể tích khoảng 2 ml.

M là một vòi 3 nhánh.

Điểm nối B cao hơn 20 mm so với vạch chia độ trên cùng.

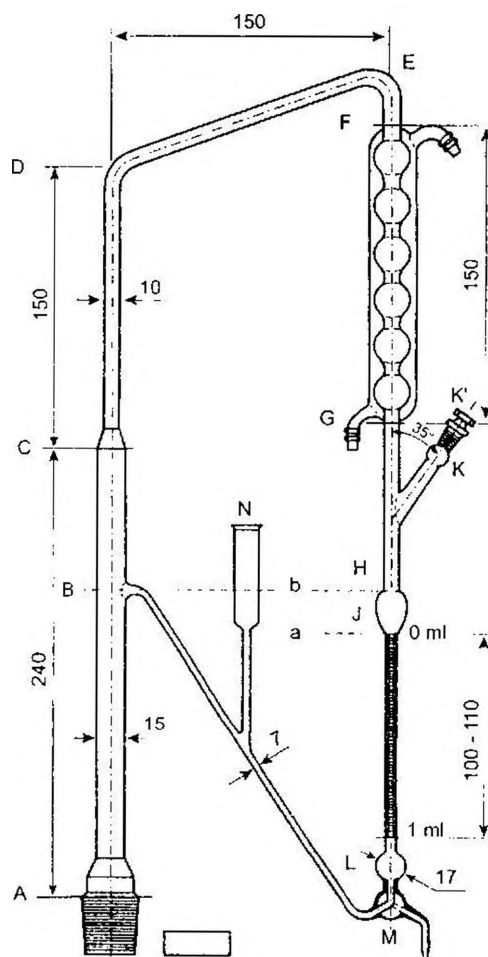
c) Bộ phận đốt nóng có thể điều chỉnh được nhiệt độ.

d) Giá đỡ thẳng đứng với vòng đỡ nằm ngang có gắn vật liệu cách điện.

Tiến hành

Cho một thể tích dung môi cất theo quy định vào bình cất, thêm vài mảnh đá bọt và lắp bộ ngưng cất vào. Thêm nước qua phễu N tới mức B. Mở khóa K', dùng pipet cho vào 1 ml xylen (TT) trừ khi có chỉ dẫn khác (tựa đầu pipet vào phía cuối của nhánh K). Đóng khóa K' sao cho lỗ thông trùng khớp. Đun bình cho đến sôi, sau đó nếu không có chỉ dẫn gì khác thì điều chỉnh tốc độ cất sao cho cất được 2 ml/min đến 3 ml/min.

Xác định tốc độ cất như sau: Mở vòi 3 nhánh M để hạ mức dịch cất trong ống đến vạch (a) của bầu (J), khóa vòi M lại và xác định thời gian cần thiết để cất được đến vạch (b).



Hình 12.7 - Dụng cụ cất tính dầu
(Kích thước tính bằng mm)

Mở vòi M và tiếp tục cất, điều chỉnh nhiệt độ đun để có tốc độ cất theo quy định. Cất trong 30 min. Ngừng cất, đọc thể tích xylen trong ống hứng chia độ khi nhiệt độ ống hứng trở về nhiệt độ phòng.

Cho vào bình cất một lượng mẫu theo qui định và tiếp tục cất với thời gian và tốc độ cất như quy định của chuyên luận riêng. Ngừng cất, đọc thể tích hỗn hợp tinh dầu và xylen trong ống hứng chia độ khi nhiệt độ ống hứng trở về nhiệt độ phòng. Thể tích đọc được lần này trừ đi thể tích xylen sẽ cho thể tích tinh dầu trong lượng mẫu định lượng. Tính toán kết quả thu được biểu thị theo ml tinh dầu có trong một kg mẫu thử hoặc theo phần trăm (số ml tinh dầu trong 100 g mẫu thử).

12.8 CÁC PHÉP THỬ CỦA TINH DẦU

Dầu béo và nhựa trong tinh dầu

Nhỏ 1 giọt tinh dầu lên giấy mỏng, để khô trong gió hay hơi nóng nhẹ cho bay hết mùi tinh dầu. Không được xuất hiện vết bóng mờ hoặc vết dầu mỡ.

Ester liên quan

Đun nóng 1 ml tinh dầu với 3 ml dung dịch kali hydroxyd 10 % trong ethanol 96 % (TT) mới pha trên cách thủy trong 2 min. Không được xuất hiện tinh thể trong vòng 30 min kể từ lúc bắt đầu để nguội.

Cẩn sau khi bay hơi

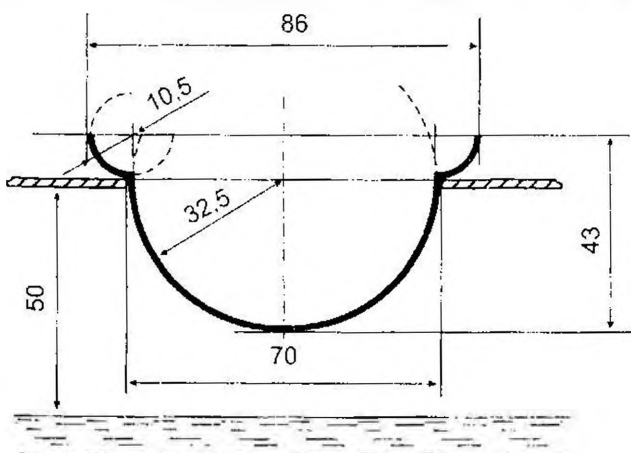
Cẩn sau khi bay hơi là phần trăm khối lượng của tinh dầu còn lại sau khi bay hơi trên cách thủy ở điều kiện như sau:

Thiết bị

Nồi cách thủy có nắp đậy với những lỗ có đường kính 70 mm. Cốc cô bằng thủy tinh chịu nhiệt, trơ về mặt hóa học. Bình hút ẩm.

Cách tiến hành

Cân 5,00 g tinh dầu (trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận) vào một cốc cô đã được cân bị sau khi đun nóng trên cách thủy trong 1 h và làm nguội trong bình hút ẩm. Đặt



Hình 12.8 - Dụng cụ xác định cẩn tinh dầu sau khi bay hơi (Kích thước tính bằng mm)

cốc cô lên trên nồi cách thủy tại vị trí lỗ có đường kính 70 mm và giữ cho mực nước cách dưới mặt nồi cách thủy khoảng 50 mm trong suốt thời gian tiến hành (xem Hình 12.8). Đun sôi mạnh nước ở nồi cách thủy dưới áp suất thường. Cốc tinh dầu trên nồi cách thủy sôi đến cạn trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng. Làm nguội cốc cô trong bình hút ẩm và cân khối lượng.

Độ tan trong ethanol

Hút chính xác 1,0 ml tinh dầu vào ống thủy tinh nút mài 25 ml hoặc 30 ml và đặt trong thiết bị ổn nhiệt duy trì ở nhiệt độ $(20 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$. Dùng buret có dung tích ít nhất 20 ml, thêm từng 0,1 ml ethanol có nồng độ như chỉ dẫn của chuyên luận cho đến khi tan thành dung dịch hoàn toàn, sau đó tiếp tục thêm từng 0,5 ml đến 20 ml, lắc mạnh thường xuyên. Đọc thể tích ethanol đã dùng để tạo thành dung dịch trong và nếu dung dịch bị đục hoặc có màu trắng sữa trước khi lượng ethanol thêm vào đạt 20 ml thì đọc thể tích tại thời điểm xuất hiện đục hoặc màu trắng sữa và đọc thể tích tại thời điểm hết đục hay hết màu trắng sữa.

Nếu dung dịch không trong, khi đã thêm 20 ml ethanol có nồng độ như chỉ dẫn của chuyên luận, lặp lại phép thử với ethanol có nồng độ cao hơn.

Một tinh dầu được gọi là "Tan trong v hoặc hơn thể tích ethanol có nồng độ t" có nghĩa là khi dùng v thể tích ethanol để tạo thành dung dịch trong, dung dịch vẫn trong sau khi đã thêm ethanol cùng nồng độ đến 20 thể tích, so sánh với tinh dầu chưa pha loãng.

Một tinh dầu được gọi là "Tan trong v thể tích ethanol có nồng độ t, chuyển thành đục khi pha loãng" có nghĩa là khi dung dịch trong với v thể tích ethanol chuyển thành đục với v_1 thể tích (v_1 nhỏ hơn 20) và giữ nguyên tình trạng khi thêm từ từ ethanol cùng nồng độ đến 20 thể tích.

Một tinh dầu được gọi là "Tan trong v thể tích ethanol, chuyển thành đục giữa khoảng v_1 và v_2 thể tích ethanol" có nghĩa là khi dung dịch trong với v thể tích ethanol chuyển thành đục với v_1 thể tích (v_1 nhỏ hơn 20) và giữ nguyên tình trạng khi thêm từ từ ethanol cùng nồng độ đến v_2 thể tích và chuyển thành đục trong (v_2 nhỏ hơn 20).

Một tinh dầu được gọi là "Tan thành dung dịch sữa" có nghĩa là khi dung dịch trong ethanol có màu hơi xanh nhẹ tương tự như màu của hỗn hợp chuẩn đục mới pha gồm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 1,7 % (kl/tt) trộn với 0,05 ml acid nitric (TT), thêm 50 ml dung dịch natri clorid 0,0012 % (TT), lắc đều và để yên trong chỗ tối 5 min.

Nước

Trộn 10 giọt tinh dầu với 1 ml carbon disulfid (TT), dung dịch phải trong.

12.9 DẦU BÉO

Tạp chất kiềm

Trộn 10 ml acetone (TT) và 0,3 ml nước trong ống nghiệm, thêm 0,05 ml dung dịch xanh bromophenol 0,04 % trong ethanol 96 % (TT), trung hòa dung dịch (nếu cần) bằng dung dịch acid hydrocloric 0,01 M (TT) hoặc dung dịch

natri hydroxyd 0,01 M (TT). Thêm 10 ml dầu vào hỗn hợp trên, lắc và để lắng. Không quá 0,1 ml dung dịch *acid hydrochloric 0,01 M (CD)* cần thêm vào để làm chuyển màu lớp dung dịch phía trên sang màu vàng.

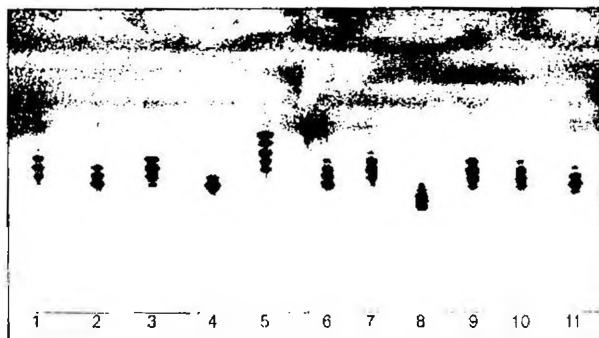
Định tính dầu béo bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành theo Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4). *Bản mỏng*: Chất hấp phụ là octadecylsilyl silica gel cho sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC silica gel RP-18 là phù hợp).

Dung dịch thử: Hòa tan khoảng 20 mg (1 giọt) dầu cần kiểm tra trong 3 ml *dicloromethan (TT)*, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan khoảng 20 mg (1 giọt) dầu ngô trong 3 ml *dicloromethan (TT)*.

Chấm riêng biệt lên bản mỏng 1 μ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký hai lần, mỗi lần 0,5 cm với dung môi khai triển là *ether (TT)*. Triển khai sắc ký hai lần nữa, mỗi lần 8 cm với dung môi khai triển là hỗn hợp *dicloromethan - acid acetic băng - acetone (20 : 40 : 50)*. Để khô bản mỏng ngoài không khí và phun dung dịch *acid phosphomolybdic 10 %* trong *ethanol 96 % (TT)*. Sấy bản mỏng ở 120 °C trong khoảng 3 min và quan sát dưới ánh sáng tự nhiên. Sắc ký đồ xuất hiện các vết đặc trưng như trên hình dưới đây.



- | | |
|------------------------|--------------------|
| 1. Dầu lạc | 6. Dầu hạt cải |
| 2. Dầu vừng | 7. Dầu hạt lanh |
| 3. Dầu ngô | 8. Dầu oliu |
| 4. Dầu hạt cải | 9. Dầu hướng dương |
| (không có acid erucic) | 10. Dầu hạnh nhân |
| 5. Dầu đậu tương | 11. Dầu mầm lúa mì |

Hình 12.9 - Sắc ký đồ định tính dầu béo

Phép thử các dầu tạp bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành theo Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4). *Bản mỏng*: Chất hấp phụ là *kieselguhr G (TT)*. Làm ẩm bản mỏng khô bằng cách đặt trong bình có lớp dung môi dày 5 mm là hỗn hợp *parafin lỏng - ether dầu hỏa (50 °C đến 70 °C) (10 : 90)*. Để đến khi dung môi khai triển được ít nhất 12 cm, lấy bản mỏng ra và để khô ngoài không khí trong 5 min.

Phu động: Nước - acid acetic băng (1 : 9).

Dung dịch thử: Đun hồi lưu 2 g chế phẩm với 30 ml dung dịch *kali hydroxyd 0,5 M* trong *ethanol (TT)* trong 45 min,

pha loãng với 50 ml nước, để nguội, chuyển sang bình cạn, lắc với *ether ethylic (TT)* 3 lần, mỗi lần 50 ml, loại bỏ lớp dịch chiết ether. Acid hóa lớp nước bằng *acid hydrochloric (TT)* rồi chiết bằng *ether ethylic (TT)* ba lần, mỗi lần 50 ml. Tập trung các dịch chiết ether, rửa bằng nước ba lần, mỗi lần 10 ml, làm khan dịch chiết ether bằng *natri sulfat khan (TT)* và lọc. Cô dịch chiết ether trên cách thủy, hòa tan 40 mg cặn trong 4 ml *cloroform (TT)*. Các acid béo có thể thu được từ dung dịch đã xà phòng hóa trong quá trình xác định các chất không xà phòng hóa.

Dung dịch đối chiếu: Chuẩn bị giống như dung dịch thử nhưng dùng 2 g hỗn hợp gồm 19 thể tích dầu ngô và 1 thể tích dầu hạt cải thay cho mẫu thử.

Tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 3 μ l mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 8 cm. Lấy bản mỏng ra khỏi bình, làm khô bản mỏng ở 110 °C trong 10 min trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận, đặt bản mỏng vào bình bão hòa hơi iod. Sau một thời gian, xuất hiện các vết từ màu nâu đến nâu vàng. Lấy bản mỏng ra, để yên vài phút cho đến khi màu nâu trên nền bản mỏng biến mất. Phun lên bản mỏng dung dịch *hồ tinh bột (TT)*. Các vết màu xanh xuất hiện, các vết này có thể chuyển thành màu nâu khi để khô và lại chuyển thành màu xanh sau khi phun nước. Quan sát dưới ánh sáng thường. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử luôn xuất hiện các vết với các giá trị R_f khoảng 0,5 (acid oleic) và khoảng 0,65 (acid linoleic), tương ứng với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có thể có vết với giá trị R_f khoảng 0,75 (acid linolenic) nhưng không được có vết có giá trị R_f khoảng 0,25 (acid erucic), tương ứng với vết xuất hiện trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Phép thử các dầu tạp bằng phương pháp sắc ký khí

Phép thử các dầu tạp được xác định bằng phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), dựa trên các methyl ester của acid béo có trong dầu béo.

Phương pháp A

Phương pháp này không áp dụng với các dầu béo có chứa acid béo dạng glycerid với các nhóm epoxy-, hydroepoxy-, cyclopropyl hoặc nhóm cyclopropenyl, hoặc các dầu béo có chứa tỷ lệ lớn lượng acid béo có chuỗi carbon nhỏ hơn 8 hay dầu béo có chỉ số acid lớn hơn 2,0.

Dung dịch thử: Trừ các qui định trong chuyên luận riêng, làm khan dầu béo thử trước giai đoạn methyl hóa. Cân 1,0 g chế phẩm vào bình đáy tròn 25 ml có cổ bình thủy tinh nổi được với ống sinh hàn hồi lưu, cho vài viên đá bọt vào trong bình. Thêm 10 ml *methanol khan (TT)* và 0,2 ml dung dịch *kali hydroxyd 6 %* trong *methanol*. Lắp sinh hàn hồi lưu, cho khí nitơ chạy qua hỗn hợp với tốc độ khoảng 50 ml trong 1 min, lắc và đun sôi. Khi dung dịch trở nên trong suốt (thường sau khoảng 10 min), tiếp tục đun trong 5 min. Làm nguội bình dưới dòng nước và chuyển dung dịch sang bình cạn. Rửa bình bằng 5 ml *heptan (TT)* và chuyển dịch rửa vào bình cạn, lắc. Thêm 10 ml dung dịch *natri clorid 20 % (TT)* và lắc mạnh. Để yên cho tách lớp

và chuyển lớp dung môi sang lọ có chứa *natri sulfat khan* (TT). Để lắng và lọc.

Dung dịch đối chiếu (a): Chuẩn bị 0,50 g hỗn hợp chuẩn với thành phần được mô tả ở một trong các Bảng 12.9 như chỉ dẫn của chuyên luận riêng (nếu chuyên luận riêng không đề cập đến, sử dụng thành phần được mô tả trong Bảng 12.9.1). Hòa tan trong *heptan* (TT) và pha loãng đến 50,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (b): Pha loãng 1 ml dung dịch đối chiếu (a) thành 10,0 ml bằng *heptan* (TT).

Dung dịch đối chiếu (c): Chuẩn bị 0,50 g hỗn hợp các methyl ester của acid béo⁽¹⁾ có thành phần tương ứng với các acid béo cần xác định của mẫu thử theo qui định của chuyên luận riêng. Hòa tan trong *heptan* (TT) và pha loãng đến 50,0 ml với cùng dung môi. Có thể sử dụng các hỗn hợp methyl ester bán sẵn.

Điều kiện sắc ký:

Cột:

Chất liệu: Silica nung chảy, thủy tinh hoặc thạch anh.

Kích cỡ: Dài 10 m đến 30 m, đường kính 0,2 mm đến 0,8 mm.

Pha tĩnh: Poly[(cyanopropyl)(methyl)][(phenyl)(methyl)] siloxan hoặc macrogol 20 000 (lớp phim dày 0,1 μm đến 0,5 μm) hoặc một số pha tĩnh thích hợp khác.

Khí mang: Khí heli dùng cho sắc ký hoặc khí hydrogen dùng cho sắc ký.

Tốc độ dòng: 1,3 ml/min (cho cột có đường kính 0,32 mm).

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 100 hoặc ít hơn, tùy thuộc vào đường kính trong của cột sử dụng (1 : 50 khi đường kính cột là 0,32 mm).

Nhiệt độ:

Cột: 160 °C đến 200 °C, tùy thuộc vào chiều dài và loại cột sử dụng (200 °C cho cột dài 30 m và bao bằng lớp macrogol 20 000). Nếu cần hoặc theo chỉ dẫn riêng, tăng nhiệt độ của cột với tốc độ 3 °C /min từ 170 °C đến 230 °C (cho cột dùng macrogol 20 000).

Buồng tiêm: 250 °C.

Detector: 250 °C.

Phát hiện: Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1 μl .

Độ nhạy: Chiều cao của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a) từ 50 % đến 70 % toàn thang đo khi ghi sắc ký đồ.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống khi sử dụng hỗn hợp chuẩn trong các Bảng 12.9.1 hoặc 12.9.3

Độ phân giải: Không dưới 1,8 giữa pic methyl oleat và methyl stearat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a).

Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu: Không dưới 5 với pic methyl myristat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (b).

Số đĩa lý thuyết: Không dưới 30000 tính theo pic methyl stearat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a).

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống khi sử dụng hỗn hợp chuẩn trong Bảng 12.9.2

Độ phân giải: Không dưới 4,0 giữa pic methyl caprylat và methyl caprat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a).

Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu: Không dưới 5 với pic methyl caproat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (b).

Số đĩa lý thuyết: Không dưới 15 000 tính theo pic methyl caprat trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a).

Đánh giá sắc đồ

Tránh điều kiện thử nghiệm có chiều hướng làm che giấu pic (sự có mặt của các thành phần khác nhau rất ít về thời gian lưu, ví dụ như acid linolenic và acid arachidic).

Phân tích định tính

Xác định các pic trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (c), các pic có thể được xác định bằng đường chuẩn với sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a) và thông tin ghi ở các Bảng 12.9.1, 12.9.2 và 12.9.3.

a) Sử dụng điều kiện đẳng nhiệt để tính logarit của sự biến đổi thời gian lưu như một hàm của số nguyên tử carbon trong acid béo; định tính các pic dựa trên đường thẳng lập được theo cách trên và giá trị "chiều dài chuỗi carbon tương ứng" của các pic khác nhau. Đường chuẩn của các acid béo no là một đường thẳng. Logarit sự biến đổi thời gian lưu của các acid béo không no nằm trên đường thẳng này và có vị trí tương ứng với giá trị không nguyên của số nguyên tử carbon được biết từ giá trị tương ứng với chiều dài chuỗi.

b) Sử dụng chương trình nhiệt độ tuyến tính để xác định thời gian lưu dựa trên số nguyên tử carbon của acid béo, định tính bằng cách so sánh với đường chuẩn của hỗn hợp chuẩn.

Phân tích định lượng

Thông thường, sử dụng phương pháp tính phần trăm mà trong đó tổng diện tích của tất cả các pic trên sắc ký đồ ngoại trừ dung môi được tính là 100 %. Hàm lượng của mỗi thành phần được tính dựa trên tỷ lệ của diện tích pic tương ứng so với tổng diện tích của tất cả các pic thu được từ mẫu đem thử. Loại bỏ các pic có diện tích nhỏ hơn 0,05 % so với tổng diện tích pic.

Trong một vài trường hợp như sự có mặt của các acid béo từ 12 nguyên tử carbon trở xuống, hệ số hiệu chỉnh có thể được sử dụng trong các chuyên luận riêng để chuyển đổi diện tích pic thành tỷ lệ phần trăm kl/kl.

Phương pháp B

Phương pháp này không áp dụng với các dầu béo có chứa acid béo dạng glycerid với các nhóm epoxy-, hydroepoxy-, cyclopropyl, nhóm cyclopropenyl, hoặc các dầu béo có chỉ số acid lớn hơn 2,0.

Dung dịch thử:

Lấy 0,100 g chế phẩm cho vào ống ly tâm 10 ml có nắp xoáy. Hòa tan trong 1 ml *heptan* (TT) và 1 ml *dimethyl carbonat* (TT), đun nóng nhẹ (50 °C đến 60 °C) và lắc mạnh. Thêm 1 ml *dung dịch natri* (TT) 1,2 % trong *methanol khan* (TT) (được pha chế hết sức cẩn thận) khi dung dịch còn ấm, lắc mạnh trong 5 min. Thêm 3 ml *nước* và lắc mạnh trong 30 s. Ly tâm trong 15 min với tốc độ 1500 r/min. Tiêm 1 μl pha hữu cơ.

Dung dịch đối chiếu và đánh giá sắc đồ: Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tiến hành như mô tả ở phương pháp A.

Cột:

Chất liệu: Silica nung chảy.

Kích cỡ: Dài 30 m, đường kính 0,25 mm.

Pha tĩnh: Macrogol 20 000 (lớp phim dày 0,25 μm).

Khí mang: Khí heli dùng cho sắc ký.

Tốc độ dòng: 0,9 ml/min

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 100.

Nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
	0 - 15	100
Cột	15 - 36	100 → 225
	36 - 61	225
Buồng tiêm		250
Detector		250

Phát hiện: Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1 μl .

Phương pháp C

Phương pháp này không áp dụng với các dầu béo có chứa acid béo dạng glycerid với các nhóm epoxy-, hydroepoxy-, aldehyd, keton, cyclopropyl, nhóm cyclo-propenyl, và kết hợp với các đa acid béo không no hay các nhóm acetylenic do các nhóm này bị phá hủy một phần hay toàn bộ.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,10 g chế phẩm trong 2 ml dung dịch natri hydroxyd 2 % trong methanol trong bình nón 25 ml và đun sôi hồi lưu trong 30 min. Thêm 2,0 ml dung dịch boron trifluorid (TT) qua ống sinh hàn và tiếp tục đun sôi trong 30 min. Thêm 4 ml heptan (TT) qua ống sinh hàn và tiếp tục đun sôi trong 5 min. Làm nguội, thêm 10 ml dung dịch natri clorid bão hòa (TT), lắc trong 15 s và thêm tiếp dung dịch natri clorid bão hòa (TT) cho đến khi pha dung môi trên dâng lên đến cổ bình. Lấy 2 ml pha dung môi trên, rửa bằng nước ba lần, mỗi lần 2 ml và làm khan bằng natri sulfat khan (TT).

Dung dịch đối chiếu và đánh giá sắc đồ: Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, tiến hành như mô tả ở phương pháp A.

Bảng 12.9.1 - Hỗn hợp chuẩn để lập đường chuẩn⁽²⁾

Tỷ lệ thành phần (phần trăm kl/kl)			
Thành phần hỗn hợp	Tương ứng với chiều dài chuỗi ⁽³⁾	Đẳng nhiệt	Chương trình nhiệt độ tuyến tính
Methyl laurat	12,0	5	10
Methyl myristat	14,0	5	15
Methyl palmitat	16,0	10	15
Methyl stearat	18,0	20	20
Methyl arachidat	20,0	40	20
Methyl oleat	18,3	20	20

Bảng 12.9.2 - Hỗn hợp chuẩn để lập đường chuẩn⁽²⁾

Tỷ lệ thành phần (phần trăm kl/kl)			
Thành phần hỗn hợp	Tương ứng với chiều dài chuỗi ⁽³⁾	Đẳng nhiệt	Chương trình nhiệt độ tuyến tính
Methyl caproat	6,0	5	10
Methyl caprylat	8,0	5	35
Methyl caprat	10,0	10	35
Methyl laurat	12,0	20	10
Methyl myristat	14,0	40	10

Bảng 12.9.3 - Hỗn hợp chuẩn để lập đường chuẩn⁽²⁾

Tỷ lệ thành phần (phần trăm kl/kl)			
Thành phần hỗn hợp	Tương ứng với chiều dài chuỗi ⁽³⁾	Đẳng nhiệt	Chương trình nhiệt độ tuyến tính
Methyl myristat	14,0	5	15
Methyl palmitat	16,0	10	15
Methyl stearat	18,0	15	20
Methyl arachidat	20,0	20	15
Methyl oleat	18,3	20	15
Methyl cicosenoat	20,2	10	10
Methyl behenat	22,0	10	5
Methyl lignocerrat	24,0	10	5

(1): Methyl ester của acid béo phải đạt quy định về chất chuẩn của Dược điển Việt Nam.

(2): Áp dụng cho hệ thống sắc ký khí với cột mao quản và buồng tiêm chia dòng, các thành phần có mạch dài nhất của hỗn hợp mẫu thử cần được thêm vào hỗn hợp chuẩn khi tiến hành phân tích định lượng sử dụng đường chuẩn.

(3): Giá trị được tính dựa trên đường chuẩn với cột macrogol 20 000.

12.10 XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT CHIẾT ĐƯỢC TRONG DƯỢC LIỆU

Phương pháp xác định các chất chiết được bằng nước

Phương pháp chiết lạnh: Nếu không có chỉ dẫn đặc biệt trong chuyên luận riêng, cân chính xác khoảng 4,000 g bột dược liệu có cỡ bột vừa thô cho vào trong bình nón 250 ml đến 300 ml. Thêm chính xác 100,0 ml nước, đậy kín, ngâm lạnh, thỉnh thoảng lắc trong 6 h đầu, sau đó để yên 18 h. Lọc qua phễu lọc khô vào một bình hứng khô thích hợp. Lấy chính xác 20 ml dịch lọc cho vào một cốc thủy tinh đã cân bì trước, cô trong cách thủy đến gần khô. Sấy cân ở 105 °C trong 3 h, lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 min, cân nhanh để xác định khối lượng cân sau khi

sấy, tính phần trăm lượng chất chiết được bằng nước theo dược liệu khô.

Phương pháp chiết nóng: Nếu không có chỉ dẫn đặc biệt trong chuyên luận riêng, cân chính xác khoảng 2,000 g đến 4,000 g bột dược liệu có cỡ bột vừa thô cho vào bình nón 100 ml hoặc 250 ml. Thêm chính xác 50,0 ml hoặc 100,0 ml nước, đậy kín, cân xác định khối lượng, để yên 1 h, sau đó đun sôi nhẹ dưới hồi lưu 1 h, để nguội, lấy bình nón ra, đậy kín, cân để xác định lại khối lượng, dùng nước để bổ sung phần khối lượng bị giảm, lọc qua phễu lọc khô vào một bình hứng khô thích hợp. Lấy chính xác 25 ml dịch lọc vào cốc thủy tinh đã cân bì trước, cô trong cách thủy đến gần khô, cân thu được sấy ở 105 °C trong 3 h, lấy ra để nguội trong bình hút ẩm 30 min, cân nhanh để xác định khối lượng cần. Tính phần trăm lượng chất chiết được bằng nước theo dược liệu khô.

