



微乳提取液中聚氧乙烯(35)蓖麻油 GC 定量分析方法的建立

王艳静¹, 程怡¹, 欧则民¹, 张瑶², 严林¹, 仝燕¹, 王锦玉^{1*}, 刘德文^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301617)

[摘要] 随着微乳作为中药提取溶剂的不断探索,聚氧乙烯(35)蓖麻油(polyoxyethylene 35 castor oil, CrEL)作为常用的表面活性剂正在被相关科研工作者使用,然而微乳提取液中该表面活性剂残留的检测问题,极大地限制了微乳溶剂的进一步开发。该文依据 CrEL 中成分的化学结构和 2020 年版《中国药典》四部蓖麻油的含量测定方法,采用气相色谱法(gas chromatography, GC)和单因素试验优选 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的制备方法,验证分析两者的换算系数,并以最优的制样方法处理 3 批泽泻汤微乳提取液,测定其生成的蓖麻油酸甲酯含量,按照上述换算系数计算泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的含量。结果显示, CrEL 的最优制备方法为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH-甲醇溶液 10 mL, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流时间 15 min, 三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流时间 15 min, 正己烷萃取 2 次, CrEL 能稳定生成 20.84% 蓖麻油酸甲酯,按照该换算系数 3 批泽泻汤微乳提取液中 CrEL 质量浓度均值为 $11.94 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与微乳液配制时 CrEL 质量浓度 $11.57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 无显著性差异,表明该研究建立的含量测定方法准确度高,灵敏度和重复性良好,可用于泽泻汤微乳提取液的后续研究并为其其他含有 CrEL 的药物制剂的质量控制提供参考。

[关键词] 聚氧乙烯(35)蓖麻油; 蓖麻油酸甲酯; 含量测定; 微乳; 泽泻汤

Establishment of a quantitative method for GC analysis of polyoxyethylene (35) castor oil in microemulsion extracts

WANG Yan-jing¹, CHENG Yi¹, OU Ze-min¹, ZHANG Yao², YAN Lin¹, TONG Yan¹, WANG Jin-yu^{1*}, LIU De-wen^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

[Abstract] With the continuous exploration of microemulsions as solvents for traditional Chinese medicine extraction, polyoxyethylene (35) castor oil (CrEL), a commonly used surfactant, is being utilized by researchers. However, the problem of detecting residues of this surfactant in microemulsion extracts has greatly hampered the further development of microemulsion solvents. Based on the chemical structures of the components in CrEL and the content determination method of castor oil in the 2020 edition of the *Chinese Pharmacopoeia* (Vol. IV), this study employed gas chromatography (GC) and single-factor experiments to optimize the preparation method of methyl ricinoleate from CrEL. The conversion coefficient between the two was validated, and the optimal sample preparation method was used to process microemulsion extracts of Zexie Decoction from three batches. The content of methyl ricinoleate generated was determined, and the content of CrEL in the microemulsion extracts of Zexie Decoction was calculated using the above conversion coefficient. The results showed that the optimal preparation method for CrEL was determined. Specifically, 10 mL of $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH-methanol solution was heated at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min in a water bath. Subsequently, 10 mL of boron trifluoride etherate-methanol (1:3) solution was heated at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min in a water bath, followed by extraction with n-hexane twice. CrEL could stably produce

[收稿日期] 2023-06-14

[通信作者] * 王锦玉, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药新药研发及新剂型研究, E-mail: jinyu024@163.com; * 刘德文, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药新药研发及新剂型研究, E-mail: dwliu@icmm.ac.cn

[作者简介] 王艳静, 硕士研究生, E-mail: 17865135012@163.com



20.84% methyl ricinoleate. According to this conversion coefficient, the average mass concentration of CrEL in the three batches of Zexie Decoction microemulsion extracts was $11.94 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was not significantly different from the CrEL mass concentration of $11.57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ during microemulsion formulation, indicating that the established content determination method of this study was highly accurate, sensitive, and repeatable. It can be used for subsequent research on microemulsion extracts of Zexie Decoction and provide a reference for quality control of other drug formulations containing CrEL.

