

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

Trừ các quy định trong chuyên luận riêng, các yêu cầu và phương pháp chung như sau:

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,...), đậy 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 - xừng), loại to xếp dưới, loại nhỏ xếp trên. Nếu có phụ liệu thì xếp xen kẽ một lớp thuốc, một lớp phụ liệu, đậy chõ. Bắc chõ lên một nồi đáy, cho một lượng nước thích hợp vào nồi đáy sao cho khi sôi nước không tràn lên chõ (xừng) làm hỏng dược liệu nhưng vẫn đảm bảo đủ để tạo được hơi nước nóng làm mềm dược liệu - thông thường lượng nước khoảng 1/2 dung tích nồi đáy hoặc mặt nước cách đáy chõ (xừng) khoảng 5 - 7 cm, trát kín chõ vòng tiếp xúc bằng đất sét hay bột nhão của cám và lá khoai, rồi đồ trong khoảng thời gian quy định, đến lúc dược liệu chín mềm (Ngày nay có thể dùng các loại chõ inox).

Nấu

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

Tôi

Nhằm làm giòn dược liệu, giúp cho việc nghiền, tán dễ dàng, đồng thời khử các mùi khó chịu của thuốc. Dược 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 dấm hoặc nước Hoàng liên,... Lấy ra phơi hoặc sấy khô.

Rán dầu

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

12.21 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN B₁ TRONG DƯỢC 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 dược 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 dược liệu chỉ được nhiễm aflatoxin B₁ không quá 2 µg/kg. Cơ quan quản lý dược 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 dược 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 từ ngoài trên cửa sổ kết hợp với ánh sáng diu, 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 cẩn 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 dược 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 do thạch anh.

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

$$X(\mu\text{g/ml}) = \frac{A \times M \times 100}{\epsilon \times l}$$

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);

ε 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), cần 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 dược 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 tinh 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 (PHRED)

- 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.

Thuật ngữ 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:

$$C(\text{ng/ml}) = \frac{S - b}{a}$$

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

$$X(\text{ng/g}) = \frac{V_1 \times V_2 \times C}{m \times V_i}$$

Trong đó:

- m là khối lượng dược liệu lấy để phân tích (g).
- V₁ là thể tích dung môi được dùng để chiết (ml).

V₁ 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