

CAO ĐẶC ĐÌNH LĂNG

Polyscias fruticosa Radicis extractum spissum

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

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

Mô tả

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

Định tính

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dung dịch thử: Dùng dung dịch thử thu được ở mục Định lượng.

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

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

Mất khối lượng do làm khô

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

Kim loại nặng

Không được quá 20 phần triệu.

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

Định lượng acid oleanolic

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

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

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

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

Điều kiện sắc ký:

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

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

Tốc độ dòng: 1,3 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic acid oleanolic trên sắc ký đồ của 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0 %. Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính hàm lượng acid oleanolic dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung

dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ của dung dịch acid oleanolic chuẩn.

Hàm lượng acid oleanolic ($C_{30}H_{48}O_3$) trong chế phẩm không được ít hơn 0,04 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, chống ẩm. Để nơi khô ráo, mát.

CAO ĐẶC ÍCH MẪU

Leonuri japonici Herbae extractum spissum

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

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

Mô tả

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

Định tính

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

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: *n*-Butanol - acid hydrocloric - ethyl acetat (8 : 2 : 0,5) hoặc Aceton - ethanol - acid hydrocloric (10 : 6 : 1).

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

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

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

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

Mất khối lượng do làm khô

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

Tro toàn phần

Không được quá 30,0 % (Phụ lục 9.8).

Tro không tan trong acid

Không được quá 3,0 % (Phụ lục 9.7).

Cặn không tan trong nước

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

Hòa tan 1,0 g chế phẩm trong 50 ml nước cất nóng, lọc qua giấy lọc đã cân bì trước, rửa giấy lọc và cặn bằng nước cất nóng đến khi nước rửa không màu, sấy cặn và giấy lọc ở 100 °C đến 150 °C trong 3 h, để nguội trong bình hút ẩm 30 min, cân nhanh để xác định khối lượng.

pH

5,0 đến 7,0 (Phụ lục 6.2).

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

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

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

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

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

Điều kiện sắc ký:

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

Detector quang phổ tử ngoại ở bước sóng 203 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành: Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic stachydrin hydroclorid trên sắc ký đồ của 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn không được lớn hơn 2,0 %.

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