[Key words] polyoxyethylene (35) castor oil; methyl ricinoleate; content determination; microemulsion; Zexie Decoction

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230810.301

微乳(microemulsion, ME)是由油相、水相、表面活性剂和助表面活性剂在适当比例下形成的油水混合纳米系统,粒径在 $10 \sim 100 \text{ nm}$,外观澄清、黏度较低、热力学稳定,是理想的药物释放体系^[1-2]。近年来,已有学者利用微乳可溶解不同溶解性能药物成分的特性,将其作为提取溶剂应用于多种中药的提取,研究表明微乳可克服水对脂溶性成分提取率低的问题,可同时提取出中药中的脂溶性成分和水溶性成分,具有简化提取工艺,减少有机溶剂的使用和降低生产成本的优点,是一种理想的新型绿色提取溶剂^[3-5]。

聚氧乙烯(35)蓖麻油(polyoxyethylene 35 castor oil, CrEL)是由环氧乙烷(ethylene oxide)和甘油蓖麻酸酯(glyceryl monoricinoleate)以物质的量比 35:1 反应生成的一种烷基聚氧乙烯醚类非离子表面活性剂,热稳定性较好,是常用的药物制剂辅料^[6-7]。本课题组在探索微乳作为中药提取溶剂的可行性时发现,以 CrEL 为表面活性剂制备的微乳溶剂,能显著提高中医经典名方泽泻汤中有效成分的提取率,但提取液中 CrEL 的残留较多,极大地增加了微乳提取液后续制剂成型的难度和安全性,因此,本课题亟需建立 CrEL 的定量分析方法,为后期开发微乳提取液中有有效成分和 CrEL 的分离工艺提供数据支撑。

目前, CrEL 的定量分析方法有柱前衍生法、液相色谱/串联质谱法、比色法和滴定法等^[8],其中柱前衍生法和液质联用法虽然灵敏度较高,但仅能对 CrEL 中存在的单一蓖麻油酸酯类或聚乙二醇类化合物进行单独定量,评价 CrEL 的整体含量时不准确,且检测成本较高^[8-9],而比色法和滴定法虽能整体定量 CrEL,但在中药微乳提取液这样复杂的体系下,试验的专属性、灵敏度和可行性却不足^[10-11]。因此,本研究针对以上不足,以泽泻汤微乳提取液为例,依据 CrEL 中成分的化学结构并参考 2020 年版《中国药典》四部蓖麻油项下的含量测定方法,建立了新的 CrEL 定量检测方法,以期为微乳作为溶剂

应用于中药的提取提供有益参考。

1 材料

7890A 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司); BD125 型十万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 1011015 型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); JY2002 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); WB2000-D 型搅拌器(德国 WIGGENS 公司)。

对照品蓖麻油酸甲酯(批号 H2112152,纯度 $\geq 99\%$)购自阿拉丁试剂有限公司;正己烷(分析纯,北京迈瑞达科技有限公司);三氟化硼乙醚(分析纯,北京迈瑞达科技有限公司);氢氧化钾(KOH)(分析纯,天津市大茂试剂厂);氯化钠(分析纯,北京迈瑞达科技有限公司);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);油酸乙酯(药用辅料,英国禾大化学品公司,批号 0000881168);聚氧乙烯(35)蓖麻油(药用辅料,德国巴斯夫股份公司,批号 14026224UO)。

泽泻和白术饮片均购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经中国中医科学院中药研究所何希荣主任药师鉴定分别为泽泻科植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎,菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 空白微乳的制备^[12]

精密称量油酸乙酯 5.17 g, CrEL 29.06 g, 50%乙醇 10.76 g 于烧杯内,搅拌至透明,加入去离子水稀释至 200 mL,使用搅拌器以 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌至 30 min,将搅拌后的液体平均分为 3 份,加入去离子水依次稀释至 966、773、773 mL,分别作为第 1、2、3 次加热回流提取的溶剂。

2.2 泽泻汤微乳提取液的制备^[12]

根据本研究前期正交试验结果,称量泽泻 69 g、白术 27.6 g 置 2 000 mL 圆底烧瓶内,加入空白微乳

溶液,分别加热回流提取 1、0.5、0.5 h,合并提取液,放冷,即为泽泻汤微乳提取液。

2.3 色谱条件

采用 Rtx[®]-WAX 色谱柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm);检测器 FID,采用程序升温,起始温度 190 ℃,以 1 ℃·min⁻¹升至 240 ℃,保持 20 min;载气为高纯氮气,载气流量 1 mL·min⁻¹;检测器温度 250 ℃;进样口温度 220 ℃;进样量 1 μL;分流比 5:1。

