苁蓉枣仁乌梅饮料制备工艺优化及改善睡眠作用评价

张正旭[1]，夏校[1]，石欣宜[1]，孙安[1]，张治峰[2]，陶永佳[2]，彭颖[1*]，李晓波[1*]

（1.上海交通大学药学院，上海 200240）（2.内蒙古曼德拉生物科技有限公司，内蒙古阿拉善盟 750300）

摘要：为了优化苁蓉枣仁乌梅饮料（肉苁蓉、酸枣仁和乌梅）提取物制备工艺并评价其改善睡眠作用，建立同时测定松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素、枸橼酸 HPLC 检测方法，以 4 种化合物和多糖含量为评价指标，通过正交实验优化其制备工艺并进行验证和放大；采用直接睡眠试验、旷场试验、巴比妥钠阈下剂量睡眠试验和巴比妥钠睡眠潜伏期试验，考察其对小鼠睡眠的改善作用。结果表明，提取物最佳提取条件为，提取温度 100 ℃、料液比 1:12（g mL^{-1}）、提取时间 2 h。连续给药 30 d，该提取物对小鼠无直接睡眠作用，但可减轻小鼠在旷场试验中的焦虑感，具有一定的镇静效果；此外，其可增强阈下剂量巴比妥钠诱导的小鼠睡眠作用（低、中、高剂量组小鼠入睡率分别为 33.33%、41.67%和 50.00%），缩短巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期（低、中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期分别为 22.77、22.18 和 14.93 min）。该研究优化苁蓉枣仁乌梅饮料提取物制备工艺并证明其具有改善睡眠作用，为肉苁蓉改善睡眠系列产品的开发提供科学依据。

关键词：肉苁蓉；酸枣仁；乌梅；正交实验；指标性成分；检测方法；改善睡眠

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.9.0872

Optimization of Extraction Process for Congrong Zaoren Wumei Beverage Extract and Evaluation of Its Sleep-Improving Effects

ZHANG Zhengxu[1], XIA xiao[1], SHI Xinyi[1], SUN An[1], ZHANG Zhifeng[2], TAO Yongjia[2], PENG Ying[1*], LI Xiaobo[1*]

(1.School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2.Inner Mongolia Mandela Biotechnology Co. Ltd., Alxa Left Banner 750300, China)

Abstract: To optimize the extraction process of Congrong Zaoren Wumei Beverage (composed of *Cistanche deserticola*, *Ziziphi Spinosae Semen*, and Mume Fructus) and evaluate its sleep-improving effects, an HPLC method for the simultaneous determination of echinacoside, verbascoside, spinosin and citric acid was established. Using the content of these four compounds and polysaccharides as evaluation criteria, the extraction process for the Congrong Zaoren Wumei Beverage (composed of *Cistanche deserticola*, *Ziziphi Spinosae Semen*, and Mume Fructus) was optimized through orthogonal experiments, followed by validation and scale-up trials. The sleep-improving effects of the extract were investigated in mice using direct sleep tests, open-field tests, subthreshold dose sodium pentobarbital sleep tests, and sodium pentobarbital sleep latency tests. The results demonstrated that the optimal extraction conditions for the Congrong Zaoren Wumei Beverage extract were an extraction temperature of 100 ℃, a solid-to-liquid ratio of 1:12 (g mL^{-1}), and an extraction time of 2 hours. It was found that continuous administration of the extract for 30 days did not induce direct sleep effects in mice but significantly alleviated anxiety in the open-field test, indicating a certain sedative effect. The extract enhanced the sleep-inducing effects of sub-threshold doses of sodium pentobarbital (sleep rates for low, medium, and high doses were 33.33%, 41.67%, and 50.00%, respectively) and significantly shortened the sleep latency induced by sodium pentobarbital (sleep latencies for low, medium, and high doses were 22.77, 22.18, and 14.93 minutes, respectively). This study optimized the extraction process for Congrong Zaoren Wumei Beverage and demonstrated its sleep-improving effects, providing a scientific foundation for developing sleep-enhancing products derived from *Cistanche deserticola*.

Key words: *Cistanche deserticola*; *Ziziphi Spinosae Semen*; Mume Fructus; orthogonal experiments; marker components; analytical

收稿日期：2025-06-24；修回日期：2025-09-12；接受日期：2025-09-17

基金项目：内蒙古自治区科技成果转化专项资金项目（2021CG0028）

作者简介：张正旭（1998-），女，硕士研究生，研究方向：功能性食品开发，E-mail：zzx19980102@126.com

通讯作者：李晓波（1963-），女，博士，教授，研究方向：中草药与功能食品，E-mail：xbli@sjtu.edu.cn；共同通讯作者：彭颖（1979-），女，博士，助理研究员，研究方向：药食同源中药食品开发，E-mail：ypeng@sjtu.edu.cn

methods; sleep improvement

睡眠是保障人们正常生活和学习的重要活动之一，良好的睡眠有助于消除疲劳，增强免疫力[1,2]。然而，随着社会的发展和压力的不断增加，失眠已成为困扰许多人工作和生活的难题[3]。2024 年中国居民睡眠健康白皮书显示，国人普遍面临睡眠时长不足和睡眠障碍的问题，平均睡眠时长仅为 6.75 h，超过四分之一的人群夜间睡眠时间不足 6 h，反映出睡眠质量的隐忧。因此，提高睡眠质量和改善失眠的功能性食品研究显得尤为迫切。传统中药因其副作用小且在我国已有数千年历史，被广泛用于改善睡眠，如酸枣仁汤、归脾汤等。随着“药食同源”理念的普及，从传统药食中药中开发改善睡眠的功能性食品的研究愈发受到关注。

肉苁蓉为列当科植物荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C.Ma 或管花肉苁蓉 *C. tubulosa*（Schenk）Wight 的干燥带磷叶的肉质茎，用于肾阳不足、精血亏虚、阳痿不孕等症[4]。现代药理学研究表明，肉苁蓉具有增强免疫力、抗疲劳、抗肿瘤、神经保护、抗衰老、抗骨质疏松、保肝、降血糖等多种药理活性[5,6]。研究证实，肉苁蓉总苷可通过调控突触相关标志物的表达影响突触可塑性，从而改善睡眠剥夺模型大鼠学习认知功能[7]。荒漠肉苁蓉于 2019 年底被列入药食同源目录，相关生产经营试点工作正在内蒙古、甘肃等地开展，被用于一般食品和增加免疫力、缓解体力疲劳等保健食品。基于中医“肾脑相关”理论，肉苁蓉在神经系统疾病中表现出广泛的应用价值，其在改善睡眠类保健品开发中具有广阔前景。苯乙醇苷类成分是肉苁蓉中最主要的功效成分，主要包括松果菊苷、毛蕊花糖苷等[8]。酸枣仁（*Ziziphus jujuba* Mill.）为鼠李科枣属植物酸枣的干燥种子，主要活性成分包括皂苷、三萜类化合物、黄酮类化合物等，具有宁心安神、提高免疫力、养肝、镇静催眠的作用[9]，被称为“东方睡果”。酸枣仁富含多种改善睡眠活性成分[10]，酸枣仁总皂苷及生物碱能够调节大脑皮质及海马中谷氨酸、氨基丁酸（GABA）以及 5-羟色胺（5-HT）含量；黄酮类物质可与 γ-GABA 受体/苯二氮䓬类受体结合，调节 GABA 的含量，从而发挥镇静催眠作用。其中，酸枣仁活性成分斯皮诺素可以通过调节 5-HT 进而降低去甲肾上腺素含量，起到镇静催眠功效[11,12]。乌梅是由蔷薇科植物梅（*Prunus mume*（Sieb.）Sieb.et Zucc.）的干燥近成熟果实经低温烘干焖黑而成，是中国常见的药食同源中药。乌梅枣仁汤[13]、乌梅丸[14]在临床上广泛用于失眠和睡眠障碍患者的治疗。乌梅含有大量有机酸，其中枸橼酸是其中的主要成分和药典中的指标性成分[15]。此外，肉苁蓉、酸枣仁和乌梅均含有大量多糖类成分。研究表明，多糖类成分通过多种机制改善睡眠，展现出广阔的应用前景，在改善睡眠方面的研究逐渐成为热点。然而，目前关于以肉苁蓉、酸枣仁、乌梅为主要成分的产品在改善睡眠方面的研究尚未见报道。

本研究建立同时测定松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素、枸橼酸的 HPLC 检测方法，以肉苁蓉、酸枣仁、乌梅组成的苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中 4 种化合物及多糖的含量为评价指标，通过正交实验优化其制备工艺并进行验证和放大实验。依据《保健食品功能检验与评价方法（2022 年版）（征求意见稿）》，通过动物实验对肉苁蓉提取物的睡眠改善效果进行了评估，旨在为肉苁蓉改善睡眠系列产品的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肉苁蓉，内蒙古曼德拉生物科技有限公司；酸枣仁、乌梅，四川新荷花中药饮片有限公司；枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素，成都乐美天医药科技有限公司；葡萄糖，上海源叶生物科技有限公司；艾司唑仑片，上海上药信谊药厂有限公司；巴比妥钠，上海上药信谊药厂有限公司；生理盐水，德州京新药业有限公司。

1.2 仪器

HWS-24 电热恒温水浴锅，上海一恒科学仪器有限公司；DW 调温电热器，上海垒固仪器有限公司；1200 安捷伦高效液相色谱仪，美国安捷伦科技公司；STARTER 3100 奥豪斯 pH 计，美国奥豪斯仪器公司；71-5804 离心机，湖南赫西仪器装备有限公司；ThermoVarioskan LUX 酶标仪，美国赛默飞世尔公司；XR-XZ301 四通道大小鼠旷场箱，上海欣软信息科技有限公司；LE225D 电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司。

1.3 实验动物

雄性 ICR 小鼠（6 周龄）180 只，购于维通利华（中国，上海），动物许可证号 SYXK（沪）2018-0028。实验

前进行适应性饲养一周，光照 12 h 明暗交替，温度 20~25 ℃，相对湿度 50%~60%，小鼠自由摄食和饮水。所有动物实验均严格按照中华人民共和国《实验动物管理条例》以及实验动物伦理要求操作，得到上海交通大学动物伦理委员会批准（批准号：A2024082-003）。

1.4 实验方法

1.4.1 苁蓉枣仁乌梅饮料提取方法单因素考察试验

按苁蓉枣仁乌梅饮料配方比例，取同一批组方肉苁蓉、酸枣仁、乌梅药材 3 份，各加入 50 mL 纯水（料液比 1:3），分别在 60、80 和 100 ℃下提取 3 次，每次提取 1 h，合并 3 次提取液，测定提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量，初步考察提取温度对提取物中指标性成分的影响。取同一批组方肉苁蓉、酸枣仁、乌梅药材 5 份，分别以料液比 1:3、1:5、1:7、1:10、1:12 （g·mL^{-1}），80 ℃下提取 3 次，每次提取 1 h，合并 3 次提取液，测定提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量，初步考察提取液料比对提取物中指标性成分的影响。取同一批组方肉苁蓉、酸枣仁、乌梅药材 5 份，各加入 50 mL 纯水，80 ℃条件下分别提取 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h，提取 3 次，测定提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量，初步考察提取时间对提取物中指标性成分的影响。

1.4.2 苁蓉枣仁乌梅饮料提取方法正交试验

根据单因素试验的结果，分别选取提取温度（A）、料液比（B）和提取时间（C）3 个因素及其 3 个水平，作为影响苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中指标性成分的工艺条件，采用 L_9（3^3）正交表，以提取物指标性成分总含量为评价指标，设定 3 因素 3 水平正交试验。

1.4.3 苁蓉枣仁乌梅饮料提取方法验证和放大试验

按苁蓉枣仁乌梅饮料配方比例，取同一批组方肉苁蓉、酸枣仁、乌梅药材 3 份，在料液比为 1:12（g·mL^{-1}），提取温度 100 ℃，提取时间 2.0 h 的条件下，各提取 3 次，测定提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量。将肉苁蓉，酸枣仁，乌梅用量放大 40 倍，取同一批组方药材 3 份，在料液比为 1:12 g·mL^{-1}，提取温度 100 ℃，提取时间 2.0 h 的条件下，各提取 3 次，测定提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量。

1.4.4 苁蓉枣仁乌梅饮料成分含量测定

参照《中国药典》（2020 年版），对检测方法进行改进，并经方法学考察，建立了同时测定提取物中包括枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素在内的 4 种主要指标性成分含量的 HPLC 方法。采用苯酚-硫酸法测定组方饮料提取物中的粗多糖含量。

1.4.4.1 HPLC 检测方法

色谱条件为柱温 10 ℃；进样量 10 μL；流量 1 mL·min^{-1}；检测波长 210、330、335 nm；色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.5%的 $NH_4H_2PO_4$ 溶液（pH 值 2.92）；流动相 B 为甲醇。流动相的洗脱梯度为 0~7 min（0.5%~1.5%（φ）B），7~17 min（1.5%~40%（φ）B），17~20 min（40%~47%（φ）B），20~30 min（47%~52%（φ）B），30~35 min（100%（φ）B）。

1.4.4.2 HPLC 方法学考察

线性及检测限、定量限考察：精密量取适量枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素对照品储备液，加入 50%（φ）甲醇稀释制备含枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素质量浓度分别为 2.016 0、0.110 0、0.112 5 和 0.018 3 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，并以 50%甲醇倍比稀释至 32 倍，按“1.2.4.1”项下方法测定，以峰面积对化合物的质量浓度进行线性回归；逐级稀释混合对照品溶液进行测定，以信噪比为 3:1 时的化合物质量浓度作为检测限，以信噪比为 10:1 时对照品的质量浓度作为定量限。精密度考察：称取组方药材，制成供试品，连续进样 6 针，测定并计算各指标性成分的含量。稳定性考察： 称取组方药材，制成供试品，于不同时间点进样测定。重复性考察：取同一批组方药材 6 份，制成供试品进行测定。加样回收率考察：取同一批组方药材 6 份，精密称定枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素适量，以含量近似 1:1 分别加入 6 份样品中，制成供试品测定各成分的含量，计算各自的回收率。

1.4.4.3 粗多糖含量测定方法

取一定质量浓度的样品溶液 2 mL，加入 1 mL 5 wt.%苯酚溶液和 5mL 浓硫酸，经 90 ℃水浴加热 15 min，取

出后降至室温，于 485 nm 波长测 OD 值，根据 OD 值计算粗多糖的含量。

1.4.4.4 粗多糖检测方法学考察

检出限考察：通过连续测定空白溶液 20 次，取 3 倍标准偏差所对应的质量浓度为检出限，计算多糖的检出限。专属性考察：按“1.2.4.3”项下方法，测定空白溶剂和空白对照品在 485 nm 下的 OD 值。线性关系考察：配制葡萄糖母液，稀释成不同的质量浓度，测定不同质量浓度葡萄糖对应的 OD 值，以 OD 值对葡萄糖的质量浓度进行线性回归，计算回归方程。精密度考察：称取组方药材，制成供试品，连续检测 6 次，计算每次粗多糖的含量。稳定性考察：称取组方药材，制成供试品，于不同时间点测定粗多糖的含量。重复性考察：取同一批组方药材 6 份，制成供试品，测定每份样品粗多糖的含量。

1.4.5 动物分组及给药

180 只小鼠共分三次进行实验（直接睡眠实验、巴比妥钠阈下剂量睡眠实验和巴比妥钠睡眠潜伏期实验），每批次 60 只小鼠。每批次实验中，小鼠随机分为 5 组，分别是空白组、阳性药组、低/中/高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组，每组 12 只小鼠。采用灌胃给药方式，每天一次，灌胃周期 30 d，灌胃结束后对各组小鼠进行相关指标的检测。每批次动物分组及给药剂量详见表 1。苁蓉枣仁乌梅饮料人（70 kg）每日饮用生药量为 8.40 g，则小鼠每日饮用生药量 1.09 g·kg^{-1}。阳性药物艾司唑仑（Estazolam, EST）每日成人推荐剂量为 1~2 mg，则小鼠推荐剂量为 0.26 mg·kg^{-1}。

表 1 每批次实验动物分组及给药剂量表

Table 1 Grouping and dosage administration for each batch of experimental animals

组别	药物	剂量	剂量依据
空白组	蒸馏水	10 mL·kg^{-1}	-
阳性药物组	艾司唑仑	0.26 mg·kg^{-1}	临床等效剂量
低剂量提取物组	苁蓉枣仁乌梅饮料提取物	5.46 g·kg^{-1}	5 倍每日推荐食用量（1.5 倍药典剂量）
中剂量提取物组		10.92 g·kg^{-1}	10 倍每日推荐食用量（3 倍药典剂量）
高剂量提取物组		21.85 g·kg^{-1}	20 倍每日推荐食用量（6 倍药典剂量）

1.4.6 直接睡眠及旷场实验

各组小鼠连续灌胃 30 d 后，在末次灌胃结束后的 20 min 内，以翻正反射消失 1 min 以上为睡眠指标，记录各组小鼠入睡只数和睡眠时间。直接睡眠实验后立即进行旷场实验，测试前将小鼠置入旷场设备所在房间至少适应环境 1 h，之后将小鼠轻放于旷场箱中央，并远离实验装置，全程保持安静，录像。记录每只小鼠 5 min 内活动总路程及进入旷场箱中央区域的次数。每只小鼠实验结束后及时清理旷场箱中小鼠排泄物，并喷洒医用酒精，待酒精挥散后进行下一只小鼠的测试。

1.4.7 巴比妥钠阈下剂量睡眠实验

各组小鼠连续灌胃 30 d 后，在末次灌胃结束后的 20 min 内，各组小鼠以 175 mg·kg^{-1} 腹腔注射巴比妥钠，记录各组小鼠在 30 min 内入睡的动物数量，观察指标为小鼠翻正反射消失 1 min 以上。

1.4.8 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

各组小鼠连续灌胃 30 d 后，在末次灌胃结束后的 20 min 内，各组小鼠以 250 mg·kg^{-1} 腹腔注射巴比妥钠，观察不同药物对巴比妥钠诱导睡眠潜伏期的影响，睡眠潜伏期为小鼠从注射巴比妥钠到出现翻正反射消失 1 min 所需时间。

1.5 数据处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，Graphpad prism 8 软件进行绘图。旷场实验数据采用 student-t 检验；入睡动物数为计数资料采用卡方检验；入睡潜伏期数据采用单因素方差分析 LSD 检验。数据表示为 $\bar{x}\pm s$，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物制备工艺优化

2.1.1 成分含量测定方法学考察结果

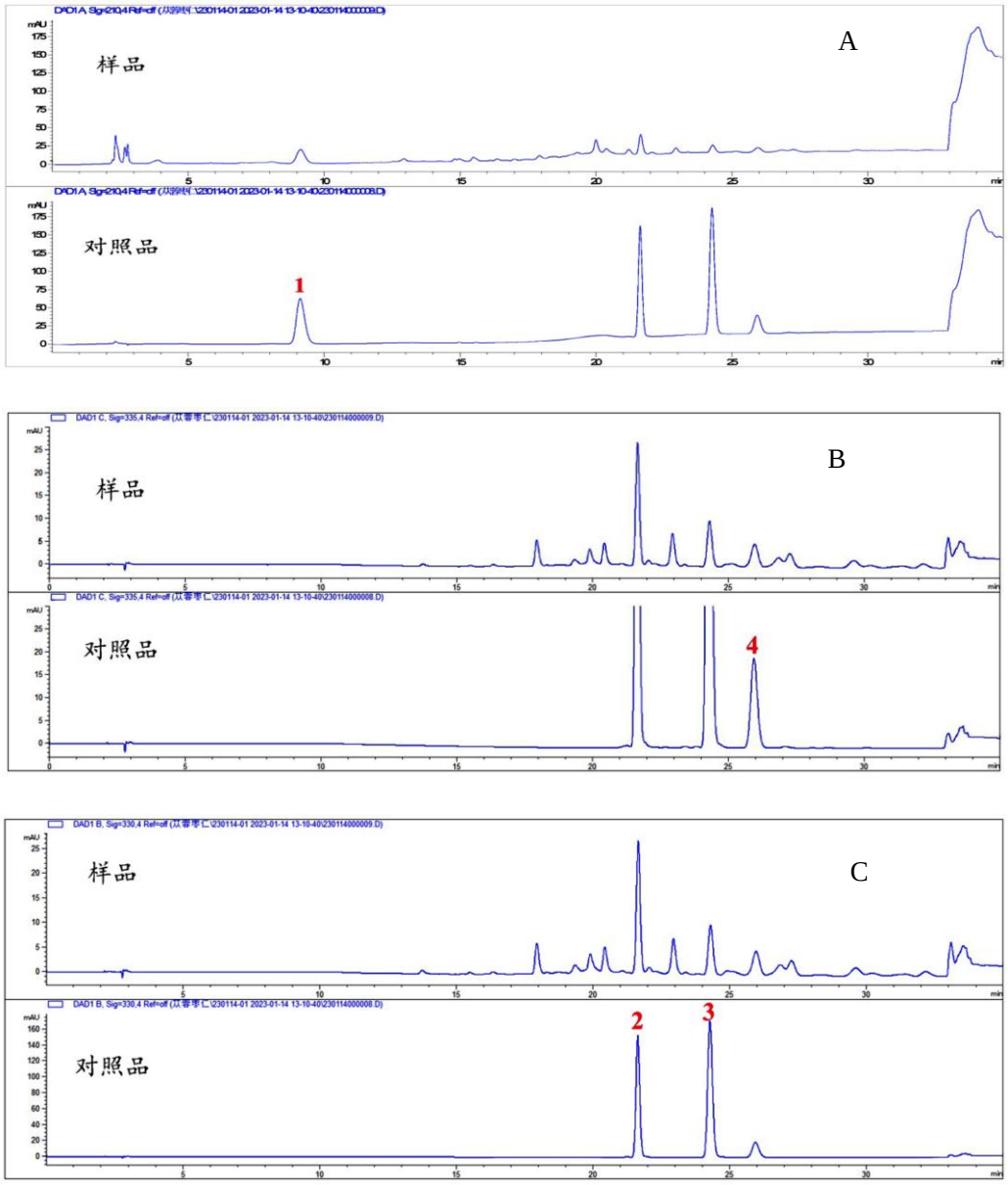

图 1 对照品和供试品溶液分别在 210 nm 波长（A）下和 330 nm 波长（B 和 C）下的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of the reference and the solutions at 210 nm wavelength (A) and 330 nm wavelength (B and C)

注：1 为枸橼酸色谱峰；2 和 3 分别为松果菊苷和毛蕊花糖苷的色谱峰；4 为斯皮诺素的色谱峰。

由图 1 可知，建立的 HPLC 检测方法，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素 4 种对照品的色谱峰与相邻峰均达到有效分离，保留时间分别为 t_{R1}=9.0 min，t_{R2}=21.6 min，t_{R3}=24.3 min 和 t_{R4}=25.9 min。以峰面积对化合物的质量浓度进行线性回归，其线性范围分别为 12.12~2016、0.14~110、0.18~112.50 和 2.44~18.30 μg·mL^{-1}，R^2 分别为 0.999 8、1、1 和 1，表明线性关系良好。在该方法下，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的检测限分别为 3.636、0.045 144、0.058 和 0.756 4 μg·mL^{-1}，定量限分别为 12.12、0.14、0.18 和 2.44 μg·mL^{-1}。精密度实验表明，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素含量的 RSD 值分别为 0.10%、0.07%、0.06%和 0.33%，说明仪器精密度良好。0~12 h 稳定性考察表明，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素在 12 h 内稳定性良好，RSD 值分别为 0.78%、0.16%、0.20%和 1.46%。重复性实验中，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素含量测定结果的 RSD 值分别为 0.51%、0.42%、0.37%和 0.38%，表明该组方中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素含量测定重复性良好。样品加样回收率测定结果显示，枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的平均回收率分别为 97.42%、103.32%、98.90%和 99.71%，其 RSD 值分别为 0.70%、0.52%、1.05%和 0.63%。可见，所

建立的同时测定提取物中包括枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷和斯皮诺素在内的 4 种主要成分含量的该 HPLC 方法准确可靠，可用于后续制备方法优化中 4 种成分含量检测。

粗多糖检测方法学考察中，多糖的检出限为 0.098 μg·mL^{-1}；空白溶剂和空白对照品在 485 nm 下测得的 OD 值无明显变化，表明该方法专属性较好；线性关系考察回归方程的 R^2 为 0.999 7，表明该方法线性关系良好；连续 6 次检测粗多糖含量的 RSD 值为 0.47%，说明该方法精密度良好；供试品溶液中粗多糖含量在 12 h 内的 RSD 值为 0.44%，表明该组方的粗多糖在 12 h 内稳定性较好；6 个样品中粗多糖含量的 RSD 值为 2.51%，说明该方法重复性良好，可用于后续制备方法优化中粗多糖含量检测。

2.1.2 制备工艺单因素考察结果

采用建立的 HPLC 方法结合粗多糖检测，以苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和多糖含量为评价指标，对苁蓉枣仁乌梅饮料提取温度、提取料液比和提取时间进行单因素考察，为正交试验提供数据支持。在提取温度为 60、80 和 100 ℃的条件下，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量随温度的升高而增加。在提取料液比为 1:3、1:5、1:7、1:10、1:12（g·mL^{-1}）的条件下，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、斯皮诺素和粗多糖的含量均随料液比的升高而增加；而松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量在料液比为 1:10（g·mL^{-1}）时含量最高，料液比为 1:12（g·mL^{-1}）时含量有所下降；但各指标性成分总含量均随料液比的增加而升高。在提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 的条件下，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖含量变化趋势有所不同，但各指标性成分总含量随时间的增加而升高。具体数据详见补充材料。结合单因素考察结果，考虑到实际生产工艺提取时间不宜过长，拟定正交试验各因素和水平见表 2，正交试验设计见表 3。

表 2 苁蓉枣仁乌梅饮料提取方法正交试验拟定的因素水平表

Table 2 Factor levels of orthogonal experimental design for the extraction method of Congrong Zaoren Wumei Beverage

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 料液比/(g·mL^{-1})	C 提取时间/h
1	60	1:7	1.0
2	80	1:10	1.5
3	100	1:12	2.0

表 3 苁蓉枣仁乌梅饮料正交试验表及各指标成分含量的变化（mg·g^{-1}）

Table 3 Orthogonal experimental design and changes in measured component contents of Congrong Zaoren Wumei Beverage (mg·g^{-1})

试验编号	因素			指标性成分总含量	枸橼酸含量	松果菊苷含量	毛蕊花糖苷含量	斯皮诺素含量	粗多糖含量
	A	B	C						
1	3	3	1	116.71	75.55	4.08	1.62	0.48	34.98
2	1	2	3	70.98	59.01	2.60	0.80	0.36	8.22
3	3	1	3	117.86	73.87	3.53	1.21	0.45	38.82
4	1	3	2	72.55	59.73	2.37	0.94	0.41	9.10
5	2	3	3	83.64	69.90	2.83	1.48	0.44	8.99
6	3	2	2	117.76	74.09	2.58	1.37	0.48	39.24
7	2	2	1	70.11	57.96	2.12	0.86	0.36	8.81
8	2	1	2	69.63	58.37	1.74	0.54	0.34	8.65
9	1	1	1	69.66	58.14	2.48	0.86	0.36	7.83
K_1	71.06	85.72	85.49						
K_2	74.46	86.29	86.65						
K_3	117.44	90.97	90.83						
R	46.38	5.25	4.19						

2.1.3 制备工艺正交试验结果

按照正交表条件对苁蓉枣仁乌梅饮料进行提取，提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和粗多糖的含量检测结果如表 3 所示。通过对极差 R 进行比较，判断各因素对苁蓉枣仁乌梅饮料提取物各指标性成分总

含量的影响顺序为A＞B＞C，即提取温度＞料液比＞提取时间。在对 *k* 值进行比较后推断 3 个因素的最佳组合为 $A_3B_3C_3$，即最佳的提取条件为提取温度 100 ℃，料液比 1:12（g mL^{-1}），提取时间 2 h。由表 4 可知，方差分析结果表明，提取温度对苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中各指标性成分总含量的影响显著，料液比和提取时间的影响不明显。

表 4 正交试验方差分析结果

Table 4 Analysis of variance from orthogonal experiments

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
提取温度	4 010.50	2	2 005.25	116.26	0.01
料液比	49.79	2	24.90	1.44	0.41
提取时间	47.37	2	23.68	1.37	0.42

2.1.4 制备工艺的验证和放大试验结果

苁蓉枣仁乌梅饮料提取物工艺验证试验结果显示，在最佳的提取条件下，提取物中各指标性成分的总含量的平均值为 119.74 mg g^{-1}，RSD 值为 0.57%，说明最佳提取工艺稳定可靠。放大试验结果显示，在最佳的提取条件下，提取物中各指标性成分的总含量的平均值为 120.89 mg g^{-1}，RSD 值为 0.95%，与放大前的试验结果基本一致，进一步验证该工艺稳定可靠。将 3 次放大实验获得的样品用于后续改善睡眠作用研究，该样品中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素、多糖含量均值分别为 77.73、2.69、1.03、0.50、38.93 mg g^{-1}。

刘丽莎等[16]研究管花肉苁蓉苯乙醇苷水溶媒提取工艺，经单因素优化及正交试验优化发现，料液比 1:15（g mL^{-1}），浸提温度 80 ℃，浸提时间 2 h 为最佳工艺；温度大于 90 ℃后，苯乙醇苷含量降低。本研究发现，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量在料液比为 1:10（g mL^{-1}）时含量最高，料液比为 1:12（g mL^{-1}）时含量有所下降，但随 60、80 和 100 ℃温度的升高而增加，这可能与苁蓉枣仁乌梅饮料采用的是荒漠肉苁蓉有关，此外苁蓉枣仁乌梅饮料中除了荒漠肉苁蓉外，还包含酸枣仁和乌梅，对松果菊苷和毛蕊花糖苷等苯乙醇苷类的溶出会产生影响。

综上，采用 HPLC 和苯酚-硫酸法，以苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素和多糖含量为评价指标，对苁蓉枣仁乌梅饮料提取工艺进行优化。经单因素试验和正交试验考察，并对所推定的最佳提取条件进行验证，最终确定最佳的提取条件为，提取温度 100 ℃、料液比 1:12（g mL^{-1}）、提取时间 2 h，为后期厂家进一步开发提供参考。

2.2 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠行为活动与睡眠的影响

2.2.1 对小鼠直接睡眠的影响

如表 5 所示，连续给药 30 d 后，阳性药物艾司唑仑组、低/中/高苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组小鼠在末次给药 20 min 内均未出现明显睡眠现象，与空白组无明显差异，表明苁蓉枣仁乌梅饮料提取物连续给药 30 d 对小鼠无直接的睡眠作用。

表 5 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠直接睡眠的影响

Table 5 Effect of Congrong Zaoren Wumei Beverage extract on direct Sleep in mice (*n*=12)

组别	动物总数/只	入睡动物数/只	入睡率/%
空白组	12	0	0
艾司唑仑组	12	0	0
低剂量提取物组	12	0	0
中剂量提取物组	12	0	0
高剂量提取物组	12	0	0

2.2.2 对小鼠行为学的影响

为了判断苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠是否有镇静作用，采用旷场实验观察小鼠行为学变化。苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠在旷场实验中运动总路程和中央进入次数的影响如图 2 所示。与空白组比较，艾司唑仑组小鼠运动总路程和中央进入次数分别增加了 14.48%和 31.07%，但差异无统计学意义。低剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组小鼠运动总路程较空白组小鼠显著增加了 25.10%（P<0.05），其中央进入次数增加了 50.93%，但差异无统

计学意义；中剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组小鼠运动总路程以及中央进入次数较空白组小鼠分别显著增加了27.09%和72.33%（P<0.05）；高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组小鼠运动总路程和中央进入次数分别增加了15.60%和40.78%，但差异无统计学意义。此外，与艾司唑仑组比较，低/中/高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠运动总路程的增加作用分别是艾司唑仑的1.73、1.87和1.07倍，而对小鼠中央进入次数的增加作用分别是艾司唑仑的1.64、2.33和1.31倍，差异无统计学意义。结果表明，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物连续给药30 d后能够明显减轻小鼠在旷场中的焦虑感，具有一定镇静作用。

