

lần, mỗi lần với 5 ml dung dịch đậm và chuyển dịch rửa vào cột thủy tinh (tổng lượng dịch cho vào cột thủy tinh không vượt quá khả năng lưu giữ 20 ml của cột). Để dịch thấm vào pha tĩnh trong 15 min, rửa giải bằng 100 ml *ethyl acetat* (TT), thu lấy dịch rửa giải và bay hơi trong cách thủy ở nhiệt độ 50 °C đến khô. Hòa tan cần trong 20,0 ml dung môi pha loãng.

Điều kiện sắc ký:

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

Nhiệt độ cột: 25 °C ± 1 °C.

Detector tán xạ ánh sáng bay hơi. Điều chỉnh detector để đạt được tỷ số tín hiệu trên nhiễu là tốt nhất theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 15 μl.

Cách tiến hành:

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

Thời gian (min)	Nước (% tt/tt)	Methanol (% tt/tt)
0 → 23	75 → 52	25 → 48
23 → 28	52	48
28 → 30	52 → 25	48 → 75
30 → 35	25 → 10	75 → 90
35 → 40	10 → 75	90 → 25
40 → 50	75	25

Tiến hành sắc ký lần lượt với các dung dịch chuẩn. Xác định các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn bằng cách so sánh với sắc ký đồ cung cấp kèm theo ginkgo terpen lacton chuẩn. Vẽ đồ thị tương quan giữa logarit của nồng độ (mg/ml) và logarit của diện tích pic của từng chất.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiêm dung dịch chuẩn có nồng độ terpen lacton chính xác khoảng 400 μg/ml (nồng độ bilobalid khoảng 200 μg/ml). Sắc ký đồ thu được từ dung dịch chuẩn phải tương tự sắc ký đồ cung cấp kèm theo ginkgo terpen lacton chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối của logarit của diện tích pic bilobalid của 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 2,0 %. Hệ số tương quan của đường hồi qui được lập từ kết quả phân tích các dung dịch chuẩn không được nhỏ hơn 0,995.

Từ đồ thị thu được, xác định nồng độ (C) của mỗi terpen lacton trong dung dịch thử. Tính hàm lượng phần trăm (X %) của mỗi terpen lacton là bilobalid (C₁₅H₁₈O₈), ginkgolid A (C₂₀H₂₄O₉), ginkgolid B (C₂₀H₂₄O₁₀), ginkgolid C (C₂₀H₂₄O₁₁) trong cao khô theo công thức sau:

$$X(\%) = (C/W) \times 2000$$

Trong đó:

C là nồng độ của mỗi terpen lacton trong dung dịch thử (mg/ml).

W là lượng cân cao khô đã dùng để chuẩn bị dung dịch thử (mg).

Tính hàm lượng terpen lacton toàn phần bằng tổng hàm lượng mỗi terpen lacton được tính ở trên, tính theo cao khô kiệt.

Hàm lượng terpen lacton toàn phần trong cao khô: 5,4 % - 12,0 %.

Hàm lượng bilobalid: 2,6 % - 5,8 %.

Tổng hàm lượng ginkgolid A (C₂₀H₂₄O₉), ginkgolid B (C₂₀H₂₄O₁₀), ginkgolid C (C₂₀H₂₄O₁₁): 2,8 % - 6,2 %.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, tránh ánh sáng, chống ẩm, ở nhiệt độ phòng.

DẦU GẮC

Momordica oleum

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

Tính chất

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

Tỷ trọng

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

Chỉ số khúc xạ

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

Chỉ số iod

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

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

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

Tổng số vi sinh vật hiếu khí: Không được quá 10⁴ CFU/ml.

Tổng số nấm: Không được quá 10² CFU/ml.

Không được quá 10² CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 ml.

Không được có *Salmonella* trong 10 ml.

Không được có *E. coli*, *S. aureus* trong 1 ml.

Định tính

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

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

Định lượng

Định lượng β -caroten và lycopene

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

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

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

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

Điều kiện sắc ký:

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

Nhiệt độ cột: 30 °C.