2.4 对照品溶液的制备

精密称定蓖麻油酸甲酯适量于 10 mL 量瓶内,

使用正己烷定容,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.5 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的制备方法考察

CrEL 是一种复杂混合物,其疏水性化合物中蓖麻油酸酯类结构可与甲醇发生醇解反应生成蓖麻油酸甲酯,但参与反应的 KOH、甲醇和三氟化硼乙醚的用量及反应时间等均会影响蓖麻油酸甲酯的生成^[13-15],故采用单因素试验,以蓖麻油酸甲酯生成率为评价指标,优选蓖麻油酸甲酯的制备方法,实验流程见图 1。

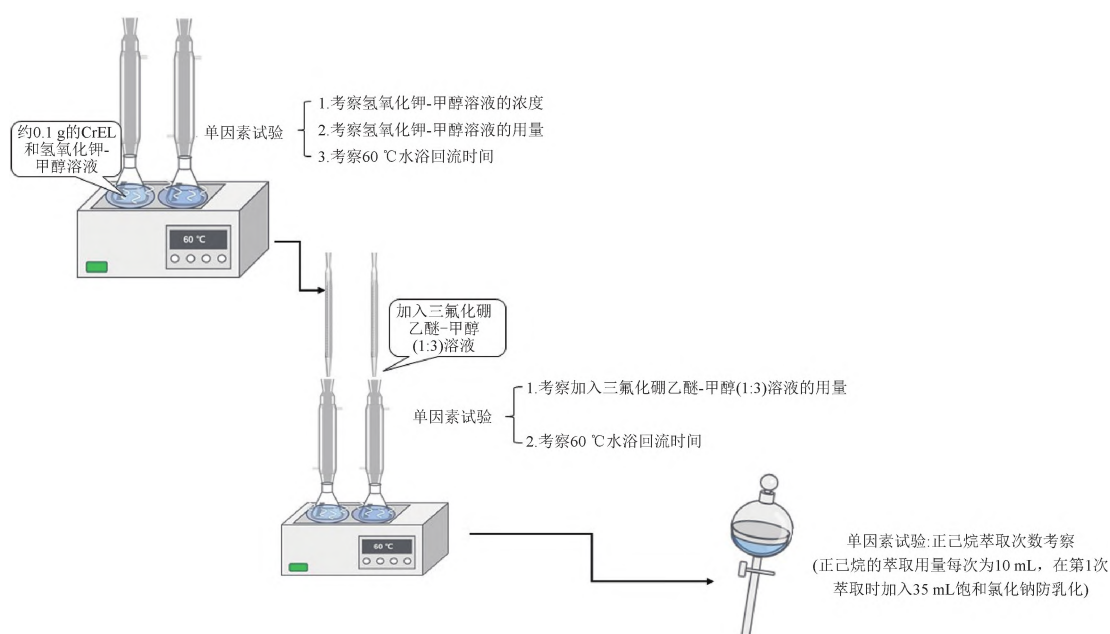


图1 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的制备方法考察流程

Fig. 1 Flow chart of the investigation of the preparation method of CrEL to generate methyl ricinoleate

2.5.1 KOH-甲醇溶液浓度 精密称定约 0.1 g 的 CrEL 于锥形瓶内若干份,分别精密加入浓度为 1.5、1.0、0.8、0.5、0.25 mol·L⁻¹ 的 KOH-甲醇溶液 5 mL,60 ℃ 水浴加热回流 30 min,沿冷凝管壁精密加入三氟化硼乙醚-甲醇溶液(1:3) 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 30 min,精密加入 10 mL 正己烷于锥形瓶内,振摇,冷却至室温,加入 10 mL 饱和氯化钠溶液于锥形瓶内,振摇,全部转移至分液漏斗内,分 3 次加入 10、10、5 mL 饱和氯化钠溶液洗涤锥形瓶,并转移至分液漏斗内,振摇,静置 15 min,取上清液适量于试管内,加入 2 g 无水硫酸钠脱水,振摇,精密量取上清液 1 mL 于 5 mL 量瓶内,使用正己烷定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,得 CrEL 供试品