Phương pháp xác định các chất chiết được bằng ethanol hoặc methanol

Dùng các phương pháp tương tự như phương pháp xác định các chất chiết được bằng nước. Tuy theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng mà dùng ethanol hoặc methanol có nồng độ thích hợp để thay nước làm dung môi chiết. Với phương pháp chiết nóng thì nên đun trong cách thủy nếu dung môi chiết có độ sôi thấp.

12.11 XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LẮN TRONG DƯỢC LIỆU

Tạp chất lẫn trong dược liệu bao gồm tất cả các chất ngoài quy định của dược liệu đó như: Đất, đá, rơm rạ, cây cỏ khác, các bộ phận khác của cây không quy định làm dược liệu, xác côn trùng...

Cách xác định

Cân một lượng mẫu vừa đủ theo chỉ dẫn trong chuyên luận riêng hoặc trong ghi chú dưới đây, dàn mỏng trên tờ giấy, quan sát bằng mắt thường hoặc kính lúp, khi cần có thể dùng rây để phân tách tạp chất và dược liệu.

Cân phần tạp chất và tính phần trăm như sau:

$$x\% = \frac{a}{p} \times 100$$

Trong đó:

a là khối lượng tạp chất tính bằng gam;

p là khối lượng mẫu thử tính bằng gam.

Ghi chú:

1. Trong một số trường hợp nếu tạp chất rất giống với thuốc, có thể phải làm các phản ứng định tính hoá học, phương pháp vật lý hoặc dùng kính hiển vi để phát hiện tạp chất. Tỷ lệ tạp chất được tính bao gồm cả tạp chất được phát hiện bằng phương pháp này.

2. Lượng mẫu lấy để thử nếu chuyên luận riêng không quy định thì lấy như sau:

Hạt và quả rất nhỏ (như hạt Mã đề): 10 g.

Hạt và quả nhỏ: 20 g.

Dược liệu thái thành lát: 50 g.

12.12 XÁC ĐỊNH TỶ LỆ VỤN NÁT CỦA DƯỢC LIỆU

Cân một lượng dược liệu nhất định (p gam) đã được loại tạp chất. Rây bằng rây có số rây quy định theo chuyên luận riêng hoặc chọn bằng tay những phần vụn đối với các bộ phận cây không thái nhỏ. Cân toàn bộ phần đã lọt qua rây và phần vụn đã chọn (a gam). Tính tỷ lệ vụn nát (X %) (từ kết quả trung bình của ba lần thực hiện) theo công thức:

$$X\% = \frac{a}{p} \times 100$$

Ghi chú:

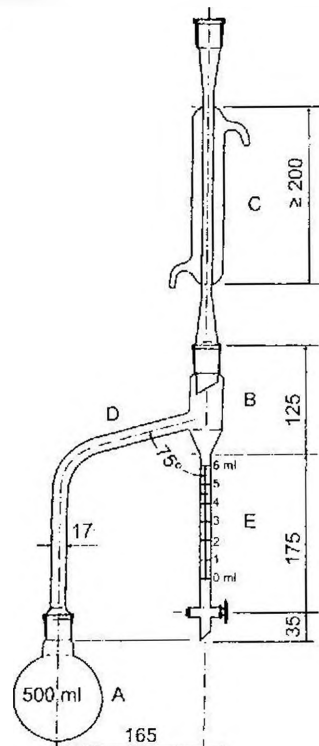
Lượng dược liệu lấy để thử (tùy theo bản chất của dược liệu) từ 100 g đến 200 g.

Đối với dược liệu mỏng manh thì chỉ lắc nhẹ, tránh làm vụn nát thêm. Phần bụi và bột vụn không phân biệt được bằng mắt thường được tính vào mục tạp chất.

12.13 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NƯỚC BẰNG PHƯƠNG PHÁP CẮT VỚI DUNG MÔI

Dụng cụ

Dụng cụ xác định hàm lượng nước (Hình 12.13) gồm có bình cầu (A) nối qua ống (D) với ống hình trụ (B); ống này gắn với ống hứng chia độ (E) ở phía dưới và lắp với ống sinh hàn ngược (C) ở phía trên. Ống hứng (E) được chia độ đến 0,1 ml để cho sai số của phép đọc thể tích không vượt quá 0,05 ml. Nguồn nhiệt thích hợp là bếp điện có biến trở hoặc đun cách dầu.



Hình 12.13 - Dụng cụ xác định hàm lượng nước bằng phương pháp cắt với dung môi.
(Kích thước tính bằng mm)

Cách tiến hành

Rửa sạch ống hứng và ống sinh hàn với nước rồi làm khô. Thêm 200 ml *toluen* (TT) và khoảng 2 ml nước vào bình cầu khô. Cát khoảng 2 h, để nguội trong 30 min rồi đọc thể tích nước cất được ở ống hứng (V_1), chính xác đến 0,05 ml.

Thêm vào bình cầu một lượng mẫu thử đã cân chính xác tới 0,01 g có chứa khoảng 2 ml đến 3 ml nước. Thêm vài mảnh đá bọt. Đun nóng nhẹ trong 15 min; khi toluen bắt đầu sôi thì điều chỉnh nguồn cấp nhiệt để cất với tốc độ khoảng 2 giọt dịch cất trong 1 s. Khi đã cất được phần lớn nước sang ống hứng thì nâng tốc độ cất lên 4 giọt dịch cất trong 1 s. Tiếp tục cất cho đến khi mực nước cất được trong ống hứng không tăng lên nữa, dùng 5 ml đến 10 ml *toluen* (TT) rửa thành trong ống sinh hàn rồi cất thêm 5 min nữa. Sau đó, tách bộ cất khỏi nguồn cấp nhiệt, để cho ống hứng nguội đến nhiệt độ phòng. Nếu có những giọt nước còn đọng trên thành ống sinh hàn thì dùng 5 ml *toluen* (TT) để rửa kéo xuống. Khi lớp nước và lớp toluen đã được phân tách hoàn toàn, đọc thể tích nước trong ống hứng (V_2). Tính tỷ lệ phần trăm nước trong mẫu thử theo công thức sau:

$$\frac{100 (V_2 - V_1)}{m}$$

Trong đó:

m

V_1 là số ml nước cất được sau lần cất đầu;

V_2 là số ml nước cất được sau hai lần cất;

M là số g mẫu đã cân đem thử.

12.15 CÁN KHÔ CỦA CÁC CHẤT CHIẾT ĐƯỢC TRONG DƯỢC LIỆU

Cho nhanh 2,00 g hoặc 2,0 ml mẫu thử vào một cốc đáy bằng có đường kính khoảng 50 mm và chiều cao khoảng 30 mm đã được sấy khô và xác định khối lượng. Cốc đến khô cạn trên cách thủy và sấy ở 100 °C đến 105 °C trong 3 h. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm có chất hút ẩm phosphor pentoxyl hoặc silica gel và cân. Tính kết quả theo phần trăm khối lượng hoặc theo tỷ lệ gam trên lít.

12.16 MẤT KHỐI LƯỢNG DO LÀM KHÔ CỦA CÁC CHẤT CHIẾT ĐƯỢC TRONG DƯỢC LIỆU

Cân nhanh 0,50 g mẫu thử đã nghiền thành bột mịn vào một cốc đáy bằng có đường kính khoảng 50 mm và chiều cao khoảng 30 mm đã được sấy khô và xác định khối lượng. Sấy ở 100 °C đến 105 °C trong 3 h. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm có chất hút ẩm phosphor pentoxyl hoặc silica gel và cân. Tính toán kết quả theo phần trăm khối lượng.

12.17 DƯ LƯỢNG HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT

Định nghĩa

Hóa chất bảo vệ thực vật là những chất hay hỗn hợp nhiều chất được sử dụng nhằm ngăn cản, tiêu diệt hoặc kiểm soát dịch hại đối với các loài cây hoặc động vật làm thuốc mà những chất này có thể gây tổn hại hoặc ảnh hưởng đến quá trình sản xuất, chế biến, bảo quản, vận chuyển hoặc buôn bán dược liệu. Khái niệm này bao gồm cả các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các chất làm rụng lá hoặc làm khô, hoặc bất cứ chất nào được sử dụng trước hoặc sau thu hoạch để bảo quản dược liệu khỏi bị hỏng trong quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Giới hạn

Dược liệu được kiểm tra ít nhất phải đáp ứng yêu cầu về giới hạn ghi trong Bảng 12.17.1 (trừ những chỉ dẫn trong chuyên luận riêng).

Đối với hóa chất bảo vệ thực vật không liệt kê trong Bảng 12.17.1, giới hạn (mg/kg) của nó có thể được tính theo công thức sau:

$$\frac{ADI \times M}{MDD \times 100}$$

Trong đó:

ADI (mg/kg) là liều có thể đưa vào cơ thể mỗi ngày theo quy định của *Tổ chức Lương thực Thế giới và Tổ chức Y tế thế giới* (Codex Alimentarius, FAO – WHO);

M là thể trọng của người, bằng 60 kg;

MDD là liều dùng dược liệu hàng ngày, tính bằng kg.

Lấy mẫu

Phương pháp:

Bao bì ít hơn 1 kg, trộn đều và lấy đủ lượng mẫu để phân tích. Bao bì từ 1 kg đến 5 kg, lấy những lượng tương đương và đủ để phân tích ở 3 vị trí: phía trên, giữa và cuối bao bì. Trộn đều và lấy lượng mẫu đủ để phân tích. Bao bì lớn hơn 5 kg, lấy không ít hơn 250 g ở 3 vị trí: phía trên, giữa và cuối bao bì, trộn đều và lấy một lượng mẫu đủ để phân tích.

Số mẫu:

Nếu như số bao bì (n) ít hơn hoặc bằng 3, mỗi bao bì lấy một lượng mẫu theo phương pháp nêu trên. Nếu số bao bì lớn hơn 3, số mẫu cần lấy sẽ là $\sqrt{n+1}$, làm tròn số đến đơn vị số nguyên gần nhất.

Mẫu cần được phân tích ngay để tránh hóa chất bảo vệ thực vật có thể bị phân hủy. Nếu như không tiến hành phân tích ngay được, mẫu phải được bảo quản kín trong bao bì loại thích hợp dùng để đựng thực phẩm, ở nhiệt độ dưới 0 °C và tránh ánh sáng.

Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử và dung môi không được nhiễm hóa chất bảo vệ thực vật. Nếu có thể, thường phải sử dụng các dung môi loại chất lượng đặc biệt, nếu không, các dung môi sử dụng cần phải mới được cất lại trong dụng cụ hoàn toàn bằng thủy tinh. Trong bất cứ trường hợp nào, cũng cần phải thực hiện kiểm tra mẫu trắng.

Dụng cụ

Rửa sạch dụng cụ, đặc biệt đối với dụng cụ thủy tinh để đảm bảo chúng sạch không có hóa chất bảo vệ thực vật, ví dụ ngâm trong dung dịch xà phòng không có phosphat ít nhất 16 h, rửa bằng nước cất nhiều lần đến sạch, tráng rửa bằng acetone và hexan hoặc heptan.

Bảng 12.17.1

Hợp chất	Giới hạn (mg/kg)
Alaclar	0,02
Tổng aldrin và dieldrin	0,05
Azinphos-methyl	1,0
Bromopropylat	3,0
Tổng <i>cis</i> -clordan, <i>trans</i> -clordan và oxyclordan	0,05
Clorfenvinphos	0,5
Cypermethrin và các đồng phân	1,0
Tổng <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE và <i>p,p'</i> -TDE	1,0
Deltamethrin	0,5
Diazinon	0,5
Diclorvos	1,0
Dithiocarbamat (tính theo CS ₂)	2,0
Tổng α -endosulfan, β -endosulfan và endosulfan sulfat	3,0
Endrin	0,05
Ethion	2,0
Fenitrothion	0,5
Fenvalerat	1,5
Fonofos	0,05
Tổng heptaclor và heptaclor epoxid	0,05
Hexachlorobenzen	0,1
Các đồng phân hexachlorocyclohexan, trừ đồng phân γ	0,3
Lindan (γ -hexachlorocyclohexan)	0,6
Malathion	1,0
Methidathion	0,2
Parathion	0,5
Parathion-methyl	0,2
Permethrin	1,0
Phosalon	0,1
Piperonyl butoxid	3,0
Pirimiphos-methyl	4,0
Tổng pyrethrin	3,0
Tổng quinozen, pentachloroanalin và methyl pentachlorophenyl sulfid	1,0

Phân tích định tính và định lượng hóa chất bảo vệ thực vật tồn dư

Quy trình phân tích áp dụng phải được kiểm định và chuẩn hóa theo quy chế hiện hành, đặc biệt, nó phải đáp ứng các yêu cầu dưới đây:

- (a) Phương pháp lựa chọn, đặc biệt các bước xử lý làm sạch chất phân tích phải thích hợp đối với chất cần phân tích và không bị ảnh hưởng bởi các chất khác chiết cùng; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được xác định đối với mỗi hóa chất bảo vệ thực vật và dựa trên nền của mẫu phân tích.
- (b) Tỷ lệ thu hồi đối với mỗi hóa chất bảo vệ thực vật phải nằm trong khoảng 70 % đến 110 %.
- (c) Độ lặp lại của phương pháp không được thấp hơn các giá trị ghi trong Bảng 12.17.2.
- (d) Độ tái lập của phương pháp không được thấp hơn các giá trị ghi trong Bảng 12.17.2.
- (e) Nồng độ của các dung dịch thử, dung dịch đối chiếu và các thông số phân tích cài đặt trên máy phải tương ứng với đáp ứng tuyến tính của detector phân tích.

Bảng 12.17.2

Nồng độ chất phân tích (mg/kg)	Độ lặp lại RSD (%)	Độ tái lập (%)
0,001 - 0,010	30	60
> 0,010 - 0,100	20	60
> 0,100 - 1,000	15	30
> 1,000	10	20

Ghi chú:

Độ lặp lại (Repeatability): Độ chụm trong điều kiện các kết quả thử nghiệm độc lập với cùng một phương pháp, trên những mẫu giống hệt nhau, trong cùng phòng thí nghiệm, bởi cùng người thao tác, sử dụng cùng một thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn.
Độ tái lập (Reproducibility): Độ chụm trong điều kiện các kết quả thử nghiệm nhận được bởi cùng một phương pháp, trên các mẫu thử giống hệt nhau trong các phòng thí nghiệm khác nhau, với những người thao tác khác nhau, sử dụng thiết bị khác nhau.

Phương pháp phân tích dưới đây nhằm cung cấp thông tin để tham khảo

Xác định dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật nhóm clor hữu cơ, nhóm phosphor hữu cơ và nhóm pyrethroid

Phương pháp dưới đây có thể được sử dụng. Tùy theo chất cần phân tích, nếu cần thiết có thể thay đổi quy trình phân tích mô tả dưới đây. Trong mọi trường hợp, đều có thể sử dụng bổ sung một loại cột khác có độ phân cực khác hoặc phương pháp phát hiện khác (ví dụ detector khối phổ) hoặc phương pháp phân tích khác (ví dụ phương pháp hóa miễn dịch) để khẳng định kết quả thu được.

1. Chiết

Thêm 100 ml acetone (TT) vào 10 g mẫu thử đã được làm thành bột thô và để yên 20 min. Thêm 1 ml dung dịch có chứa carbophenothion 1,8 μ g/ml trong toluen (TT). Làm đồng nhất trong 3 min, sử dụng máy khuấy trộn tốc độ cao. Lọc và rửa cốc hai lần, mỗi lần với 25 ml acetone (TT).

Gộp dịch chiết và dịch rửa, làm bay hơi dung môi ở nhiệt độ không quá 40 °C trong máy cất quay cho tới khi dung môi bị loại hầu như hoàn toàn. Thêm vào cần vài mililit *toluen* (TT), tiếp tục làm bay hơi đến khi dung môi bị loại bỏ hầu như hoàn toàn. Hòa tan cần trong 8 ml *toluen* (TT). Lọc qua màng lọc 45 µm, rửa bình, dụng cụ lọc và làm vừa đủ 10 ml bằng *toluen* (TT) (dung dịch A).

2. Làm sạch

2.1. Hòa chất bảo vệ thực vật nhóm clor hữu cơ, nhóm phosphor hữu cơ và nhóm pyrethroid

Tiến hành phương pháp sắc ký rây phân tử (Phụ lục 5.5).

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (0,30 m × 7,8 mm), pha tĩnh *copolymer styren - divinylbenzen* (5 µm) (TT), sử dụng *toluen* (TT) làm pha động với tốc độ dòng 1 ml/min.

Hiệu năng của cột: Tiêm 100 µl dung dịch có chứa *đo methyl* 0,05 % (TT) và *oracet lam 2 R* 0,05 % (TT) trong *toluen* (TT) vào hệ thống sắc ký. Cột chỉ thích hợp khi màu của dịch rửa giải thay đổi từ màu cam sang màu xanh da trời ở thể tích rửa giải 10,3 ml. Nếu cần chuẩn hóa cột, có thể sử dụng dung dịch pha trong *toluen* có chứa chất phân tích ở nồng độ thích hợp là chất có phân tử lượng thấp nhất (ví dụ diclorvos) và chất có phân tử lượng cao nhất (ví dụ deltamethrin). Xác định đoạn dung môi rửa giải có chứa cả hai chất.

Làm sạch dung dịch thử: Tiêm một thể tích xác định dung dịch A (100 µl đến 500 µl) vào hệ thống và tiến hành chạy sắc ký. Thu đoạn dung môi rửa giải đã xác định ở trên (dung dịch B). Các chất nhóm phosphor hữu cơ thường được rửa giải ở đoạn từ 8,8 ml đến 10,9 ml. Các chất nhóm clor hữu cơ và nhóm pyrethroid thường được rửa giải ở đoạn 8,5 ml đến 10,3 ml.

2.2. Hòa chất bảo vệ thực vật nhóm clor hữu cơ và nhóm pyrethroid

Cho một ít bông không có chất béo vào cột sắc ký (0,10 m × 5 mm), sau đó cho 0,5 g *silica gel* đã được xử lý vào cột. Xử lý *silica gel* như sau: Sấy *silica gel* dùng cho sắc ký trong tủ sấy ở 150 °C trong 4 h. Để nguội và thêm vào đó từng giọt một lượng nước tương ứng với 1,5 % khối lượng *silica gel* đem sấy. Lắc mạnh cho đến khi không còn các cục vón, tiếp tục lắc trên máy lắc cơ học trong 2 h. Lọc cột bằng 1,5 ml *hexan* (TT). Cột loại nhồi sẵn có chứa 500 mg *silica gel* loại thích hợp có thể được sử dụng, miễn là loại cột này đã được kiểm tra và chuẩn hóa trước.

Đuổi dung môi trong dung dịch B dưới luồng khí *heli* (TT) hoặc khí *nitrogen không có oxy* (TT) tới khi dung môi hầu như bị loại hoàn toàn, hòa tan cần trong một thể tích *toluen* (TT) thích hợp (từ 200 µl đến 1 ml tùy theo thể tích dung dịch A đã tiêm ở giai đoạn thực hiện sắc ký rây phân tử). Chuyển toàn bộ dung dịch lên cột và tiến hành sắc ký, sử dụng 1,8 ml *toluen* (TT) làm pha động. Thu hồi dịch rửa giải (dung dịch C).

3. Định lượng

3.1. Hòa chất bảo vệ thực vật nhóm phosphor hữu cơ

Tiến hành phân tích sắc ký khí (Phụ lục 5.2), sử dụng *carbophenothion* (TT) làm chuẩn nội. Nếu cần thiết, có thể sử dụng một chất chuẩn nội thứ hai để phân biệt khi có ảnh hưởng với pic của *carbophenothion*.

Dung dịch thử: Làm bay hơi dung dịch B dưới luồng khí *heli* (TT) gần tới khô hoàn toàn và hòa tan cần trong 100 µl *toluen* (TT).

Dung dịch đối chiếu: Pha ít nhất 3 dung dịch có chứa các hóa chất bảo vệ thực vật cần xác định và *carbophenothion* ở nồng độ thích hợp để thiết lập đường chuẩn.

Điều kiện sắc ký:

Cột: Cột silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) phủ lớp pha tĩnh *poly(dimethyl)siloxan* (TT) dày 0,25 µm.

Khí mang *hydrogen* (TT), các khí mang khác như *heli* (TT) hoặc *nitrogen* (TT) cũng có thể sử dụng được, miễn là hệ thống sắc ký được chuẩn hóa một cách phù hợp.

Detector ion hóa ngọn lửa phosphor - nitrogen hoặc detector quang kế ngọn lửa.

Chương trình nhiệt độ buồng cột: Duy trì nhiệt độ 80 °C trong 1 min, tăng 30 °C/min tới 150 °C, duy trì trong 3 min, tăng 4 °C/min tới 280 °C và duy trì trong 1 min. Nhiệt độ cổng tiêm 250 °C, nhiệt độ detector 275 °C.

Thể tích tiêm: Tiêm một thể tích xác định các dung dịch. Sắc ký đồ thu được với điều kiện mô tả trên sẽ cho kết quả thời gian lưu tương đối xấp xỉ các giá trị liệt kê ở Bảng 12.17.3. Tính kết quả dựa vào diện tích pic và nồng độ của các dung dịch.

3.2. Hòa chất bảo vệ thực vật nhóm clor hữu cơ và pyrethroid

Tiến hành phân tích sắc ký khí (Phụ lục 5.2), sử dụng *carbophenothion* (TT) làm chuẩn nội. Nếu cần thiết, có thể sử dụng một chất chuẩn nội thứ hai để phân biệt khi có ảnh hưởng với pic của *carbophenothion*.

Dung dịch thử: Làm bay hơi dung dịch C dưới luồng khí *heli* (TT) hoặc khí *nitrogen không có oxy* (TT) gần tới khô hoàn toàn và hòa tan cần trong 500 µl *toluen* (TT).

Dung dịch đối chiếu: Pha ít nhất 3 dung dịch có chứa các hóa chất bảo vệ thực vật cần xác định và *carbophenothion* ở nồng độ thích hợp để thiết lập đường chuẩn.

Điều kiện sắc ký:

Cột silica nung chảy (30 m × 0,32 mm) phủ lớp pha tĩnh *poly(dimethyl)(diphenyl)siloxan* (TT) dày 0,25 µm.

Khí mang *hydrogen* (TT), các khí mang khác như *heli* (TT) hoặc *nitrogen* (TT) cũng có thể sử dụng được miễn là hệ thống sắc ký được chuẩn hóa một cách phù hợp.

Detector cộng kết điện tử.

Chương trình nhiệt độ buồng cột: Duy trì nhiệt độ 80 °C trong 1 min, tăng 30 °C/min tới 150 °C, duy trì trong 3 min, tăng 4 °C/min tới 280 °C và duy trì trong 1 min. Nhiệt độ cổng tiêm 250 °C, nhiệt độ detector 275 °C.

Thể tích tiêm: Tiêm một thể tích xác định các dung dịch. Sắc ký đồ thu được với điều kiện mô tả trên sẽ cho kết quả thời gian lưu tương đối xấp xỉ các giá trị liệt kê ở Bảng 12.17.4.

Tính kết quả dựa vào diện tích pic và nồng độ các dung dịch.

Bảng 12.17.3

STT	Hợp chất	Thời gian lưu tương đối
1	Diclorvos	0,20
2	Fonofos	0,50
3	Diazinon	0,52
4	Parathion-methyl	0,59
5	Clorpyrifos-methyl	0,60
6	Pirimiphos-methyl	0,66
7	Malathion	0,67
8	Parathion	0,69
9	Clorpyrifos	0,70
10	Methidathion	0,78
11	Ethion	0,96
12	Carbophenothion	1,00
13	Azinphos-methyl	1,17
14	Phosalon	1,18

Bảng 12.17.4

STT	Hợp chất	Thời gian lưu tương đối
1	α -Hexaclorocyclohexan	0,44
2	Hexaclorbenzen	0,45
3	β -Hexaclorocyclohexan	0,49
4	Lindan	0,49
5	δ -Hexaclorocyclohexan	0,54
6	ϵ -Hexaclorocyclohexan	0,56
7	Heptaclor	0,61
8	Aldrin	0,68
9	cis-Heptaclor epoxid	0,76
10	<i>o,p'</i> -DDE	0,81
11	α -Endosulfan	0,82
12	Dieldrin	0,87
13	<i>p,p'</i> -DDE	0,87
14	<i>o,p'</i> -DDD	0,89
15	Endrin	0,91
16	β - Endosulfan	0,92
17	<i>o,p'</i> -DDT	0,95
18	Carbophenothion	1,00
19	<i>p,p'</i> -DDT	1,02
20	cis-Permethrin	1,29
21	trans-Permethrin	1,31
22	Cypermethrin	1,40
23	Fenvalerat	1,47; 1,49
24	Deltamethrin	1,54

12.18 ĐỊNH TÍNH DUỐC LIỆU VÀ CÁC CHẾ PHẨM BẢNG KÍNH HIỂN VI

Định tính bằng kính hiển vi là phương pháp sử dụng kính hiển vi để nhận biết các đặc điểm của các mô, tế bào hoặc các chất chứa trong tế bào, ở các lát cắt, bột, các mô đã được làm rã ra, hoặc các tiêu bản bề mặt của duốc liệu và các chế phẩm. Việc chọn mẫu đại diện để định tính và sự chuẩn bị tiêu bản phải phù hợp với những yêu cầu về định tính của mỗi loại mẫu cần kiểm tra. Các tiêu bản của các chế phẩm được chuẩn bị sau những xử lý thích hợp tùy theo các dạng chế phẩm khác nhau.

Tiêu bản duốc liệu

Lát cắt ngang hoặc dọc

Chọn lấy một mẫu duốc liệu thích hợp sao cho có đủ các đặc điểm thực vật như sau:

Thân và rễ nhỏ: Lấy một đoạn có đủ mặt cắt ngang.

Thân, rễ to và rễ củ: Lấy một phần có mặt cắt ngang hình quạt (có cấu tạo từ biểu bì đến tâm).

Vỏ thân: Lấy một phần cắt ngang hình chữ nhật (có cấu tạo từ bản đến tầng phát sinh libe-gỗ).

Lá: Lấy một đoạn gân giữa có dính mỗi bên một ít phiến lá.

Hoa: Bóc biểu bì hay cắt ngang từng bộ phận.

Quả và hạt nhỏ: Lấy nguyên cả quả và hạt.

Quả và hạt to: Lấy một phần, chọn vị trí cắt có đủ các đặc điểm.

Dùng lưỡi dao cạo, ống cắt vi phẫu cầm tay hay máy cắt vi phẫu cắt mẫu duốc liệu thành từng lát mỏng 10 μ m đến 20 μ m. Cũng có thể kẹp mẫu trong parafin rắn, củ khoai lang, củ đậu v.v... để cắt. Trừ chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, lát cắt có thể được soi ngay hoặc phải qua các bước xử lý sau đây trước khi đem soi kính:

Ngâm các lát cắt vào dung dịch cloramin T 5 % (TT) đến khi lát cắt trắng ra thì rửa sạch cloramin bằng nước.

Ngâm lát cắt vào thuốc thử cloral hydrat (TT) khoảng 10 min rồi rửa sạch bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong dung dịch acid acetic 1 % (TT) trong khoảng 2 min rồi rửa thật kỹ lại bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong dung dịch lục iod (TT) hoặc xanh methylen (TT) trong khoảng từ 1 s đến 5 s, rửa nhanh bằng ethanol 60 % (TT) rồi rửa lại bằng nước cất.

Ngâm lát cắt trong dung dịch carmin 40 (TT) tới khi thấy màu bắt rõ thì rửa bằng nước cất.

Tiêu bản bột

Lấy một lượng nhỏ bột (qua rây số 250), cho vào một giọt dung dịch soi (như nước, glycerin, cloral hydrat hay thuốc thử khác tùy thuộc vào mục đích soi) đã có sẵn trên lam kính, dùng kim mũi mác dàn đều cho bột thấm dung dịch, đặt lam kính, di nhẹ lam kính rồi quan sát dưới kính.

Tiêu bản bề mặt

Làm âm và làm mềm mẫu (nếu cần thiết), cắt lấy 2 mẫu nhỏ khoảng 4 mm² (một mẫu để soi và một mẫu để đối chiếu) hoặc trực tiếp lấy một đoạn biểu bì, đặt lên một lam kính, thêm thuốc thử thích hợp rồi soi kính.

Tiêu bản mô đã làm sẵn

Nếu mẫu thử là mô mềm hoặc chỉ có ít, lẻ tẻ các mô gỗ thì có thể dùng phương pháp kali hydroxyd. Nếu mẫu thử cứng, có nhiều mô gỗ hoặc các mô gỗ tụ lại thành bó lớn thì dùng phương pháp acid cromic-nitric hay phương pháp kali clorat. Mẫu thử cần được cắt thành các đoạn dài 5 mm, đường kính 2 mm hoặc những mẫu nhỏ dày khoảng 1 mm trước khi làm sẵn.

a. Phương pháp kali hydroxyd: Cho mẫu thử vào một ống nghiệm, thêm dung dịch kali hydroxyd 5 % (TT) vừa đủ, đun nóng nhẹ (hoặc ngâm nóng trong cách thủy) đến khi ép bằng đũa thủy tinh thì mẫu bị vỡ ra. Gạn bỏ dung dịch kiềm, rửa sạch mẫu bằng nước rồi đặt mẫu lên lam kính. Dùng kim phẫu thuật xé mẫu ra rồi quan sát trong glycerin (TT).

b. Phương pháp acid cromic-nitric: Cho mẫu thử vào một ống nghiệm, thêm vừa đủ thuốc thử acid cromic-nitric (TT), ngâm đến khi ép bằng đũa thủy tinh thì mẫu bị vỡ ra. Gạn bỏ dung dịch acid, rửa bằng nước rồi làm tiếp như phương pháp a.

c. Phương pháp kali clorat: Cho mẫu thử vào trong ống nghiệm, thêm dung dịch acid nitric 50 % (TT) và một ít bột kali clorat (TT), đun nóng đến khi giảm sủi bọt. Thêm một lượng nhỏ kali clorat đúng lúc để duy trì sủi bọt nhẹ cho đến khi mẫu bị vỡ ra khi ép bằng đũa thủy tinh. Gạn bỏ dung dịch acid, rửa sạch mẫu bằng nước rồi làm tiếp như phương pháp a.

Tiêu bản phân hoa và bào tử

Nghiền phân hoa, bao phấn, hoa nhỏ hoặc túi bào tử (được làm mềm trong acid acetic băng (TT) bằng đũa thủy tinh và lọc vào một ống ly tâm, ly tâm rồi bỏ phần nước. Thêm vào cần 1 ml đến 3 ml hỗn hợp mới pha của anhydrid acetic - acid sulfuric (9 : 1), đun nóng 2 min đến 3 min trên cách thủy, ly tâm. Rửa cần bằng nước 2 lần, thêm 3 giọt đến 4 giọt dung dịch glycerin 50 % (TT) và dung dịch phenol 1 % (TT), làm tiêu bản trong fuchsin - glycerin - gelatin và soi. Có thể dùng cloral hydrat (TT) thay cho fuchsin - glycerin - gelatin để soi.

Tiêu bản của chế phẩm đông được bao gồm cả thuốc bột

Để định tính các chế phẩm đông được bao gồm cả thuốc bột, chuẩn bị tiêu bản như đã mô tả ở mục "Tiêu bản bột" ở phần trên. Lượng mẫu lấy như dưới đây được nghiền thành bột và lấy một lượng bột thích hợp, thêm từng giọt thuốc thử theo yêu cầu, khuấy kỹ để làm tách rời các tế bào hay tổ chức bị dính.

Thuốc bột hoặc bột của viên nang: Lấy một lượng bột thích hợp, nghiền nhỏ.

Viên nén: Lấy 2 đến 3 viên.

Hoàn hồ-nước, hoàn hồ, hoàn mật ong (loại bỏ lớp vỏ bao): Lấy vài viên.

Thuốc ngâm: Lấy 1 đến 2 viên.

Với hoàn mật ong có thể cắt thành lát mỏng và lấy một lượng mẫu thích hợp hoặc lấy một lượng cần nhỏ sau khi loại bỏ mật ong và nước để làm tiêu bản.

Đo tế bào và các thành phần của tế bào

Để đo kích thước tế bào và các thành phần của tế bào dưới kính hiển vi, có thể dùng trắc vi thị kính. Trước hết, lắp trắc vi thị kính vào thị kính, sau đó định cỡ bằng bản soi trắc vi kẻ. Để định cỡ, xoay thị kính và di chuyển bản soi để cho các vạch trên 2 thang chia độ song song với những vạch khác ở bên phải. Giá trị (μm) của một vạch trắc vi thị kính có thể được tính toán trên cơ sở những vạch chia của 2 thang chia độ giữa những dòng trùng nhau. Để đo mẫu, đem nhân số vạch đo được của trắc vi thị kính với giá trị (μm) của mỗi vạch. Nói chung, phép đo được thực hiện dưới một vật kính có độ phóng đại lớn, tuy nhiên, để đo những kích thước lớn hơn của sợi, lông v.v... thì nên dùng vật kính có độ phóng đại nhỏ. Ghi lại các giá trị cực đại và cực tiểu (μm). Cho phép có một vài giá trị cao hơn hay thấp hơn chút ít so với yêu cầu quy định trong chuyên luận dược điển.

Phát hiện màng tế bào

Màng tế bào hóa gỗ: Thêm 1 giọt đến 2 giọt thuốc thử phloroglucinol (TT), để yên một lúc, thêm 1 giọt acid hydrocloric (TT), vùng hóa gỗ xuất hiện màu đỏ tía.

Màng tế bào hóa bản hay hóa cutin: Thêm thuốc thử Sudan III (TT), để yên một lúc hay làm ấm nhẹ, xuất hiện màu đỏ cam hay màu đỏ.

Màng cellulose: Thêm thuốc thử kẽm clorid-iod, hoặc lúc đầu thêm dung dịch iod 1 % (TT) để làm ẩm, để yên 1 min rồi thêm dung dịch acid sulfuric [33 ml acid sulfuric (TT) pha với nước cất vừa đủ 50 ml], sẽ xuất hiện màu xanh lam hay xanh tím.

Màng tế bào silic: Không có sự thay đổi gì khi thêm acid sulfuric (TT).

Phát hiện các thành phần của tế bào

Tinh bột: Thêm dung dịch iod (TT), sẽ xuất hiện màu xanh lam hay xanh tím.

Đặt mẫu trong dung dịch glycerin-acid acetic, quan sát dưới kính hiển vi phân cực thấy hiện tượng phân cực chéo của các hạt tinh bột, hiện tượng này mất đi ở những hạt tinh bột bị hóa hồ.

Hạt aleuron: Thêm dung dịch iod (TT), sẽ xuất hiện màu nâu hay màu vàng nâu.

Thêm dung dịch thủy ngân (II) nitrat (TT), xuất hiện màu đỏ gạch. Nếu dược liệu có dầu béo, phải loại dầu béo bằng ether (TT) hay ether dầu hỏa (TT) trước khi thử.

Dầu béo, tinh dầu hay nhựa:

Thêm dung dịch Sudan III (TT), sẽ xuất hiện màu đỏ da cam, màu đỏ hoặc đỏ tía.

Trong ethanol 90 % (TT), dầu béo không hòa tan (trừ dầu thầu dầu và dầu bông), trong khi đó tinh dầu thì hòa tan được.

Inulin: Thêm dung dịch 1-naphthol 10 % trong ethanol (TT), sau đó thêm acid sulfuric (TT), các tinh thể inulin chuyển sang màu đỏ tía và hòa tan nhanh.

Tinh thể calci oxalat:

Không hòa tan trong *dung dịch acid acetic loãng (TT)*, tan trong *dung dịch acid hydrochloric loãng (TT)*, không sủi bọt.

Hòa tan chậm trong *dung dịch acid sulfuric 50 % (TT)*, nhưng sau khi để yên một lúc thì tách ra những tinh thể calci sulfat.

Calci carbonat: Hòa tan trong *dung dịch acid hydrochloric loãng (TT)* và có sủi bọt.

Silic: Không hòa tan trong *acid sulfuric (TT)*.

Các thuốc thử dùng cho phân tích vi thể

Dung dịch sắt (III) clorid: Hòa tan 1 g *sắt (III) clorid (TT)* trong nước và thêm nước vừa đủ 100 ml.

Thuốc thử cloral hydrat: Hòa tan 50 g *cloral hydrat (TT)* trong 15 ml *nước* và 10 ml *glycerin (TT)*.

Dung dịch glycerin - acid acetic: Hòa lẫn các thể tích bằng nhau của *glycerin (TT)*, *acid acetic băng (TT)* và *nước*.

Dung dịch Sudan III: Hòa tan 0,01 g *Sudan III (TT)* trong 5 ml *ethanol 90 % (TT)*, thêm 5 ml *glycerin (TT)*, lắc kỹ. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu và sử dụng trong thời gian 2 tháng.

Dung dịch đỏ rutheni: Cho một lượng vừa đủ *đỏ rutheni (TT)* vào 1 ml đến 2 ml *dung dịch natri acetat 10 % (TT)* để tạo thành màu đỏ vang. Dung dịch chỉ pha khi dùng.

Dung dịch phloroglucinol: Hòa tan 1 g *phloroglucinol (TT)* trong 100 ml *ethanol 90 % (TT)*, lọc. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu, tránh ánh nắng.

Thuốc thử acid cromic - nitric:

Hòa tan 10 ml *acid nitric (TT)* trong 100 ml *nước*.

Hòa tan 10 g *acid cromic (TT)* trong 100 ml *nước*. Trộn lẫn các thể tích bằng nhau của 2 dung dịch trên trước khi dùng.

Fuchsin-glycerin-gelatin: Lấy 1,0 g *gelatin (TT)*, thêm 6 ml *múc*, ngâm. Thêm 7 ml *glycerin (TT)*, đun nóng và khuấy nhẹ để được hỗn hợp đồng nhất. Lọc qua gạc vào một hộp lồng, thêm một lượng vừa đủ *fuchsin base* [lấy 0,1 g *fuchsin base (TT)*, thêm 600 ml *ethanol (TT)* và 80 ml *dầu long não* để hòa tan], trộn đều và để cho rắn lại.

Dung dịch I - naphthol: Lấy 10,5 ml *dung dịch I - naphthol 15 % trong ethanol (TT)*, thêm chậm 6,5 ml *acid sulfuric (TT)*, trộn đều, thêm 40,5 ml *ethanol (TT)* và 4 ml *nước*. Trộn đều.

Dung dịch thủy ngân (II) nitrat: Lấy 4,5 g *thủy ngân (TT)*, thêm 3 ml *acid nitric bốc khói (TT)*, trộn đều. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu, tránh ánh sáng.

Dung dịch kẽm clorid - iod: Lấy 8 g *kali iodid (TT)*, thêm 8,5 ml *nước* để hòa tan. Sau đó thêm 2,5 g *kẽm clorid khan (TT)*, hòa tan rồi thêm *iod (TT)* cho đến bão hòa. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu nâu có nút mài.

Dung dịch lục iod: Hòa tan 0,3 g *lục iod (TT)* trong 100 ml *nước*, thêm 10 ml *ethanol 90 % (TT)*, trộn đều.

Dung dịch carmin 40: Hòa tan 1 g *carmin 40 (TT)*, 5 g *kali sulfat (TT)* và 0,5 g *phenol (TT)* trong 100 ml *nước*.

12.19 XÁC ĐỊNH CHỈ SỐ TRƯỞNG NỖ

Chỉ số trương nở là thể tích (ml) chiếm giữ của 1 g dược liệu, sau khi để trương nở trong nước hoặc một dung môi khác theo quy định trong 4 h, gồm tất cả các chất nhầy bám dính.

Cân chính xác khoảng 1 g dược liệu, để nguyên hoặc nghiền nhỏ ở mức độ thích hợp theo chỉ dẫn trong chuyên luận, cho vào 1 ống nghiệm thủy tinh 25 ml có nút mài, chiều cao 120 mm đến 130 mm và chia độ 0,5 ml. Trừ những chỉ dẫn khác, làm ẩm dược liệu với 1,0 ml *ethanol 96 % (TT)*, thêm 25 ml *nước* và đập nút. Lắc kỹ 10 min một lần trong 1 h đầu, sau đó để yên 3 h. Sau khi bắt đầu thử nghiệm 1,5 h, loại bỏ những thể tích tự do của phần chất lỏng còn lại trong lớp dược liệu và những phần dược liệu nổi lên bề mặt của chất lỏng bằng cách quay ống nghiệm theo trục thẳng đứng.

Đo thể tích chiếm giữ của dược liệu bao gồm toàn bộ các chất nhầy bám dính. Mỗi mẫu tiến hành 3 lần thử nghiệm. Tính chỉ số trương nở từ kết quả trung bình của 3 lần thử nghiệm.

12.20 PHƯƠNG PHÁP CHẾ BIẾN ĐÔNG DƯỢC

Trong đông y, các vị thuốc được dùng để uống thường qua khâu chế biến như sau:

Sơ chế (Chế biến sơ bộ): Nhằm loại bỏ các bộ phận không dùng làm thuốc (Rễ con, lõi, gốc, hạch...) hoặc để ổn định dược liệu ngay từ đầu (phơi, sấy, xông diêm sinh...). Như vậy qua sơ chế, ta có nguyên liệu ban đầu được gọi là "thuốc sống", tuy nhiên phải đáp ứng được các yêu cầu nhất định về chất lượng đã đề ra.

Phức chế (Chế biến hoàn chỉnh): Quá trình chế biến phức tạp hơn, nhằm giảm bớt độc tính, tác dụng không mong muốn hoặc thay đổi tính năng, tăng sự quy kinh thuốc, nhiều khi còn ảnh hưởng đến cấu trúc của hoạt chất và tác dụng của vị thuốc đem chế. Như vậy qua phức chế ta thu được nguyên liệu mang ý nghĩa được dụng và gọi là "thuốc chín", đáp ứng được các yêu cầu trong điều trị.

Phương pháp dùng nước

Rửa: Nhằm làm sạch dược liệu, loại bỏ tạp chất hoặc có thể để khử mùi hôi tanh của một số dược liệu (dùng nước sắc của một số dược liệu có tinh dầu). Nước dùng để rửa phải đạt tiêu chuẩn nước sạch, thời gian rửa phụ thuộc vào tính chất của các dược liệu. Dược liệu có cấu tạo mỏng manh hoặc có thành phần dễ tan trong nước, hoặc có các chất nhầy cần rửa nhanh. Dược liệu có cấu trúc rắn chắc, có mùi vị khó chịu có thể rửa kỹ. Các dược liệu dễ bị nát thì không rửa.

Ngâm: Nhằm làm mềm dược liệu, giúp cho việc bào thái dễ dàng. Ngâm để loại muối bám vào dược liệu. Ngâm để giảm tính độc, ngâm để loại nhớt, ngứa. Nước để ngâm phải đạt tiêu chuẩn nước sạch, hoặc các dung dịch muối vô cơ như: Natri clorid, magesi clorid, natri sulfat, calci

hydroxyd, magnesi sulfat, phèn chua; hoặc nước sắc được liệu như: Nước bồ kết, nước cam thảo, nước gạo, nước gừng... Thời gian ngâm phụ thuộc vào bản chất, kích thước được liệu và nhiệt độ của mùa, mùa hè ngâm nhanh hơn mùa đông. Dụng cụ để ngâm được liệu là thạp sành, bể xi măng, chậu nhựa, thùng nhựa, không dùng các dụng cụ bằng kim loại như tôn, sắt... Quá trình ngâm phải thường xuyên khuấy đảo và thay nước nhiều lần.

