

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 G<sub>2</sub>, aflatoxin G<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>2</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>.

**Tính kết quả**

Thiết lập phương trình đường chuẩn y = ax + b với nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> (ng/ml) trên trục x và tín hiệu đáp ứng (S) trên trục y. Nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> (C) trong dung dịch đo được tính bằng biểu thức:

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

Tính hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> (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).
- V<sub>1</sub> là thể tích dung môi được dùng để chiết (ml).

V<sub>1</sub> là thể tích dịch chiết được làm sạch bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch (ml).

V<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 dược 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 dược 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 dược liệu

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

Sắc ký đồ DVT của một dược 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 dược liệu. Số lượng lỗ khí (số lỗ khí trên 1 cm<sup>2</sup> 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 gặp 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 trực 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 cm<sup>2</sup> nếu cần xác định số lỗ khí trên 1 cm<sup>2</sup>) để quan sát dưới kính hiển vi. Đếm số lỗ khí trong một diện tích hoặc 1 cm<sup>2</sup>.

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