溶液,平行制备 2 份,按 2.3 项下色谱条件进样,记录蓖麻油酸甲酯的峰面积,计算蓖麻油酸甲酯的生成率,结果见表 1。当 KOH-甲醇溶液浓度达到 1 mol·L⁻¹ 时,蓖麻油酸甲酯的生成量不再随着 KOH-甲醇溶液浓度的增大而增加,故 KOH-甲醇溶液浓度确定为 1 mol·L⁻¹。

2.5.2 KOH-甲醇溶液用量 按照 2.5.1 项下相同制样方法,考察 1 mol·L⁻¹ KOH-甲醇溶液 5、10、15 mL 对蓖麻油酸甲酯生成率的影响,结果见表 1,结果表明加入 5、10 mL 的 KOH-甲醇溶液生成的蓖麻油酸甲酯含量较高,且无显著性差异,15 mL 时生成率较低,考虑到实验后期的样品制备,确定 KOH-甲醇溶液用量为 10 mL。

表 1 单因素试验考察

Table 1 Investigation of single factor experiment

因素	水平	蓖麻油酸甲酯 生成率均值/%
KOH-甲醇溶液浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.25	17.20
	0.5	19.98
	0.8	20.98
	1	20.97
	1.5	21.33
KOH-甲醇溶液用量/mL	5	20.97
	10	20.85
	15	11.75
KOH-甲醇溶液水浴回流时间/min	15	19.55
	30	19.92
	60	19.71
三氟化硼乙醚-甲醇溶液体积用量/mL	5	2.31
	10	21.56
	15	20.22
	25	18.89
三氟化硼乙醚-甲醇溶液水浴回流时间/min	15	19.76
	30	19.98
	60	19.66
水浴回流总用时/min	15	21.17
	30	20.25
正己烷萃取次数/次	1	20.04
	2	21.72
	3	22.08
	4	22.14
	5	22.14

2.5.3 KOH-甲醇溶液的水浴回流时间 按照 2.5.1 项下相同制样方法,考察加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,分别 60 ℃ 水浴加热回流 15、30、60 min 对蓖麻油酸甲酯生成率的影响,结果见表 1,结果显示不同水浴回流时间对蓖麻油酸甲酯生成率无显著性差异,为确保 CrEL 充分甲酯化,KOH-甲醇溶液的水浴回流时间暂定为 30 min。

2.5.4 三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液用量 按照 2.5.1 项下相同制样方法,精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 30 min,考察三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 5、10、15、25 mL 对蓖麻油酸甲酯生成率的影响,结果见表 1,结果表明当三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液的体积用量为 10 mL 时,生成的蓖麻油酸甲酯含量最高,故三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液的用量确定为 10 mL。

2.5.5 三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液的水浴回流时间 按照 2.5.1 项下相同制样方法,精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 30 min,考察加入三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液

10 mL,分别 60 ℃ 水浴加热回流 15、30、60 min 对蓖麻油酸甲酯生成率的影响,结果见表 5,结果显示三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液水浴加热回流不同时间对生成蓖麻油酸甲酯含量无显著性影响。

2.5.6 水浴回流总用时考察 由于 KOH-甲醇和三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液水浴加热回流不同时间对生成蓖麻油酸甲酯无显著性影响,出于时间成本和反应充分性考虑,确定 KOH-甲醇和三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液水浴加热回流时间为 15、30 min 进行比较。

按照 2.5.1 项下相同制样方法,考察精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,分别 60 ℃ 水浴加热回流 15、30 min,沿冷凝管壁精密加入三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL,分别 60 ℃ 水浴加热回流 15、30 min 对蓖麻油酸甲酯生成率的影响,结果见表 1。结果显示水浴加热回流时间均为 15、30 min 对蓖麻油酸甲酯的生成量无显著性影响,故确定 2 种溶液的水浴加热回流时间均为 15 min。

2.5.7 正己烷萃取次数考察 按照 2.5.1 项下相同制样方法,精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 15 min,精密加入三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 15 min,分别使用正己烷 10 mL 连续萃取 1~5 次,每份萃取液均用正己烷定容至 50 mL 量瓶内,测定其蓖麻油酸甲酯的含量,考察不同萃取次数对蓖麻油酸甲酯得率的影响,结果见表 1,由结果可知萃取 2 次即可将蓖麻油酸甲酯萃取完全。

2.5.8 反应适用范围考察 精密称定约 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 g 的 CrEL 于锥形瓶内,按照 2.5.1 项下相同制样方法,精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 15 min,沿冷凝管壁精密加入三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL,60 ℃ 水浴加热回流 15 min,考察不同质量的 CrEL 对蓖麻油酸甲酯的生成率的影响,结果见表 2。

以 CrEL 的称样量(g)为横坐标,以蓖麻油酸甲酯峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2767X + 11.633$, $r = 0.9994$,表明 CrEL 在 0.02~0.50 g 与蓖麻油酸甲酯峰面积呈良好线性关系,本测定方法均可适用。

2.6 CrEL 生成蓖麻油油酸甲酯的验证试验

精密称取 CrEL 约 0.1 g,按照 2.5 项下优选结

表2 反应适应范围考察

Table 2 Investigation of reaction adaptation ranges

CrEL 称样量 /g	蓖麻油酸甲酯峰 面积	蓖麻油酸甲酯 生成率/%
0.023	82.62	24.65
0.056	155.05	21.58
0.104	288.18	20.65
0.208	607.79	21.72
0.517	1 437.10	20.31

果制备 CrEL 供试品溶液 6 份,按 2.3 项下色谱条件进样,记录蓖麻油酸甲酯的峰面积,计算 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的平均转化率。结果显示,6 份 CrEL 供试品溶液生成蓖麻油酸甲酯的转化率均值为 20.84%,RSD 为 2.6%,表明该制备方法重复性良好,稳定可行,按照该制样方法 CrEL 与蓖麻油酸甲酯的换算系数为 20.84%,可用于本研究泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的定量检测。

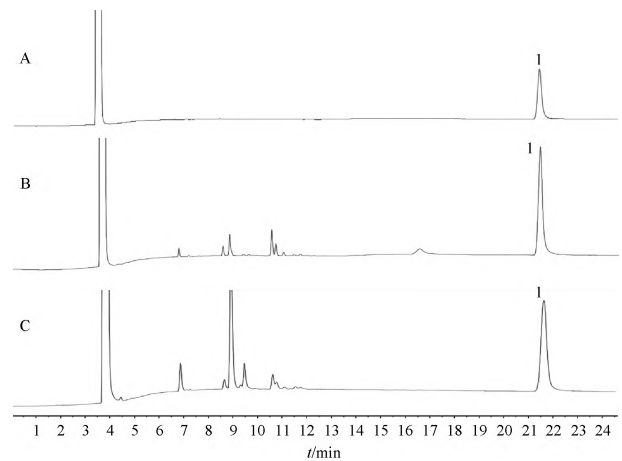
2.7 供试品溶液的制备

根据 2.5 项下考察结果,确定供试品溶液的制备方法:精密吸取泽泻汤微乳提取液 10 mL 于蒸发皿中,蒸干,使用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液 10 mL 溶解并全部转移至锥形瓶内,60 °C 水浴加热回流 15 min,沿冷凝管壁精密加入三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL,60 °C 水浴加热回流 15 min,精密加入 10 mL 正己烷于锥形瓶内,振摇,冷却至室温,加入 10 mL 饱和氯化钠溶液于锥形瓶内,振摇并全部转移至分液漏斗内,分 3 次加入 10、10、5 mL 饱和氯化钠溶液洗涤锥形瓶,转移至分液漏斗内,振摇,静置 15 min,取上清液转移至 50 mL 量瓶内,下层加入 10 mL 正己烷,振摇提取,取上清液转移至上述 50 mL 量瓶内,正己烷定容至刻度,摇匀,加入 2 g 无水硫酸钠脱水,摇匀,过 0.22 μm 滤膜,即得。

2.8 方法学验证

2.8.1 专属性 取对照品溶液、CrEL 供试品溶液和泽泻汤微乳提取液供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进样,记录色谱峰,GC 图见图 2。结果显示,被测成分峰形良好,无其他干扰,供试品溶液的蓖麻油酸甲酯的保留时间与对照品溶液基本相同,表明该方法的专属性良好。

2.8.2 线性关系 精密称定 34.13 mg 蓖麻油酸甲酯于 10 mL 量瓶内,正己烷溶解并定容,摇匀,作为对照品母液。精密吸取不同体积的对照品母液适量于量瓶内,正己烷稀释定容配制成质量浓度分别为



A. 蓖麻油酸甲酯对照品;B. CrEL 供试品溶液;C. 供试品溶液;1. 蓖麻油酸甲酯对照品溶液。

图2 专属性试验 GC 图

Fig. 2 GC chromatograms of specificity test

8.533、34.130、68.260、341.300、682.600、1 706.500、3 413.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蓖麻油酸甲酯对照品溶液,按照 2.3 项下色谱条件进样,记录蓖麻油酸甲酯的峰面积,以蓖麻油酸甲酯峰面积(Y)对蓖麻油酸甲酯的浓度(X)做线性回归,得回归方程 $Y = 764.02X - 2.9817$, $r = 1.0000$,表明蓖麻油酸甲酯在 8.533 ~ 3 413.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性关系良好。

2.8.3 检测限和定量限 将蓖麻油酸甲酯对照品溶液不断稀释,以峰面积为基线噪音 3 倍($S/N=3$)为检测限(limit of detection, LOD),峰面积为基线噪音 10 倍($S/N=10$)为定量限(limit of quantitation, LOQ),按 2.3 项下色谱条件进样,结果测得蓖麻油酸甲酯检测限为 3.413 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,定量限为 8.533 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.8.4 精密度考察 按照 2.3 项下的色谱条件,连续进样蓖麻油酸甲酯对照品溶液 6 次,蓖麻油酸甲酯峰面积的 RSD 为 2.5%,表明仪器的精密度良好。

2.8.5 稳定性考察 按照 2.7 项下优选方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、10、12 h 时按照 2.3 项下的色谱条件进样,结果表明,蓖麻油酸甲酯的峰面积的 RSD 为 1.8%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8.6 重复性考察 按照 2.7 项下优选方法制备供试品溶液 6 份,按照 2.3 项的色谱条件进样,记录各供试品溶液中蓖麻油酸甲酯的峰面积。结果显示,6 份供试品溶液中蓖麻油酸甲酯的平均质量浓度为 2.45 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,RSD 为 1.1%,重复性合格。

2.8.7 加样回收率考察 精密吸取已知含量的泽泻汤微乳提取液 5 mL 于蒸发皿中,蒸至全干,按照 2.7 项下方法制备供试品溶液,并在第 1 次萃取时加入近似等量的蓖麻油酸甲酯对照品于分液漏斗内,平行制备 6 份。按照 2.3 项的色谱条件测定蓖麻油酸甲酯的峰面积,结果见表 3。结果显示,蓖麻油酸甲酯的平均回收率为 99.49%,RSD 为 0.68%,均在规范范围,方法学验证合格。

表 3 蓖麻油酸甲酯加样回收率考察

Table 3 Investigation of the recovery of methyl ricinoleate spiked samples

对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
11.92	24.15	99.75	99.49	0.68
12.55	24.65	98.75		
12.41	24.66	99.90		
12.45	24.73	100.18		
12.38	24.62	99.82		
12.50	24.58	98.52		

注:样品中量为 12.26 mg。

2.9 3 批泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的含量测定

分别制备泽泻汤微乳提取液 3 批(S1~S3),按照 2.7 项下方法制备供试品溶液,2.3 项下色谱条件测定供试品溶液中蓖麻油酸甲酯含量,根据 2.6 项下 CrEL 能稳定生成 20.84%蓖麻油酸甲酯的换算系数,计算供试品溶液中 CrEL 的含量,结果见表 4。

表 4 3 批泽泻汤微乳提取液样品含量测定

Table 4 Determination of the content of three batches of samples of microemulsion extracts of Zexie Decoction

批号	蓖麻油酸甲酯/mg·mL ⁻¹	CrEL/mg·mL ⁻¹
微乳溶剂	—	11.57
S1	2.44	11.72
S2	2.53	12.15
S3	2.49	11.95