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

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl .

Cách tiến hành:

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

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

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống. Tiêm 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic lycopene và β -caroten không được lớn hơn 2,0 %. Thứ tự rửa giải: lycopene, β -caroten.

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Tính hàm lượng lycopene và β -caroten trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và nồng độ lycopene và β -caroten trong dung dịch chuẩn.

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

Định lượng acid béo không no

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

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

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50 mg mỗi chất chuẩn acid linoleic, acid oleic cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong *n-hexan* (TT) và thêm *n-hexan* (TT) đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch hỗn hợp acid linoleic, acid oleic có nồng độ mỗi chất khoảng 500 $\mu\text{g/ml}$.

Lấy 100 μl dung dịch trên cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy, đệm cao su, thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội. Loại dung môi *n-hexan* bằng khí nitrogen. Thêm vào ống nghiệm 2 ml *dung dịch natri hydroxyd 0,5 N trong methanol* (TT), đậy kín nắp, đun trong cách thủy ở 70 °C trong 20 min, cho tiếp 2 ml *dung dịch boron trifluorid 20 %* (TT) trong *methanol* (TT), sục khí nitrogen, đun trong cách thủy ở 70 °C trong 30 min. Chuyển toàn bộ hỗn hợp trong ống nghiệm vào bình gạn, lắc với bằng *n-hexan* (TT) 3 lần, mỗi lần 5 ml, tách lấy lớp dịch chiết *n-hexan*, gộp dịch chiết *n-hexan*, làm bay hơi dung môi bằng dòng khí nitrogen có gia nhiệt ở 60 °C đến gần khô, hòa tan cần bằng 1 ml *n-hexan* (TT).

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

Điều kiện sắc ký khí:

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

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

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

Nhiệt độ buồng tiêm mẫu 250 °C.

Nhiệt độ cột: Nhiệt độ ban đầu 100 °C giữ trong 2 min, tăng đến 200 °C với tốc độ 10 °C/min, giữ trong 3 min; tăng đến 250 °C với tốc độ 5 °C/min, giữ trong 5 min.

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

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

Thể tích tiêm: 1 μl .

Cách tiến hành:

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

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

Tính hàm lượng của acid linoleic, acid oleic theo tỷ lệ diện tích giữa pic acid tương ứng so với pic chuẩn nội thu được

trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ acid linoleic và acid oleic trong dung dịch chuẩn. Hàm lượng acid linoleic ($C_{18}H_{32}O_2$) không được dưới 10 %, acid oleic ($C_{18}H_{34}O_2$) không được dưới 30 %.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

DẦU MÙ U

Calophylli inophylli oleum

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

Mô tả

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

Tỉ trọng tương đối

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

Chỉ số acid

1 đến 45 (Phụ lục 7.2).

Chỉ số xà phòng

171 đến 228 (Phụ lục 7.7).

Định tính

A. Lấy 0,5 ml chế phẩm, thêm 2 ml *ether ethylic* (TT), lắc đều cho tan. Thêm 2 ml *ethanol* 96 % (TT) lắc đều cho tan. Chia đều dung dịch vào 2 ống nghiệm.

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

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

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

Bản mỏng: *Silica gel* F₂₅₄.

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

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

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

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

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

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

Định lượng

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

Pha động A: *Acetonitril*.

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

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

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

Điều kiện sắc ký:

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

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Nhiệt độ cột: 40 °C.

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

Cách tiến hành:

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

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

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch calophyllolid chuẩn 87,5 (µg/ml). Hệ số đối xứng thu được từ pic calophyllolid phải nằm trong khoảng 0,8 - 1,5, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic calophyllolid trong 6 lần tiêm lặp lại không được quá 2,0 %, số đĩa lý thuyết tính theo pic calophyllolid phải không được dưới 20.000.

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

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

Tính hàm lượng phần trăm (kl/kl) calophyllolid, $C_{26}H_{44}O_5$, trong chế phẩm theo công thức: