

## 生乳汤回流提取工艺优化

李兰兰, 虎亚光, 贾新焯, 张睿, 谭建伟\*  
(甘肃省妇幼保健院药学部, 甘肃兰州 730050)

**摘要:** 目的 优化生乳汤回流提取工艺。方法 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间为影响因素, 阿魏酸、芍药苷含量及浸膏得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化回流提取工艺。结果 最佳条件为乙醇体积分数 58%, 料液比 1:14, 提取次数 2 次, 每次 90 min, 阿魏酸、芍药苷含量及浸膏得率分别为 22.31 mg、291.69 mg、30.54%。结论 该方法稳定可行, 可用于醇提生乳汤。

**关键词:** 生乳汤; 回流提取工艺; Box-Behnken 响应面法

**中图分类号:** R284.2

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)09-2962-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.039

母乳喂养对母婴健康都有重要意义, 我国《中国儿童发展纲要(2011—2020年)》和《国民营养计划(2017—2030)》<sup>[1-2]</sup> 都明确提出, 到2020年0~6个月婴儿纯母乳喂养率达到50%以上目标。但《中国母乳喂养影响因素调查报告(2019年)》显示, 我国6个月内婴儿纯母乳喂养率仅为29.2%, 远低于43%的世界平均水平<sup>[3]</sup>。

泌乳量不足是导致纯母乳喂养失败的主要原因之一<sup>[4]</sup>, 发病率约为20%~30%<sup>[5-6]</sup>。中医认为, 气血郁闭和气血亏虚是产后缺乳的主要病因病机<sup>[5,7]</sup>。生乳汤以传统验方为基础, 根据中医对产后缺乳的主要分型、治疗产后缺乳的基本用药配伍规律组方, 由当归、川芎、芍药等药材组成, 在临床应用中呈现出较好的催乳效果。本实验采用 Box-Behnken 响应面法优化生乳汤回流提取工艺, 以期为该方进一步开发提供依据。

### 1 材料

1.1 仪器 UltiMate 3000 高效液相色谱仪 [赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; SQP 型电子分析天平 [十万分之一, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; TWCL-T 型调温磁力搅拌器 (海科儀器设备有限公司)。

1.2 试剂与药物 当归 (甘肃和润医药集团有限公司, 批号 201101A); 川芎 (兰州安泰堂中药饮片有限公司, 批号 20072101); 炒白芍 (甘肃康乐药业有限责任公司, 批号 200310); 柴胡 (甘肃和润医药集团有限公司, 批号 200903), 经专家鉴定为正品。阿魏酸 (批号 D1804017, 纯度 ≥ 99.5%)、芍药苷 (批号 D1728076, 纯度 ≥ 98%) 对照品均购于阿拉丁试剂 (上海) 有限公司。乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司); 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 阿魏酸、芍药苷含量测定

2.1.1 色谱条件 AccuCore aQ C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.6 μm); 流动相乙腈-0.05 mol/L 磷酸 (16:84); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 232 nm; 进样量 10 μL。

#### 2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 对照品溶液 精密称取阿魏酸、芍药苷对照品适量, 甲醇溶解, 即得 (两者质量浓度分别为 136.67、640 μg/mL)。

2.1.2.2 供试品溶液 按照处方比例称取药材, 加 10 倍量 80% 乙醇浸泡 30 min, 回流提取 1 h, 提取液冷却至室温, 取 200 μL, 水浴挥干, 加 1 mL 甲醇溶解残渣, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.1.2.3 阴性样品溶液 按处方量称取缺当归和川芎、缺炒白芍的药材, 制成阴性样品, 按“2.1.2.2”项下方法制备, 即得。

2.1.3 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由此可知, 该方法专属性良好, 阴性无干扰。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下对照品溶液, 稀释成阿魏酸 (芍药苷) 质量浓度分别为 91.11 (426.67)、45.55 (213.33)、22.78 (106.67)、12.42 (58.18)、4.14 (19.39)、1.77 (8.31) μg/mL, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y) 进行回归, 得阿魏酸、芍药苷方程分别为  $Y = 0.511X + 0.478$  ( $R^2 = 0.9993$ )、 $Y = 0.2203X + 1.8241$  ( $R^2 = 0.9990$ ), 分别在 91.11~1.77、426.67~8.31 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得阿魏酸、芍

收稿日期: 2021-02-19

基金项目: 甘肃省中医药管理局项目 (GZK-2019-55)

作者简介: 李兰兰 (1985—), 女, 硕士生, 主管药师, 研究方向为临床药学。Tel: (0931) 5188930, E-mail: lichongyan2000@163.com

\*通信作者: 谭建伟 (1969—), 男, 副主任药师, 研究方向为中药学。Tel: (0931) 5188816, E-mail: 1007262311@qq.com

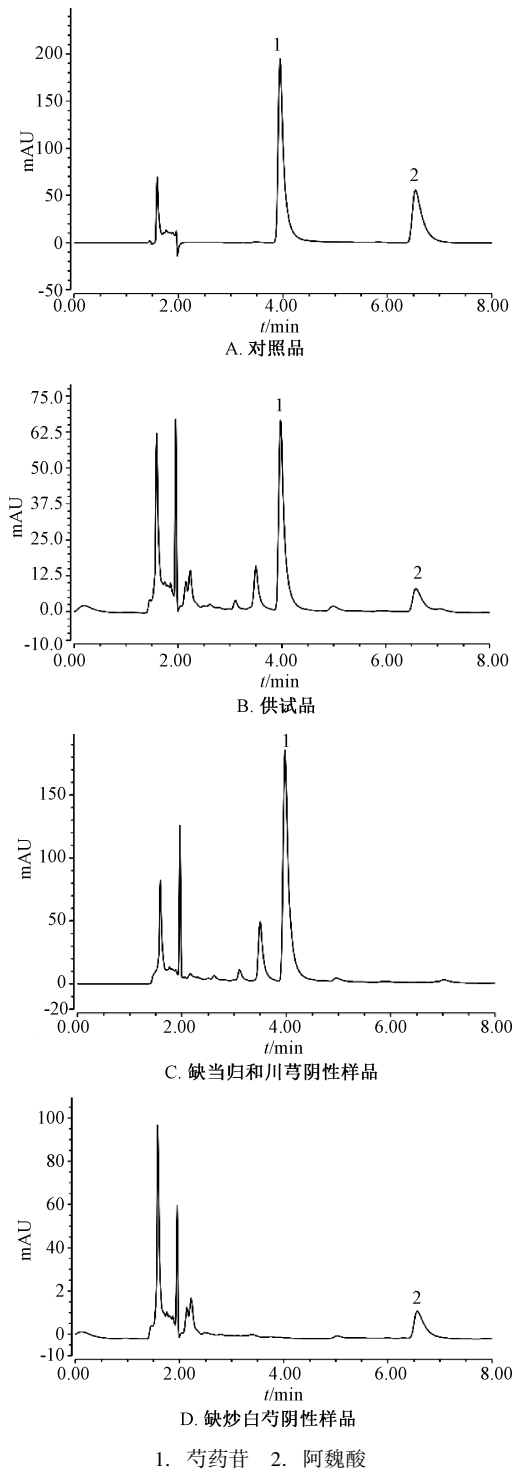


图1 各成分HPLC色谱图

药苷峰面积RSD分别为0.36%、0.19%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批提取液6份，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得阿魏酸、芍药苷含量RSD分别为2.18%、3.78%，表明该方法重复性较好。

2.1.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液，于0、2、4、8 h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得阿魏酸、芍

药苷峰面积RSD分别为0.36%、0.87%，表明溶液在8 h内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取同一份各成分含量已知的提取液6份（阿魏酸10.791 μg/mL、芍药苷169.83 μg/mL），分别加入80%、100%、120%水平对照品溶液，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，阿魏酸、芍药苷平均加样回收率分别为97.34%、98.01%，RSD分别为4.07%、2.58%。

2.2 浸膏得率测定 在恒重器皿中加入提取液40 mL，置于95℃烘箱中烘干，移至干燥器中冷却至室温，立即称定质量，计算浸膏得率，公式为得率=[(提取液中浸膏量×提取液总体积)/(处方药材总量×40)]×100%。

### 2.3 单因素试验

2.3.1 料液比 按处方比例称取药材5份，80%乙醇分别按1:6、1:8、1:10、1:12、1:14料液比回流提取60 min，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。结果，料液比为1:14时阿魏酸含量最高，故选择1:12~1:20作进一步优化。

2.3.2 乙醇体积分数 按处方比例称取药材5份，分别用50%、60%、70%、80%、90%乙醇按1:10料液比回流提取60 min，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。结果，乙醇体积分数为70%时阿魏酸含量最高，故选择50%~90%作进一步优化。

2.3.3 提取时间 按处方比例称取药材5份，80%乙醇按1:10料液比分别回流提取30、60、90、120、150 min，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。结果，提取时间为60 min时阿魏酸含量最高，故选择30~90 min作进一步优化。

2.3.4 提取次数 按处方比例称取药材3份，80%乙醇按1:10料液比分别回流提取1、2、3次，每次60 min，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。结果，提取次数为2次时阿魏酸含量最高，故选择2次，并不再进行优化。

2.4 Box-behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选择乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)作为影响因素，固定提取次数为2次，阿魏酸( $Y_1$ )、芍药苷( $Y_2$ )含量及浸膏得率( $Y_3$ )作为评价指标，设计三因素三水平试验，因素水平见表1，结果见表2。

表1 因素水平

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 料液比	C 提取时间/min
-1	50	1:12	30
0	70	1:16	60
1	90	1:20	90

采用 Design-Expert 11.0 软件对表2数据进行多元二次回归拟合，得方程分别为  $Y_1 = -27.29244 + 0.90435A + 1.10262B + 0.390425C - 0.008356A^2 - 0.043734B^2 -$

表2 试验设计与结果

试验号	A 乙醇/%	B 料液比	C 提取时间/min	Y <sub>1</sub> 阿魏酸/mg	Y <sub>2</sub> 芍药苷/mg	Y <sub>3</sub> 浸膏得率/%
1	50	1:20	60	19.41	228.33	30.15
2	90	1:16	90	10.59	243.11	18.21
3	50	1:16	30	14.19	131.47	26.23
4	70	1:20	30	7.54	133.61	22.58
5	70	1:12	30	11.9	177.39	17.09
6	70	1:16	60	16.94	266.63	26.66
7	70	1:12	90	23.13	287.19	27.76
8	50	1:16	90	21.42	267.05	29.14
9	50	1:12	60	18.59	179.15	28.14
10	70	1:20	90	18.15	292.64	30.17
11	90	1:12	60	8.79	166.44	14.45
12	70	1:16	60	18.47	247.08	26.34
13	70	1:16	60	19.37	241.14	28.43
14	90	1:20	60	7.81	161.58	17.59
15	70	1:16	60	16.63	268.49	26.99
16	90	1:16	30	3.95	76.45	12.62
17	70	1:16	60	17.05	261.16	26.23

0.002 014C<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0.948 9, 信噪比 19.260 9)、Y<sub>2</sub> = -1 036.293 1 + 22.049 06A + 41.845 94B + 4.949 29C - 0.168 875AB - 0.145 266A<sup>2</sup> - 0.932 422B<sup>2</sup> - 0.021 415C<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0.962 5, 信噪比 18.309 7)、Y<sub>3</sub> = -27.254 06 + 0.942 125A + 1.905 31B + 0.349C - 0.008 997A<sup>2</sup> - 0.046 797B<sup>2</sup> - 0.001 979C<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0.960 6, 信噪比 20.914 4), 方差分析分别见表 3~5, 可知模型具有高度显著性, 数据无异常点。

表3 阿魏酸含量方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	463.99	6	77.33	30.92	<0.000 1
A	225.46	1	225.46	90.16	<0.000 1
B	11.28	1	11.28	4.51	0.059 6
C	159.40	1	159.40	63.74	<0.000 1
A <sup>2</sup>	47.03	1	47.03	18.81	0.001 5
B <sup>2</sup>	2.06	1	2.06	0.824 4	0.385 2
C <sup>2</sup>	13.83	1	13.83	5.53	0.040 5
残差	25.01	10	2.50	—	—
失拟项	18.67	6	3.25	2.35	0.213 8
误差	5.53	4	1.38	—	—
总差	488.99	16	—	—	—

表4 芍药苷含量方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	62 522.81	7	8 931.83	33.04	<0.000 1
A	3 137.11	1	3 137.11	11.61	0.007 8
B	4.49	1	4.49	0.016 6	0.900 3
C	40 765.12	1	40 765.12	150.81	<0.000 1
AB	730.08	1	730.08	2.70	0.134 7
A <sup>2</sup>	14 216.15	1	14 216.15	52.59	<0.000 1
B <sup>2</sup>	937.13	1	937.13	3.47	0.095 5
C <sup>2</sup>	1 564.12	1	1 564.12	5.79	0.039 5
残差	2 432.79	9	270.31	—	—
失拟项	1 840.83	5	368.17	2.49	0.199 0
误差	591.96	4	147.99	—	—
总差	64 955.60	16	—	—	—

表5 浸膏得率方差分析

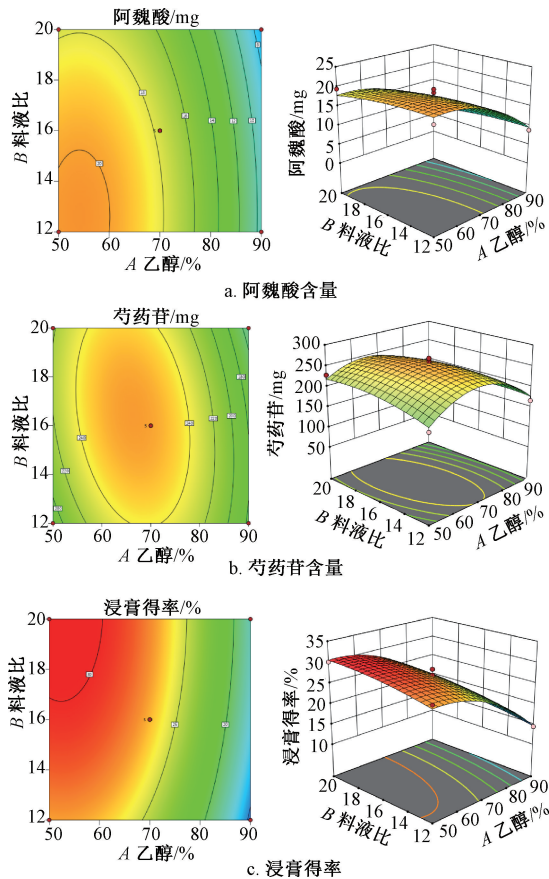
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	508.83	6	84.80	40.64	<0.000 1
A	322.45	1	322.45	154.51	<0.000 1
B	21.29	1	21.29	10.20	0.009 6
C	89.51	1	89.51	42.89	<0.000 1
A <sup>2</sup>	54.53	1	54.53	26.13	0.000 5
B <sup>2</sup>	2.36	1	2.36	1.13	0.312 5
C <sup>2</sup>	13.36	1	13.36	6.40	0.029 9
残差	20.87	10	2.09	—	—
失拟项	17.70	6	2.95	3.73	0.111 7
误差	3.16	4	0.791 1	—	—
总差	529.710	16	—	—	—

响应面分析见图 2, 可知固定提取时间时, 阿魏酸含量随着乙醇体积分数、料液比增加逐渐降低, 芍药苷含量随乙醇体积分数、料液比增加先升后降, 浸膏得率随着乙醇体积分数、料液比增加逐渐降低。

2.5 验证试验 最优工艺为乙醇体积分数 57.79%, 料液比 1:14.248, 提取次数 2 次, 每次 90 min, 阿魏酸、芍药苷含量及浸膏得率分别为 22.725 mg、292.64 mg、30.17%, 考虑到实际操作可行性, 将其修正为乙醇体积分数 58%, 料液比 1:14, 提取次数 2 次, 每次 90 min。按照上述优化工艺进行 3 批验证试验, 测得阿魏酸、芍药苷含量及浸膏得率分别为 22.31 mg、291.69 mg、30.54%, RSD 分别为 1.89%、1.25%、1.13%, 与预测值 22.725 mg、292.64 mg、30.17% 接近 (偏差分别为 1.31%、0.22%、0.86%), 表明该模型合理, 工艺稳定。

### 3 讨论

3.1 色谱条件优化 阿魏酸在 217、235、322 nm 波长处有紫外吸收峰<sup>[8]</sup>, 其中 322 nm 处吸收最强, 而芍药苷在 192、232 nm 波长处有紫外吸收峰<sup>[9]</sup>, 为了保证能同时测定 2 种成分含量, 故选择 232 nm 作为检测波长。再考察流动相甲醇-水、乙腈-水的分离效果, 发现后者洗脱时分离度较好,



注：左图为等高线图，右图为三维曲面图。

图2 乙醇体积分数、料液比对各评价指标影响的响应面图

但色谱峰有拖尾现象，由于阿魏酸是有机酸，易电离<sup>[10]</sup>，故加入磷酸以改善峰形，发现乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液（16：84）分离情况理想。

3.2 评价指标确定 当归、川芎中均含有阿魏酸，是从当归中最早分离出的有机酸<sup>[11-13]</sup>，也是2015年版《中国药典》<sup>[14]</sup> 2种药材质量控制的指标成分；白芍具有养血、抗炎、镇痛等药理作用，单萜糖苷类化合物白芍总苷是该药材主要活性物质，其中芍药苷含量最高，约达3%<sup>[15-16]</sup>，故本实验选择阿魏酸、芍药苷作为指标。另外，浸膏得率是评价提取工艺的重要指标之一，与后期制剂的生产成本和疗效密切相关，故本实验也选择其作为指标。

#### 4 结论

本实验采用 Box-behnken 响应面法优化生乳汤回流提取

工艺，该方法稳定可靠，可用于该方后续剂型的研究。

#### 参考文献：

- [1] 国务院妇女儿童工作委员会. 中国儿童发展纲要（2011-2020年）[R]. 2011.
- [2] 国务院. 国民营养计划（2017—2030）[R]. 2017.
- [3] United Nations International Children's Emergency Fund. From the first hour of life: Making the case for improved infant and young child feeding everywhere[R]. 2016.
- [4] 许娟, 马丽灵. 催乳汤口服配合少泽穴揉按治疗产后缺乳60例疗效观察[J]. 贵阳中医学院学报, 2017, 39(1): 79-81; 85.
- [5] 康晨, 宋幸幸, 田会玲, 等. 基于知识发现的催乳方剂及中药配伍规律挖掘[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2015, 39(1): 12-15.
- [6] 郑燕, 谢萍, 郑静, 等. 产后缺乳的中医病因病机与治疗[J]. 中药与临床, 2013, 4(1): 44-46.
- [7] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 297-300.
- [8] 潘娉娉, 骆嫄, 章建华, 等. HPLC法同时测定杜仲-当归药对中5种成分[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1777-1781.
- [9] 谢丽君, 蔡建红, 钱丽, 等. RP-HPLC法检测丹桂香颗粒中芍药苷、丹皮酚和丹参酮II A的含量[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(3): 353-355.
- [10] 杨芩, 宋金春, 曾俊芬, 等. 复方当归汤中阿魏酸在兔体内的药动学研究[J]. 中国药师, 2007, 10(2): 105-107.
- [11] 林茂, 朱朝德, 孙庆民, 等. 当归化学成分的研究[J]. 药学学报, 1979, 14(9): 529-534.
- [12] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [13] 张晓娟, 张燕丽, 左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(6): 128-133.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [15] 吴玲芳, 王晓晴, 陈香茗, 等. 白芍化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(3): 175-187.
- [16] 张利. 白芍的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2014, 6(29): 25-26.