结果显示,3 批泽泻汤微乳提取液中 CrEL 质量浓度均值为 11.94 mg·mL⁻¹,与制备微乳溶剂时 CrEL 的质量浓度无显著性差异,RSD 为 2.4%,3 批验证合格,表明该方法定量准确,稳定性较好。

3 讨论

CrEL 是一种复杂混合物,无法直接定量,其疏水性成分约占混合物的 83%,主要是聚氧乙烯甘油单、二、三蓖麻酸酯(glycerol polyoxyethylene ricinoleate esters)、聚乙二醇蓖麻油酸酯(polyoxyethylene ricinoleate esters)和少量未反应的蓖麻油中的油酸、亚麻油酸及少量饱和脂肪酸,亲水性成分约占 17%,主要为聚乙二醇甘油醚(glycerol polyoxyethylene ether)、聚乙二醇(polyethyleneglycol)和游离的乙二醇^[6,8]。反应方程式见图 3,CrEL 疏水性部分中存在大量蓖麻油酸酯类结构(图 3 标红部分),可以在碱的催化下与甲醇发生醇解反应生成蓖麻油酸甲酯^[14-15]。

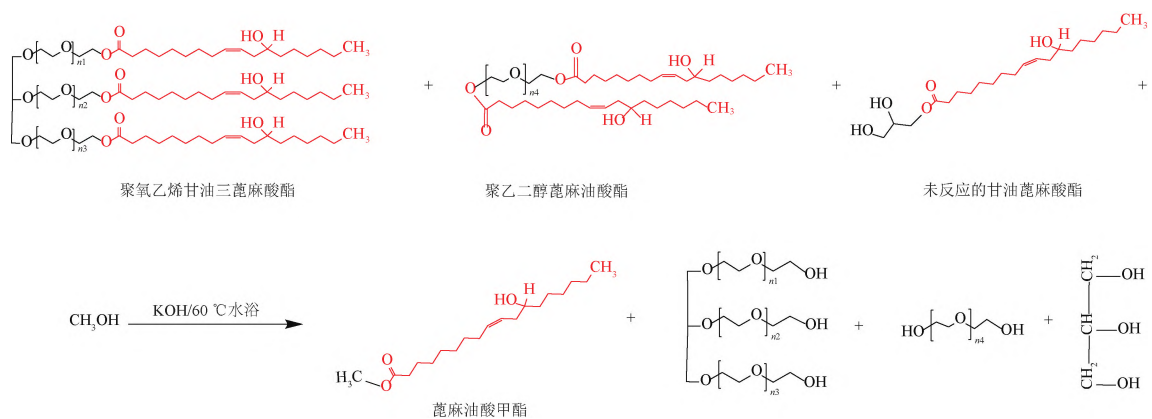


图 3 碱催化酯交换反应方程式

Fig. 3 Equation of base-catalyzed ester exchange reaction

KOH 只作为催化剂,不参与反应,但若反应中存在 0.3% 以上的水分或含有少量的脂肪酸时,将发生皂化反应,生成羧酸根离子,降低蓖麻油酸甲酯

的生成率^[13-14],可通过加入三氟化硼乙醚-甲醇溶液,将产生的羧酸根离子进一步甲酯化,生成蓖麻油酸甲酯^[16]。

本研究基于上述反应和 2020 年版《中国药典》四部蓖麻油的含量测定方法,首先以 CrEL 为研究对象,获得 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的最优制备方法及其两者的换算系数,然后以相同制样方法处理 3 批泽泻汤微乳提取液的蒸干样品,测定其生成的蓖麻油酸甲酯的含量,按照 CrEL 与蓖麻油酸甲酯的换算系数,实现泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的定量。结果表明,CrEL 生成蓖麻油酸甲酯的最优制备方法为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH-甲醇溶液 10 mL 并 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流时间 15 min,三氟化硼乙醚-甲醇(1:3)溶液 10 mL 并 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热回流时间 15 min,正己烷萃取 2 次,CrEL 能稳定生成 20.84% 蓖麻油酸甲酯,3 批泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的含量均值为 29.77 g,与 CrEL 的加入量 29.06 g 基本一致,故该方法对泽泻汤微乳提取液中 CrEL 的定量较为准确。