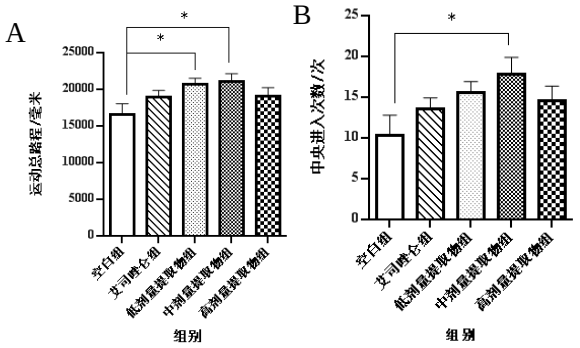

图2 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠旷场运动的影响

Fig.2 Effect of Congrong Zaoren Wumei beverage extract on open field activity in mice ($\bar{x}\pm s$, n=12)

注：（A）苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠运动总路程的影响；（B）苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠在中央停留次数的影响；与空白组比较，$^{*}P<0.05$。

2.2.3 对小鼠巴比妥钠阈下剂量催眠的影响

如表6所示，与空白组相比，艾司唑仑、低/中/高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组小鼠的巴比妥钠阈下剂量睡眠率均有所提高。其中，艾司唑仑组入睡动物只数较空白组相比明显提高了9倍（P＜0.001）；低剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组入睡动物只数较空白组相比提高了3倍，差异无统计学意义；中剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组入睡动物只数较空白组相比提高了4倍，差异无统计学意义；高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组入睡动物只数较空白组相比明显提高了5倍（P＜0.05）。与艾司唑仑组相比，低/中/高三个剂量的苁蓉枣仁乌梅饮料提取物诱导小鼠睡眠的作用均未出现明显提高。结果表明，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物可一定程度增加阈下剂量巴比妥钠诱导的睡眠作用。

表6 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对巴比妥钠阈下剂量催眠作用的影响

Table 6 Effect of Congrong Zaoren Wumei Beverage extract on on the hypnotic effect of subthreshold doses of sodium barbital in mice ($\bar{x}\pm s$, n=12)

组别	动物总数/只	入睡动物数/只	入睡率/%
空白组	12	1	8.33
艾司唑仑组	12	10	83.33**
低剂量提取物组	12	4	33.33
中剂量提取物组	12	5	41.67
高剂量提取物组	12	6	50.00*

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.001$。

2.2.4 对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

与空白组相比，给予艾司唑仑、低/中/高三个剂量的苁蓉枣仁乌梅饮料提取物均能显著缩短巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期（P＜0.001）。其中，艾司唑仑组睡眠潜伏期较空白组相比缩短了58.44%（P＜0.001）；低剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组睡眠潜伏期较空白组相比缩短了29.59%（P＜0.001）；中剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组睡眠潜伏期较空白组相比缩短了31.42%（P＜0.001）；高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组睡眠潜伏期较空白组相比缩短了53.83%（P＜0.001）。低、中剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期影响差异不明显；与低、中剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物相比，高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物明显缩短小鼠睡眠潜伏期，分别缩短34.43%和32.69%（P＜0.01），且效果与艾司唑仑的作用相似（表7）。结果表明，低/中/高三个剂量的苁蓉

枣仁乌梅饮料提取物均能明显缩短巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期，其中高剂量的苁蓉枣仁乌梅饮料提取物效果较好。

表 7 苁蓉枣仁乌梅饮料提取物对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

Table 7 Effect of Congrong Zaoren Wumei Beverage extract on on the sleep latency induced by sodium barbital in mice ($\bar{x}\pm s$, n=12)

组别	动物总数/只	睡眠潜伏期/min
空白组	12	32.34±4.27
艾司唑仑组	12	13.44±3.2**
低剂量提取物组	12	22.77±5.81**#
中剂量提取物组	12	22.18±6.05**#
高剂量提取物组	12	14.93±3.35**

注：与空白组比较，**P < 0.000 1；与高剂量苁蓉枣仁乌梅饮料提取物组比较，#P < 0.01。

传统中医药具有多种活性物质，可作用于多靶点，因此在治疗失眠方面有其独特的优势[17]。近年，随着睡眠问题的日益突出，探讨药食同源中药对睡眠的影响越来越受到人们的重视[18]。如，以酸枣仁、茯苓为主的复方固体饮料可明显缩短戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期和延长戊巴比妥钠诱导的睡眠时间，其作用机制可能与脑内 5-HT、DA 和 GABA 含量的变化有关[19]。本研究结果表明，苁蓉枣仁乌梅饮料提取物可明显增加阈下剂量巴比妥钠诱导的睡眠作用，缩短巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期，有助于促进睡眠的发生、缩短睡眠潜伏期，且对小鼠无直接的睡眠作用。苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中所检测的主要成分含量大小依次为枸橼酸（77.73 mg g^{-1}）、多糖（38.93 mg g^{-1}）、松果菊苷（2.69 mg g^{-1}）、毛蕊花糖苷（1.03 mg g^{-1}）、斯皮诺素（0.50 mg g^{-1}）。其中，斯皮诺素被证实能增强戊巴比妥诱导的睡眠状态；其可增强小鼠的非快速眼动睡眠，并改变睡眠-觉醒调节脑区 c-Fos 的表达[20]；减弱氯苯丙氨酸所致的失眠效应，减少睡眠潜伏期，延长睡眠时间[21]。毛蕊花糖苷具有一定抗焦虑、催眠和肌肉松弛作用[22]。而含量较大的枸橼酸、多糖（肉苁蓉、酸枣仁、乌梅多糖）和松果菊苷未见改善睡眠相关报道。近年有关中药多糖成分改善睡眠的研究层出不穷，如刺五加多糖[23]等。苁蓉枣仁乌梅饮料提取物中枸橼酸、多糖和松果菊苷改善睡眠的作用有待进一步研究。

3 结论

本研究选用药食同源中药肉苁蓉、酸枣仁、乌梅组成苁蓉枣仁乌梅饮料，以 3 味中药的指标性成分（松果菊苷、毛蕊花糖苷、斯皮诺素、枸橼酸）和多糖含量为评价指标，对其提取物制备工艺进行优化。确定优化提取工艺为，提取温度 100 ℃、料液比 1:12（g mL^{-1}）、提取时间 2 h，为其工业化生产提供一定的理论指导。进一步考察该提取物对于小鼠睡眠和行为活动的影响发现，其连续给药 30 d 对小鼠无直接的睡眠作用，可明显减轻小鼠在旷场中的焦虑，具有一定镇静作用；且可增加阈下剂量巴比妥钠诱导的睡眠作用，明显缩短巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期，表明该法制备的苁蓉枣仁乌梅饮料提取物具有较好的改善小鼠睡眠作用，为肉苁蓉改善睡眠系列产品的开发提供科学依据。

参考文献

[1] ZHOU E S, RECKLITIS C J. Internet-delivered insomnia intervention improves sleep and quality of life for adolescent and young adult cancer survivors [J]. Pediatr Blood Cancer, 2020, 67(9): e28506.

[2] MORIN C M, BENCA R. Chronic insomnia [J]. The Lancet, 2012, 379(9821):1129-1141.

[3] CHEN Y, KARTSONAKI C, CLARKE R, et al. Characteristics and correlates of sleep duration, daytime napping, snoring and insomnia symptoms among 0.5 million Chinese men and women [J]. Sleep Medicine, 2017, 44: 67-75.

[4] 屠鹏飞,姜勇.中药肉苁蓉的本草再考证[J].中国中药杂志,2022,47(20):5670-5679.

[5] FU Z, FAN X, WANG X, et al. Cistanches Herba: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 219: 233-247.

[6] SONG Y, ZENG K, JIANG Y, et al. Cistanches Herba, from an endangered species to a big brand of Chinese medicine [J]. Medicinal Research Reviews, 2021, 41 (3): 1539-1577.

[7] 张士滨,王璐,李浩,等.肉苁蓉总苷对睡眠剥夺模型大鼠学习认知和突触可塑性的影响[J].包头医学院学报,2024,40(6):14-19+36.

[8] JIANG Y, LI S P, WANG Y T, et al. Differentiation of Herba Cistanches by fingerprint with high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(11): 2156-2162.

[9] SHERGIS J L, NI X, SARRIS J, et al. Ziziphus spinosa seeds for insomnia: A review of chemistry and psychopharmacology [J]. Phtomedine, 2017, 34: 38-43

[10] JIANG J G, HUANG X J, CHEN J, et al. Comparison of the sedative and hypnoic effects of flaonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen Ziziphus jujube [J]. Natural Product Research, 2007, 21(4): 310-320.

[11] WANG L E, BAI Y J, SHI X R, et al. Spinosin, a C-glycoside flavonoidfrom Zizyphi spinosae semen, potentiated pentobarbital-inducedsleep via the serotonergic system [J]. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 2008, 90(3): 399-403.

[12] DU C H, YAN Y, SHEN C X, et al. Comparative pharmacokinetics of six major compounds in normal and insomnia rats after oral administration of Ziziphi Spinosae Semen aqueous extract [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 4: 385-395.

[13] 吴用雄,刘黄宁,吴沫翎.乌梅枣仁汤联合二甲双胍治疗对 2 型糖尿病合并睡眠障碍患者血糖水平、睡眠质量及效果的影响[J].糖尿病新世界,2023,26(22):13-17.

[14] 朱晓松,彭善鑫,左志文,等.失眠患者乌梅丸加减方口服后睡眠质量及肠道菌群变化[J].山东医药,2022,62(11):47-49.

[15] 陈蕾,张倩,朱育凤,等.不同产地乌梅理化指标和枸橼酸含量的分析和比较[J].药学与临床研究,2022,30(4):327-330.

[16] 刘丽莎,张清,游林,等.管花肉苁蓉苯乙醇苷水溶媒提取技术研究[J].食品科技,2019,44(4):225-229.

[17] 王柏乔,应春苗,刘飞祥,等.中药调控生物钟治疗睡眠障碍的作用机制研究进展[J].世界中医药,2024,19(24):3881-3888.

[18] 施呈林,江丽洁,沈鹤云,等.药食同源中药中生物碱类成分对睡眠的改善作用及机制研究进展[J].中草药,2024,55(23):8290-8300.

[19] 李欣坪,牛延菲,王蒙蒙,等.以酸枣仁、茯苓为主的复方固体饮料改善睡眠的作用研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(11):4453-4458.

[20] ZHAO W, ZHANG H, LI L, et al. Spinosin enhances non-rapid eye movement sleep and alters c-Fos expression in sleep-wake regulatory brain regions in mice [J]. Sleep and Breathing. 2025, 29(1): 101.

[21] 廖丹琼,储利胜,张建平,等.酸枣仁中斯皮诺素对睡眠剥夺大鼠下丘脑 MCH、Orexin-A 表达的影响[J].中成药,2019,41(4):907-910.

[22] RAZAVI B M, ZARGARANI N, HOSSEINZADEH H. Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of Lippia citriodora leaves and verbascoside in mice [J]. Avicenna Journal Of Phytomedicine. 2017, 7(4): 353-365.

[23] 代泓怡,狄岩,李翔,等.刺五加多糖调控 SIRT1/PGC-1α 通路对睡眠剥夺大鼠海马神经元损伤的影响[J].中医药导报,2025,31(1):48-52.