Tắm: Đem một phụ liệu nào đó tắm vào được liệu, rồi phơi khô hoặc phơi âm can đến khô.

Ủ: Nhằm làm mềm, giúp cho việc bào thái dễ dàng; để tạo dáng ngay sau thu hái; để tạo điều kiện lên men cho một số được liệu khi chế biến, ủ để làm thơm được liệu, ủ để phụ liệu chế ngâm vào được liệu. Thời gian ủ phụ thuộc vào mục đích đối với từng loại được liệu, nói chung nằm trong khoảng 30 min đến 2 h hoặc lâu hơn (12 h đến 24 h). Trong quá trình ủ, có thể dùng vải sạch hoặc bao tải sạch thấm ẩm đặt lên mặt dụng cụ đựng thuốc.

Thủy phi: Là phương pháp tán, nghiền được liệu trong nước với mục đích thu được bột mịn, tránh nhiệt tạo ra khi tán làm hỏng thuốc, tránh làm được liệu bị phân hủy, sinh chất độc khi nghiền tán trực tiếp. Cho được liệu vào dụng cụ tán là sành, sứ..., không dùng dụng cụ bằng kim loại như sắt, đồng, tôn..., đổ nước ngập được liệu, thường lượng nước gấp 10 lần lượng thuốc. Sau khi tán kỹ, hớt bỏ bụi rác bên trên, gạn lấy lớp nước bột huyền phù sang một dụng cụ khác, phần còn lại tiếp tục làm như thế nhiều lần. Gộp tất cả nước bột, để lắng, gạn bỏ lớp nước, lấy cặn đem phơi âm can hoặc sấy nhẹ đến khô. Được liệu thường chế theo cách này như Thần sa, Chu sa, Thạch quyết minh...

Phương pháp dùng lửa (Hỏa chế)

Phương pháp sao

Được liệu đem sao cần có sự phân chia đến kích thước thích hợp. Nếu là thuốc phiến thường có kích thước dài 3 cm đến 5 cm, dày 1 mm đến 3 mm, đồng thời phân ra to nhỏ khác nhau để khi sao đạt được sự đồng đều của thuốc và tránh cháy.

Sao không qua chất trung gian, không cho thêm phụ liệu (Thanh sao)

Vĩ sao: Nhằm diệt men, mốc hoặc làm khô và dậy mùi thơm đối với được liệu có cấu tạo mỏng manh (hoa, lá...), hoặc được liệu chứa các chất thơm, tinh dầu... Nhiệt độ sao nằm trong khoảng 50 °C đến 80 °C, sau khi làm nóng chảo, cho được liệu vào, đảo đều đến khô hoặc có mùi thơm.

Sao vàng: Nhằm giảm bớt tính hàn, làm cho thuốc trở lên thơm, làm tăng quy kinh tỷ. Sau khi làm nóng chảo, cho được liệu vào đảo đều, đến khi mặt ngoài của được liệu chuyển màu vàng, nhiệt độ sao khoảng 100 °C đến 150 °C.

Sao vàng hạ thổ: Nhằm giảm bớt tính hàn của thuốc, đồng thời giảm bớt "hỏa độc" của thuốc, mặt khác làm giảm mùi khó chịu của thuốc. Sau khi sao thuốc tới vàng, nhân lúc còn nóng lấy ra đổ úp thuốc xuống nền đất đã quét sạch.

đôi khi còn đào một hố sâu 10 cm, rộng 30 cm. Dụng cụ sao úp trên thuốc. Thời gian hạ thổ thường từ 10 min đến 15 min.

Sao vàng xém cạnh: Nhằm khử các mùi vị khó chịu của thuốc, tăng tác dụng tiêu thực của vị thuốc. Sau khi nóng chảo, cho được liệu vào, đảo đều cho đến khi mặt ngoài xém cạnh là vừa, màu ruột thuốc vẫn giữ nguyên. Nhiệt độ sao vào khoảng 170 °C đến 200 °C. Thường tiến hành với các vị thuốc chua, chất hoặc tanh lợm như Bình lang, Thần khúc, Hòe giác....

Sao tồn tính (hắc sao): Nhằm tăng tác dụng tiêu thực, chỉ huyết của vị thuốc hoặc làm thay đổi tính năng của thuốc. Sau khi chảo nóng già, cho thuốc vào, đảo đều cho đến khi toàn bộ mặt ngoài bị đen đi, khi bỏ ra bên trong vẫn còn màu vàng. Nhiệt độ sao khoảng 200 °C.

Sao cháy (thán sao): Nhằm tăng tác dụng chỉ huyết của vị thuốc. Sau khi chảo nóng già, cho thuốc vào, đảo đều đến khi toàn bộ mặt ngoài của thuốc cháy đen (có mùi cháy) bên trong có màu nâu. So với sao tồn tính thì mức độ cháy cao hơn. Nhiệt độ sao khoảng 200 °C đến 240 °C. Kể cả sao tồn tính và sao cháy, trước khi đổ thuốc ra thường phun vào một ít nước lạnh để trừ hỏa độc.

Tắm sao (Chích)

Sau khi tắm với phụ liệu (nước sắc gừng, giấm...) rồi đem sao, nhằm tăng sự qui kinh, tăng tác dụng của vị thuốc.

Tắm rượu sao: Dùng sức nóng, tính thăng đề của rượu để dẫn thuốc lên thượng tiêu (tác dụng thăng đề), để giảm bớt tính lạnh của vị thuốc, giảm bớt mùi vị khó chịu, tăng cường bổ can thận cho vị thuốc. Dùng rượu trắng được làm từ gạo, ngô, sắn... có hàm lượng ethanol 35 % đến 40 %, với lượng 10 % đến 15 % (tt/kl). Sau khi tắm, ủ thuốc 30 min đến 1 h, đem sao ở nhiệt độ sao vàng, khi có mùi thơm của rượu bốc lên là được.

Tắm dấm sao (Thổ chế): Nhằm tăng dẫn thuốc vào kinh can đờm, tăng cường tác dụng giảm đau, tiêu ứ huyết, giảm bớt mùi tanh của vị thuốc, làm xốp giòn vị thuốc giúp cho việc dễ tán, dễ chiết xuất. Tắm được liệu với 10 % đến 15 % dấm ăn (tt/kl), ủ 30 min đến 2 h, rồi sao vàng.

Tắm nước muối sao (Điêm chế): Nhằm dẫn thuốc vào kinh thận và hạ tiêu. Tắm được liệu với 10 % đến 15 % dịch dịch muối ăn 5 % (tt/kl). Sau khi tắm đều, ủ 30 min đến 1 h, rồi sao vàng.

Tắm mật sao (Mật chế): Dùng mật ong để chế thuốc. Nhằm tăng tác dụng dẫn thuốc vào kinh tỷ, tăng tác dụng bổ khí, nhuận phế và tăng tác dụng hoãn giải. Thường dùng mật ong dưới dạng mật luyện (mật ong đun sôi, lọc bỏ tạp, sếp... có đến thể tích nhất định), thêm lượng mật được qui định trong tung chuyên luận vào được liệu, thêm nước sạch (bằng khoảng 30 % lượng mật). Tắm đều vào được liệu, ủ 1 h đến 6 h. Tiến hành sao nhỏ lửa, cho đến khi sờ không dính tay; được liệu có màu vàng, mùi thơm mật, vị ngọt. Cũng có thể sao được liệu tới khi bên ngoài có màu vàng, cho mật vào, đảo đều, tới khi không dính tay.

Tắm nước gừng sao (Khương chế): Nhằm giảm bớt tính hàn, tăng sức phát tán, tăng khả năng tiêu thực, ôn trung. Tắm được liệu với 10 % đến 15 % dịch nước gừng tươi (tt/kl). Ủ

30 min đến 1 h, đem sao vàng. Gừng già tươi 100 g, rửa sạch, già nhỏ, thêm nước sạch, vắt lấy dịch đủ 100 ml.

Tẩm hoàng thổ sao: Nhằm tăng tác dụng quy tỳ vị, giảm bớt tính hao của thuốc. Lấy hoàng thổ (đất sét vàng), đất lòng bếp (Phục long can) hoặc đất lòng lò gạch, nghiền mịn, cứ 100 g đất thêm 1 L nước đun sôi, khuấy đều, gạn bỏ lớp trên, bỏ cặn, lấy lớp giữa. Cứ 1 kg dược liệu tẩm với 4 L nước hoàng thổ, trộn đều, ủ 2 h đến 3 h. Sao vàng, chà sát rây bỏ hoàng thổ.

Tẩm sữa: Dùng sữa người (Nhũ nhân chế), sữa dê tươi (Dương nhũ chế) hoặc sữa bò tươi. Nhằm tăng tính dưỡng huyết, bổ âm và giảm bớt tính hao của thuốc. Dùng sữa tươi với tỷ lệ 10 % đến 15 % (tt/kl) để tẩm vào dược liệu, ủ 30 min. Vì sao tới thơm.

Tẩm nước vo gạo (Mễ cam chế): Nhằm giảm tính hao của thuốc. Dùng nước vo gạo đặc, mới vo, với tỷ lệ 10 % đến 15 % (tt/kl), tẩm đều, ủ 4 h đến 6 h, sao vàng.

Tẩm đông tiện: Nhằm tăng tác dụng hoạt huyết, tư âm giáng hỏa. Dùng nước tiểu trẻ em khỏe mạnh, từ 5 đến 12 tuổi, nước tiểu mới đi, bỏ đoạn đầu đoạn cuối, với lượng từ 10 % đến 15 % (tt/kl). Sau khi tẩm trộn đều, ủ 30 min đến 1 h. Sao vàng.

Tẩm nước đậu đen, nước cam thảo: Nhằm giảm bớt tính chất của thuốc (tẩm với nước đậu đen), tăng khả năng giải độc (tẩm với Cam thảo). Lấy nước sắc đậu đen (100 g cho 1 L dịch sắc), tẩm vào dược liệu với tỷ lệ 10 % đến 20 % (tt/kl). Cam thảo đem tán nhỏ, sắc lấy nước hoặc ngâm 24 h, lấy nước. Tẩm đều vào dược liệu, ủ cho ngấm khoảng 30 min. Sao khô.

Sao qua chất trung gian

Sao cám: Nhằm làm thơm thuốc, tăng quy kinh tỳ (Hoài sơn, Ý dĩ, Thần khúc, Bạch truật); giảm bớt tính hao của thuốc. Thường dùng cám gạo, với tỷ lệ giữa cám và dược liệu là 1/10 (kl/kl). Đầu tiên cho cám vào chảo đã đun nóng già, khuấy đều, tới khi cám bốc khói trắng, cho dược liệu vào, đảo đều; sao đến khi bề mặt thuốc có màu vàng hoặc thâm; lấy ra, chà sát, rây bỏ cám.

Sao cách cát: Do nhiệt độ nâng cao, phá vỡ cấu trúc rắn của dược liệu, giúp cho việc bào chế (nghiền, sắc thuốc...) thuận lợi, đồng thời giảm mùi khó chịu, hoặc giảm bớt tính độc của dược liệu. Nhiệt độ sao nằm trong khoảng 250 °C đến 300 °C. Cát phải được làm sạch (đã qua rửa nhiều lần bằng cách cho nước sạch vào, khuấy nhiều lần, gạn bỏ lớp nước trên, đổ ra phơi khô, sấy khô), đun nóng già, cho dược liệu vào đảo đều, đến lúc mặt ngoài phồng nứt; hoặc phồng thơm, lấy ra sàng bỏ cát.

Sao cách bột hoạt thạch hay vãn cập (vỏ hàn): Nhằm khử mùi hôi tanh khó chịu của thuốc nhất là các dược liệu có nguồn gốc động vật, đồng thời giúp cho dễ tán các dược liệu có thể chất dẻo dính. Đun nóng già bột trung gian, cho dược liệu vào đảo đều đến khi phồng giòn, xốp, sàng lấy dược liệu.

Nướng (Ôi): Nhằm tăng tính ấm và tăng khả năng dẫn thuốc vào tỳ vị. Thường dùng các phụ liệu có thể chất dẻo dính như bột gạo nếp (thêm nước làm áo bọc thuốc) hoặc

giấy bản ẩm hoặc đất sét bọc thuốc, vùi vào tro nóng hay nướng trên bếp than.

Đốt

Nhằm làm sạch các lông, rễ phụ, sau khi phơi khô được liệu, có thể đốt trực tiếp hoặc cho dược liệu lên các dàn sắt để đốt. Cũng có thể dùng nhiệt của một dụng cụ như dùi sắt đã hơi nóng đỏ, rồi đốt các lông.

Đốt rượu

Nhằm làm thơm vị thuốc, đốt cháy các lông có trên vị thuốc. Thường dùng ethanol 90 % để đốt.

Nung

Làm cho vị thuốc trở nên giòn xốp, có lợi cho việc nghiền tán bột; do ở nhiệt độ cao từ 300 °C đến 700 °C có thể phá vỡ cấu trúc rắn chắc của thuốc, đôi khi có tác dụng giảm độc tính, hoặc biến tính của dược liệu. Thường tiến hành với các dược liệu có thể chất cứng rắn như Mẫu lệ, Long xi, Long cốt; hoặc tăng cường tính thu sáp của các vị thuốc như Phèn chua, Bàng sa...

Nung trực tiếp: Đặt dược liệu tiếp xúc trực tiếp trong lò (nhiệt độ 800 °C đến 1000 °C), nung cho đỏ đều, lấy ra để nguội.

Nung gián tiếp: Cho dược liệu vào nồi nung sạch, đáy nắp, tráng kín bằng đất sét ẩm. Nhiệt độ nung thường trong khoảng 150 °C đến 200 °C. Có khi bọc dược liệu vào đất sét, rồi nung.

Sấy

Nhằm làm khô dược liệu, để chế biến, bảo quản trong quá trình phân phối, sử dụng. Tùy theo tính chất của dược liệu để điều chỉnh nhiệt độ sấy và phương pháp sấy cho thích hợp. Với các dược liệu chứa tinh dầu thì nhiệt độ sấy thường ở 50 °C, các dược liệu khác thường sấy ở 80 °C. Các phương pháp sấy thường được sử dụng như sấy khô trong tủ sấy ở áp suất thường, sấy trên bếp hoặc lò than, sấy bằng hồng ngoại....

Phương pháp kết hợp nước-lửa

Chưng

Nhằm thay đổi tính năng, giảm bớt tác dụng phụ giúp cho việc điều trị tốt hơn. Cho dược liệu vào dụng cụ chưng thích hợp như âu sành, inox..., có thể thêm phụ liệu (Sa nhân, Gừng ...), đáy kín, đặt dụng cụ chưng này vào một dụng cụ lớn hơn, thêm nước vừa đủ để đun theo thời gian quy định cho mỗi dược liệu. Lấy dược liệu ra phơi hay sấy khô. Có trường hợp phải chưng, phơi nhiều lần (cửu chưng, cửu sái), cho đến lúc dược liệu mềm nhuận, đen bóng.

Đồ

Nhằm diệt men trong dược liệu để tránh thủy phân hoạt chất, để làm mềm cho dễ bào thái. Dược liệu được phân loại to nhỏ và xếp vào một dụng cụ thích hợp (chõ), loại to xếp dưới, loại nhỏ xếp trên. Nếu có phụ liệu thì xếp xen kẽ một lớp thuốc, một lớp phụ liệu, đầy chõ. Bắc chõ lên một nồi đáy, tráng kín chỗ tiếp xúc bằng đất sét hay bột nhào của

cám và lá khoai, rồi đổ trong khoảng thời gian qui định, đến lúc được liệu chín mềm.

Nấu

Nhằm làm mềm được liệu, tăng tác dụng của thuốc, giảm tác dụng không mong muốn, nhiều khi nấu với phụ liệu khác. Cho được liệu vào dụng cụ nấu có dung tích thích hợp, loại to xếp dưới, loại nhỏ xếp trên để được liệu chín đều. Dây dụng cụ có thể lót vì để tránh tiếp xúc được liệu với đáy nồi nấu. Đổ nước sạch hay dịch phụ liệu ngập được liệu 5 cm đến 10 cm. Đun sôi và duy trì theo thời gian quy định. Trong quá trình đun có thể cạn nước và thêm nước mới nhiều lần. Khi được liệu chín đều, lấy ra thái mỏng, phơi hoặc sấy khô tới độ ẩm qui định.

Tôi

Nhằm làm giòn được liệu, giúp cho việc nghiền, tán dễ dàng, đồng thời khử các mùi khó chịu của thuốc. Được liệu được rang cách cát hoặc nung tới khi đạt yêu cầu, khi đổ ra còn đang nóng thì nhúng ngập nhanh vào nước hay vào một dung dịch phụ liệu như như giấm hoặc nước Hoàng liên... Lấy ra phơi hoặc sấy khô.

Rán dầu

Nhằm làm giảm độc tính của được liệu (đối với Mã tiền), làm cho được liệu trở nên giòn, dễ tán nhỏ (đối với Xương báo). Thường rán bằng dầu lạc, dầu vừng. Đun sôi dầu, cho được liệu vào rán cho đến khi có màu hơi vàng, được liệu nổi lên, thể chất giòn, xốp. Vớt ra cho nhỏ hết dầu. Lượng dầu so với được liệu thường có tỷ lệ khoảng 20 % đến 30 % (tt/kl).

12.21 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN B₁ TRONG ĐƯỢC LIỆU

Lưu ý: Các aflatoxin là những chất rất độc và gây ung thư. Cần thực hiện các thao tác trong tủ hút hơi độc bất cứ khi nào có thể. Phải đặc biệt lưu ý khi các độc tố này ở dạng bột khô vì chúng có tính chất hút tĩnh điện và khuynh hướng phát tán vào môi trường làm việc; trong trường hợp này nếu có thể thì thao tác trong hộp kín có gắng tay. Cần tuân thủ Quy trình khử nhiễm aflatoxin cho các chất thải phòng thí nghiệm đã được Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế (IARC) xây dựng.

Các aflatoxin là những độc tố vi nấm xuất hiện trong tự nhiên, chủ yếu do nấm mốc *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* tạo ra. Các loài nấm này khá phổ biến và phát tán trong tự nhiên, rất hay được tìm thấy khi một số loại hạt nảy mầm và mọc ở những điều kiện khắc nghiệt như hạn hán. Nấm mốc xuất hiện trong đất, trong thực vật đang phân hủy, trong cỏ khô và ở những hạt đang bị vi khuẩn phá hủy, sẽ tác động vào tất cả các loại cơ chất hữu cơ bất cứ khi nào hoặc ở đâu có điều kiện thuận lợi cho chúng phát triển. Những điều kiện thuận lợi đó là hàm lượng ẩm cao và nhiệt độ cao. Ít nhất đã có 13 loại aflatoxin khác nhau được tạo ra trong thiên nhiên và phần

lớn trong số đó được biết là có độc tính cao và gây ung thư. Aflatoxin B₁ được xác định là chất độc nhất. Các được liệu bị nhiễm aflatoxin phải được xác định bằng một phương pháp phân tích đã được thẩm định.

Trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng, các được liệu chỉ được nhiễm aflatoxin B₁ không quá 2 µg/kg. Cơ quan quản lý được cũng có thể yêu cầu một giới hạn cho phép là 4 µg/kg cho tổng lượng các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂.

Phương pháp mô tả dưới đây được nêu ra như một ví dụ, đã được chứng minh là thích hợp cho việc xác định aflatoxin trong gừng, trong quả phan tả điệp v.v... Khi áp dụng phương pháp này cho các được liệu khác, cần phải xác định tính thích hợp của nó; nếu không, phải dùng một phương pháp được thẩm định khác.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Các aflatoxin đều bị ánh sáng phân hủy. Cần tiến hành định lượng trong khu vực tránh ánh sáng ban ngày bằng cách dùng lá chắn tia tử ngoại trên cửa sổ kết hợp với ánh sáng dịu, hoặc dùng rèm che kết hợp với chiếu sáng nhân tạo (có thể bằng đèn tuýp huỳnh quang). Bảo quản các dung dịch chứa aflatoxin tránh ánh sáng ban ngày.

Tráng rửa dụng cụ thủy tinh trước khi dùng bằng dung dịch acid sulfuric 10 % (theo thể tích) (TT), sau đó rửa cân thận bằng nước cất cho đến khi không còn vết acid.

Dung dịch thử: Dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch chứa kháng thể đối với aflatoxin B₁ có dung lượng không ít hơn 100 ng aflatoxin B₁ và khả năng thu hồi không thấp hơn 80 % khi cho một dung dịch 5 ng aflatoxin B₁ trong hỗn hợp 12,5 ml methanol (TT) và 87,5 ml nước chảy qua. Giữ cột sắc ký ái lực miễn dịch ở nhiệt độ phòng. Lấy 5,00 g được liệu đã tán bột (qua rây số 500), thêm 100,0 ml hỗn hợp 30 thể tích nước và 70 thể tích methanol (TT); chiết bằng siêu âm trong 30 min. Lọc dịch chiết qua giấy lọc. Hút 10,0 ml dịch lọc trong cho vào một bình nón cỡ 150 ml. Thêm 70,0 ml nước, lắc đều. Hút 40,0 ml dung dịch cho chảy qua cột sắc ký ái lực miễn dịch với tốc độ 3 ml/min (không vượt quá 5 ml/min). Rửa cột bằng nước 2 lần, mỗi lần 10 ml với tốc độ không quá 5 ml/min rồi làm khô bằng cách áp một chân không nhẹ trong 5 đến 10 s, hoặc bằng cách dùng bơm tiêm thổi không khí qua cột sắc ký trong 10 s.

Cho 0,5 ml methanol (TT) lên cột và để chảy qua cột nhờ trọng lực. Thu dịch rửa giải vào một bình định mức cỡ 5 ml. Sau 1 min, lại cho tiếp 0,5 ml methanol (TT) và hứng lấy dịch rửa giải lần 2. Chờ 1 min sau lại thực hiện lần rửa giải thứ 3 nữa cũng với 0,5 ml methanol (TT). Thu tối đa dịch rửa giải bằng cách nén không khí hoặc tạo một chân không nhẹ qua cột. Thêm nước vào bình định mức cho đủ 5 ml, lắc đều. Nếu thu được dung dịch trong thì có thể dùng ngay để phân tích. Nếu dung dịch không trong suốt thì cần lọc trước khi tiêm sắc ký. Dùng màng lọc sẵn dùng 1 lần (màng lọc polytetrafluoroethylen cỡ lỗ lọc 0,45 µm) đã được chứng minh là không gây mất aflatoxin do lưu giữ.

Dung dịch chuẩn gốc 1 aflatoxin B₁: Hòa tan aflatoxin B₁ (TT) trong hỗn hợp acetonitril - toluen (2 : 98) để có dung dịch chứa 10 µg/ml. Xác định nồng độ chính xác aflatoxin B₁ trong dung dịch này bằng cách đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) trong khoảng bước sóng giữa 330 nm và 370 nm trong công đo thạch anh.

Tính nồng độ aflatoxin B₁, biểu thị bằng µg/ml, bằng công thức sau:

$$\frac{A \times M \times 100}{\epsilon \times l}$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ đo được tại cực đại hấp thụ trong khoảng bước sóng 330 nm đến 370 nm;

M là khối lượng phân tử của aflatoxin B₁ (312 g/mol);

c là hệ số hấp thụ phân tử gam của aflatoxin B₁ trong hỗn hợp dung môi toluen - acetonitril (1930 m²/mol);

l là bề dày quang học của công đo (1 cm).

Dung dịch chuẩn gốc 2 aflatoxin B₁: Chuẩn bị một dung dịch chuẩn gốc 2 chứa 100 ng aflatoxin B₁ trong 1 ml bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc 1 aflatoxin B₁ với hỗn hợp acetonitril - toluen (2 : 98). Bọc kín bình chứa trong giấy nhôm và bảo quản ở nhiệt độ dưới 4 °C. Trước khi dùng, chỉ bỏ giấy bọc nhôm khi dung dịch chứa trong bình đạt tới nhiệt độ phòng. Nếu cần bảo quản dung dịch trong một thời gian dài (khoảng 1 tháng), cân cân xác định khối lượng bình chứa trước và sau mỗi lần sử dụng.

Các dung dịch chuẩn aflatoxin B₁: Lấy các thể tích dung dịch chuẩn gốc 2 aflatoxin B₁ như chỉ dẫn trong Bảng 12.21.1 cho vào mỗi bình định mức 250 ml. Thổi vào bình một luồng khí nitrogen ở nhiệt độ phòng cho đến khi vừa bay hết hơi dung môi. Thêm vào mỗi bình 75 ml methanol (TT), để cho aflatoxin hòa tan rồi pha loãng với nước đủ 250 ml.

Bảng 12.21.1 - Các dung dịch chuẩn aflatoxin B₁

Dung dịch chuẩn	Thể tích dung dịch chuẩn gốc 2 (µl)	Nồng độ cuối cùng của dung dịch chuẩn (ng/ml)
1	125	0,05
2	250	0,1
3	500	0,2
4	750	0,3
5	1000	0,4

Thiết lập đường chuẩn

Dùng các dung dịch chuẩn aflatoxin B₁ từ số 1 đến số 5 để xây dựng đường chuẩn; đường này sẽ bao phủ một khoảng tương ứng từ 1 µg đến 8 µg aflatoxin B₁ trong 1 kg được liệu. Kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn. Nếu hàm lượng aflatoxin B₁ trong mẫu cần kiểm tra nằm ngoài khoảng tuyến tính, dung dịch thử cần phải được pha loãng đến khi hàm lượng aflatoxin thích hợp với đường chuẩn đã thiết lập.

Điều kiện sắc ký

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

Pha động A (dùng khi dẫn xuất hóa sau cột với phản ứng quang hóa hoặc với pyridinium bromid): acetonitril - methanol - nước (2 : 3 : 6);

Pha động B (dùng khi dẫn xuất hóa sau cột bằng brom do quá trình điện hóa tạo ra): Thêm 0,12 g kali bromid (TT) và 350 µl dung dịch acid nitric loãng (TT) vào 1 L pha động A.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Detector huỳnh quang với kính lọc ánh sáng kích thích 360 nm và kính lọc tia phát xạ 420 nm, hoặc thiết bị khác tương đương. Đối với detector điều chỉnh được, chế độ cài đặt được khuyến cáo là bước sóng kích thích 366 nm và bước sóng phát xạ 435 nm.

Thể tích tiêm: 500 µl.

Dẫn xuất hóa sau cột bằng pyridinium hydrobromid perbromid (PBPB)

- bơm không có xung;
- bộ trộn chữ T có thể tích chết bằng 0;
- ống phản ứng bằng polytetrafluoroethylen, *l* = 0,45 m;
- Φ = 0,5 mm;
- pha động A;
- thuốc thử dẫn xuất hóa sau cột: Hòa tan 50 mg pyridinium hydrobromid perbromid (TT) trong 1000 ml nước (bảo quản tránh ánh sáng và dùng trong 4 ngày);
- tốc độ dòng thuốc thử tạo dẫn xuất: 0,4 ml/min.

Dẫn xuất hóa sau cột với phản ứng quang hóa (PIRED)

- ống phản ứng với đèn UV hơi thủy ngân áp suất thấp 254 nm (tối thiểu 8 W);
- gương hỗ trợ;
- cuộn phản ứng: Ống polytetrafluoroethylen bao chặt quanh bóng UV, *l* = 25 m; Φ = 0,25 mm; thể tích trống danh định 1,25 ml;
- thời gian chiếu: 2 min;
- pha động A.

Dẫn xuất hóa sau cột bằng brom mới sinh từ phản ứng điện hóa (KOBRA)

- pin KOBRA: Pin điện hóa sinh ra brom hoạt tính để tạo dẫn xuất với aflatoxin, làm tăng sự phát huỳnh quang; sẵn có trên thị trường;
- nguồn điện 1 chiều cùng bộ với pin KOBRA, cung cấp một dòng không đổi khoảng 100 µA;
- ống phản ứng bằng polytetrafluoroethylen, *l* = 0,12 m; Φ = 0,25 mm;
- pha động B.

Thứ tự rửa giải: Aflatoxin G₂, aflatoxin G₁, aflatoxin B₂, aflatoxin B₁.

Tính kết quả

Thiết lập phương trình đường chuẩn $y = ax + b$ với nồng độ aflatoxin B₁ (ng/ml) trên trục x và tín hiệu đáp ứng (S)

trên trục y. Nồng độ aflatoxin B₁ (C) trong dung dịch đo được tính bằng biểu thức:

$$\frac{S - b}{a}$$

Tính hàm lượng aflatoxin B₁ trong dược liệu, biểu thị bằng ng/g, theo công thức sau:

$$\frac{V_1 \times V_2 \times C}{m \times V_1}$$

Trong đó:

m là khối lượng dược liệu lấy để phân tích (g).

V₁ là thể tích dung môi được dùng để chiết (ml).

V₂ là thể tích dịch chiết được làm sạch bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch (ml).

V₂ là thể tích dung dịch cuối cùng sau khi rửa giải từ cột sắc ký ái lực miễn dịch và pha loãng (ml).

C là nồng độ aflatoxin đo được từ dung dịch thử (ng/ml).

Sự có mặt aflatoxin B₁ có thể được khẳng định bằng cách ghi lại sắc ký đồ dung dịch thử không qua dẫn xuất hóa sau cột; tín hiệu đáp ứng của aflatoxin B₁ trên sắc đồ này bị giảm đi đáng kể (hơn 10 lần).

12.22 XÁC ĐỊNH ACID ARISTOLOCHIC I TRONG DƯỢC LIỆU

Acid aristolochic I là chất có độc tính cao, được cho là có khả năng gây ra suy thận và ung thư, acid aristolochic I thường được tìm thấy trong các cây thuộc họ Mộc hương (Aristolochiaceae). Do đó, các dược liệu có thể có chứa acid aristolochic I cần được kiểm tra phát hiện acid aristolochic I trước khi sử dụng.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Dung dịch đệm phosphat 0,05 M - acetonitril (11 : 9).

Dung dịch đệm phosphat 0,05 M: Hòa tan 7,8 g natri dihydrophosphat (TT) và 2,0 ml acid phosphoric (TT) trong nước và pha loãng thành 1000 ml bằng nước.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan một lượng acid aristolochic chuẩn tương đương với 10,0 mg acid aristolochic I trong hỗn hợp methanol - nước (3 : 1) và pha loãng thành 200,0 ml với hỗn hợp methanol - nước (3 : 1). Hút 2,0 ml dung dịch này, pha loãng thành 10,0 ml với hỗn hợp methanol - nước (3 : 1).

Dung dịch thử: Cân 2,0 g bột dược liệu (qua rây số 125) vào một bình nón nút mài, thêm 50,0 ml hỗn hợp gồm methanol - nước (3 : 1), lắc kỹ trong 15 min, lọc.

Điều kiện sắc ký:

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

Detector quang phổ tử ngoại khả kiến đặt ở bước sóng 400 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Cách tiến hành:

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào máy

sắc ký, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã mô tả, ghi lại sắc ký đồ.

Mẫu thử được chấp nhận khi trên sắc ký đồ của dung dịch thử không xuất hiện pic có cùng thời gian lưu với pic của acid aristolochic I trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

12.23 HƯỚNG DẪN THIẾT LẬP DẤU VÂN TAY HÓA HỌC CỦA DƯỢC LIỆU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HOẶC SẮC KÝ KHÍ

Dấu vân tay hóa học (DVT) là các thông tin hóa học của dược liệu được biểu thị dưới dạng sắc ký đồ, các phổ và các đồ thị ... được ghi bằng các kỹ thuật phân tích (sau đây gọi là sắc ký đồ dấu vân tay, sắc ký đồ DVT). Các kỹ thuật sắc ký (bao gồm sắc ký lỏng, sắc ký khí) thường được áp dụng khi thiết lập dấu vân tay hóa học của dược liệu.

Dấu vân tay hóa học của dược liệu được thiết lập bằng phương pháp sắc ký lỏng và sắc ký khí có ưu điểm là độ chọn lọc, độ nhạy và độ phân giải cao, thời gian phân tích ngắn, lượng mẫu dùng để phân tích nhỏ. Trong sắc ký đồ DVT được thiết lập, có pic của một hoặc nhiều chất đánh dấu hóa học hay các chất đặc trưng.

Yêu cầu thiết lập sắc ký đồ DVT

Lựa chọn mẫu dược liệu phải đảm bảo tính đại diện và bảo quản đúng quy định theo chuyên luận riêng.

Phương pháp chiết xuất và các điều kiện sắc ký phù hợp được lựa chọn và tối ưu hóa tùy thuộc thành phần hóa học hoặc các chất đánh dấu trong mỗi dược liệu. Dịch chiết dược liệu sử dụng cho phân tích là toàn phần hay nhóm chất đại diện được quy định trong từng chuyên luận riêng. Phương pháp cần đảm bảo tính chính xác, độ lặp lại và độ ổn định. Sắc ký đồ DVT cần có đầy đủ thông tin bao gồm thành phần, chất đặc trưng và nhóm hoạt chất được thể hiện qua các pic có độ phân giải tốt giúp định tính được liệu một cách chính xác. Thời gian phân tích khi tiến hành thiết lập DVT bằng phương pháp sắc ký lỏng, hoặc sắc ký khí không nên quá 60 min.

Trong sắc ký đồ DVT của dược liệu phân tích, pic tách hoàn toàn với các pic khác và tương ứng với pic của chất đối chiếu hóa học được gọi là pic đánh dấu dùng để xác định thời gian lưu tương đối của các pic khác trong sắc ký đồ. Có thể dùng một hoặc nhiều pic đánh dấu. Trường hợp không chọn được chất đánh dấu có sẵn trong dược liệu, việc sử dụng chuẩn nội phù hợp có thể được xem như chất đánh dấu. Pic đặc trưng trong sắc ký đồ DVT là các pic tách hoàn toàn so với các pic kề bên (độ phân giải lớn hơn hoặc bằng 1,2), có diện tích đủ lớn được quy định trong từng chuyên luận riêng. Pic đặc trưng có thời gian lưu ổn định và diện tích pic lặp lại trong quá trình phân tích.

Tính phù hợp của hệ thống: Tiêm dung dịch chất đánh dấu (hoặc chất chuẩn nội) có nồng độ quy định theo từng chuyên luận riêng 5 lần. Yêu cầu về độ lệch chuẩn tương đối của diện tích và thời gian lưu của pic đánh dấu (hoặc

chuẩn nội) được quy định trong chuyên luận riêng. Hiệu lực cột được đánh giá dựa trên số đĩa lý thuyết tính theo pic của chất đánh dấu (hoặc chuẩn nội) nằm trong giới hạn quy định trong chuyên luận riêng. Độ phân giải giữa hai pic kề sát nhau trong sắc ký đồ của dung dịch thử phải lớn hơn 1,0.

Xác định thời gian lưu tương đối (RRT) của pic đặc trưng so với pic đánh dấu (hoặc pic chuẩn nội) theo công thức:

$$RRT = \frac{t_{Rc}}{t_{Rm}}$$

Trong đó:

t_{Rc} là thời gian lưu của pic đặc trưng.

t_{Rm} là thời gian lưu của pic đánh dấu (hoặc pic chuẩn nội).

Sắc ký đồ DVT đối chiếu, pic đánh dấu, pic đặc trưng và khoảng thời gian phân tích của một được liệu được thiết lập dựa trên kết quả thu được từ ít nhất 5 lô riêng biệt, mỗi lô được phân tích 2 lần (tương ứng thu được 10 dữ liệu).

Ứng dụng sắc ký đồ dấu vân tay trong quản lý chất lượng được liệu

Sắc ký đồ DVT được ứng dụng trong định tính và đánh giá chất lượng được liệu.

Sắc ký đồ DVT của một được liệu cần phân tích được thiết lập theo đúng quy trình nêu trên. Phép định tính là đúng khi sắc ký đồ của mẫu phân tích có đầy đủ các pic đặc trưng có thời gian lưu tương đối nằm trong giới hạn cho phép tương ứng với các pic trong sắc ký đồ DVT đối chiếu đã được quy định trong từng chuyên luận riêng.

12.24 LỖ KHÍ VÀ CHỈ SỐ LỖ KHÍ

Một số trường hợp, lỗ khí và chỉ số lỗ khí có ý nghĩa trong kiểm nghiệm được liệu. Số lượng lỗ khí (số lỗ khí trên 1 cm² biểu bì) và chỉ số lỗ khí (tỷ lệ lỗ khí và số tế bào biểu bì trên một diện tích) thường là những đại lượng tương đối cố định đối với một loài, trong nhiều trường hợp cho phép phân biệt các loài trong cùng một chi.

Các kiểu lỗ khí

Hình ảnh một số kiểu lỗ khí cơ bản được đưa trong Hình 12.24, dựa vào hình dạng và cách sắp xếp của các tế bào xung quanh lỗ khí để phân biệt các kiểu lỗ khí, hay gập các kiểu như sau:

(1) Kiểu hỗn bào (irregular-celled): Lỗ khí được bao bọc bởi nhiều tế bào giống như tế bào biểu bì, không có tế bào phụ (các tế bào xung quanh lỗ khí có số lượng không xác định, sắp xếp lộn xộn không theo thứ tự).

(2) Kiểu dị bào (unequal-celled): Lỗ khí được bao bọc bởi 3 tế bào phụ, trong đó có 1 tế bào nhỏ hơn 2 tế bào còn lại.

(3) Kiểu trục bào (cross-celled): Lỗ khí được bao bọc bởi 2 tế bào phụ nằm thẳng góc với trục dọc của lỗ khí (khe lỗ khí).

(4) Kiểu song bào (parallel-celled): Lỗ khí được bao bọc bởi 2 tế bào phụ nằm song song với trục dọc của lỗ khí.

Chỉ số lỗ khí

Sử dụng một trong các phương pháp sau đây để xác định số lỗ khí trên một diện tích biểu bì:

– Sao chép bề mặt biểu bì bằng nhựa colodion hoặc bóc biểu bì rồi cắt các mẫu có kích thước thích hợp (hoặc kích thước 1 cm² nếu cần xác định số lỗ khí trên 1 cm²) để quan sát dưới kính hiển vi. Đếm số lỗ khí trong một diện tích hoặc 1 cm².

– Quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi phản xạ các mẫu lá được cắt với kích thước thích hợp.

– Chụp ảnh một diện tích bề mặt biểu bì, đếm số lỗ khí và các loại tế bào trên ảnh.

Xác định chỉ số lỗ khí theo công thức sau:

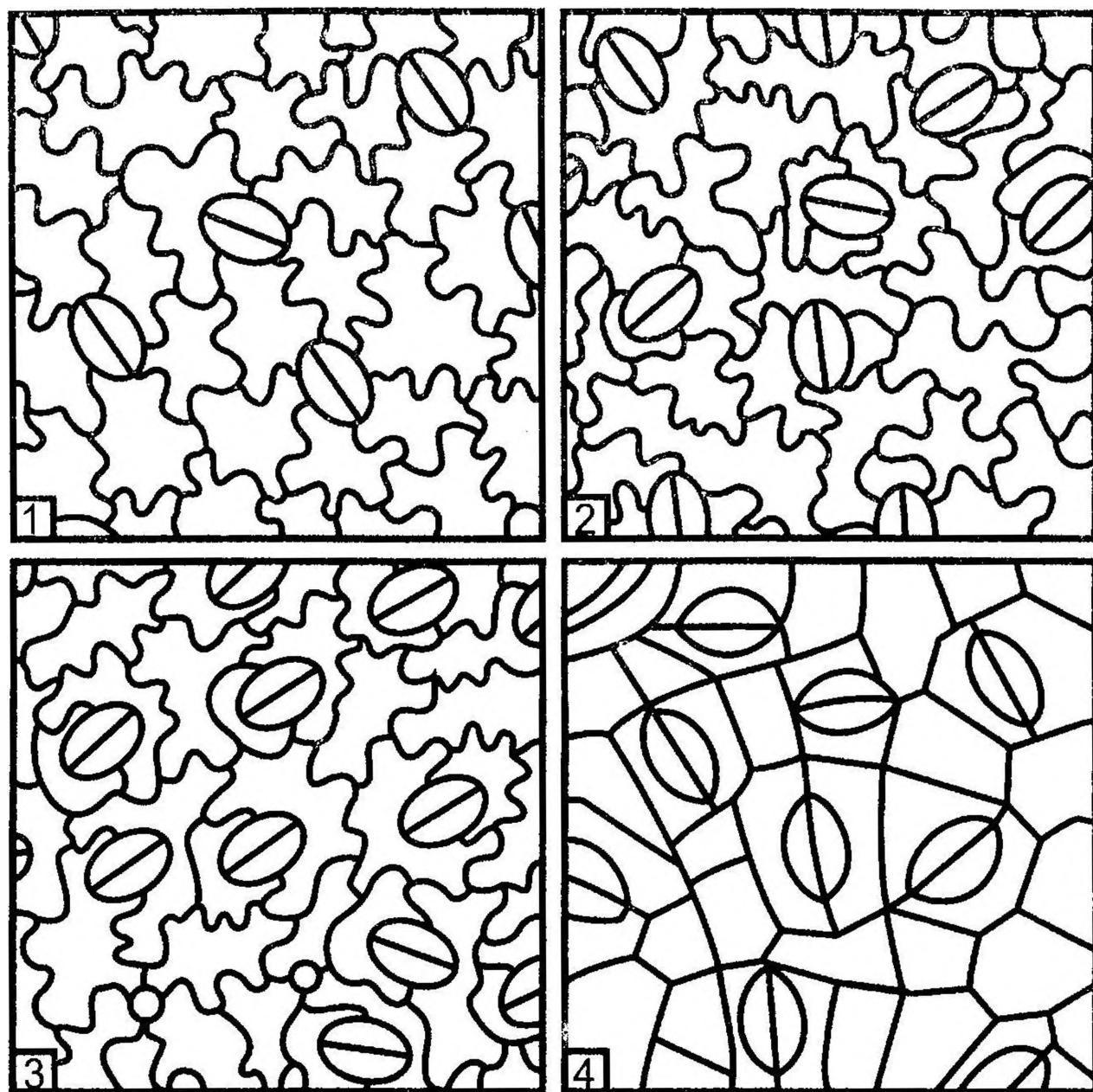
$$\text{Chỉ số lỗ khí} = \frac{100 \times S}{E + S}$$

Trong đó:

S là số lỗ khí trên một diện tích (thường tính trên một vi trường).

E là số tế bào biểu bì (bao gồm cả các loại hình thái lông) trong cùng một diện tích (thường tính trên một vi trường).

Yêu cầu: Đối với mỗi mẫu thử, chỉ số lỗ khí thu được là giá trị trung bình của ít nhất 10 lần thực hiện.



1. Lỗ khí kiểu hỗn bào; 2. Lỗ khí kiểu dị bào; 3. Lỗ khí kiểu trực bào; 4. Lỗ khí kiểu song bào

Hình 12.24 - Các kiểu lỗ khí