本实验在进行 KOH-甲醇溶液浓度考察时发现,蓖麻油酸甲酯的含量随 KOH-甲醇溶液浓度的增加而增加,鉴于 KOH 在甲醇中的溶解度有限,且 0.8 、 1 、 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH-甲醇溶液生成的蓖麻油酸甲酯含量无显著性差异,确定 KOH-甲醇溶液的浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;由于泽泻汤微乳提取液中含有大量的水分,对 CrEL 生成蓖麻油酸甲酯和正己烷的萃取环境影响较大,故对泽泻汤微乳提取液进行蒸干、蒸干加 2 g 硅胶和蒸干并 $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘 2 h 的前处理考察,结果显示 3 种方式的蓖麻油酸甲酯生成率无显著差异,确定泽泻汤微乳提取液的前处理方式为蒸干。

综上,本研究建立的 CrEL 定量方法重复性好、准确度高,能对泽泻汤微乳提取液中的 CrEL 进行定量,为后期微乳提取液中有效成分和 CrEL 的分离提供数据支撑。CrEL 常作为难溶性药物的增溶剂和乳化剂,用量较大,是制剂产生不良反应的重要原因^[17],本研究建立的 CrEL 检测方法可以对制剂中 CrEL 进行定量,从产品的质量出发提高其临床应用的安全性,并可为微乳作为提取溶剂的可行性分析提供检测方法。

[参考文献]

[1] 王金铃,孙进,何仲贵. 微乳及其在药学中应用[J]. 中国药理学杂志, 2009, 7(4): 356.

- [2] PAUL B K, MOULIK S P. Microemulsions; an overview[J]. J Dispersion Sci Technol, 1997, 18(4): 301.
- [3] 樊红波. O/W 型微乳液在葛根提取中的应用研究[D]. 长春:吉林大学, 2015.
- [4] 易红,孙立亚,高进,等. O/W 型微乳用于厚朴提取的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 1.
- [5] 杨华,邓茂,易红. O/W 型微乳用于提取中药丹参的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2617.
- [6] 李婷,王珏,袁铭,等. 聚氧乙烯 35 蓖麻油的 UPCC-Q-TOF-MS 成分分析与安全性初探[J]. 药学报, 2020, 55(11): 2688.
- [7] 高鹏,涂家生. 聚氧乙烯蓖麻油及其安全性研究进展[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(1): 59.
- [8] BHASKAR V V, MIDDHA A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative of cremophor EL and its applications[J]. Int J Anal Chem, 2013, 2013(135613): 11.
- [9] SPARREBOOM A, TELLINGEN O V, HUIZING M T, et al. Determination of polyoxyethyleneglycerol triricinoleate 35(cremophor EL) in plasma by pre-column derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1996, 681(2): 355.
- [10] KUNKEL M, MEYER T, BOHLER J, et al. Titrimetric determination of Cremophor® EL in aqueous solutions and biofluids part 2: ruggedness of the method with respect to biofluids[J]. J Pharmaceut Biomed, 1999, 21(5): 911.
- [11] SPARREBOOM A, LOOS W J, VERWEIJ J, et al. Quantitation of cremophor EL in human plasma samples using a colorimetric dye-binding microassay[J]. Anal Biochem, 1998, 255(2): 171.
- [12] 王艳静,欧则民,严林,等. 微乳对泽泻汤提取液不同相态中指标成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, doi: 10.13422/j.cnki.syfx.20230567.
- [13] 张可欣. 洞庭湖鱼组织中脂肪酸、有机氯农药和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的相关性研究[D]. 石家庄:河北师范大学, 2019.
- [14] 谷孝东. 蓖麻生物柴油制备工艺及其排放特性研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2012.
- [15] 李修冒. 蓖麻油制备 10-十一烯酸的工艺改进研究[D]. 太原:中北大学, 2016.
- [16] 侯冉,郭月英,张敏,等. 丁酸梭菌对小尾寒羊生长性能、肉品质、血清生化指标、肌肉脂肪酸组成及脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2023, 35(1): 391.
- [17] WEISS R B, DONEHOWER R C, WIERNIK P H, et al. Hypersensitivity reactions from taxol[J]. J Clin Oncol, 1990, 8(7): 1263.

[责任编辑 孔晶晶]