

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 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 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 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 phân 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:

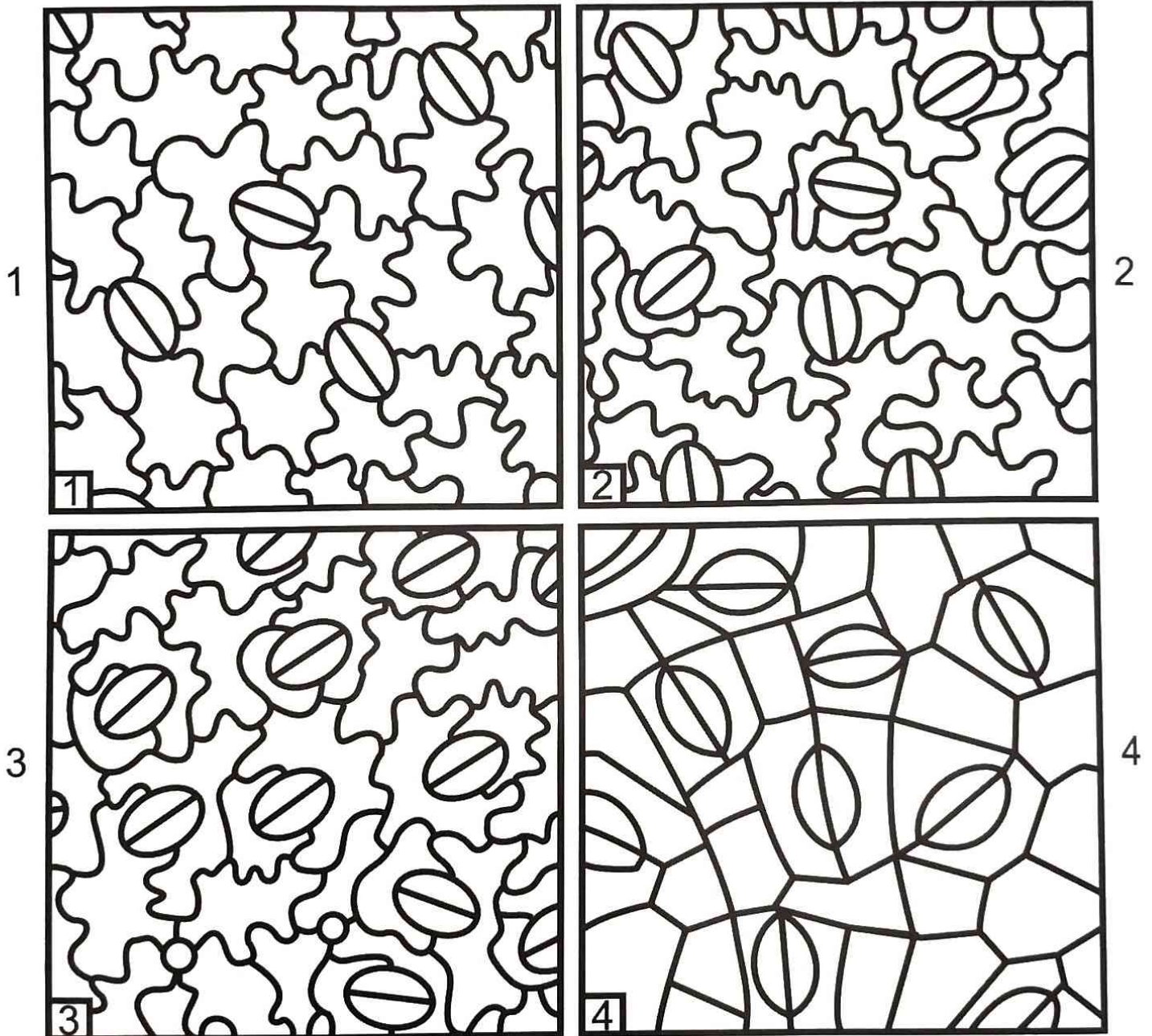
$$\text{Chỉ số lỗ khí} = \frac{100 \times S}{E + S}$$

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