

十子强肾酒中淫羊藿苷溶出的影响因素研究

邱梦可¹, 鲍珊珊¹, 吴孟瑶¹, 梅兴国^{1,2}

¹湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁

²咸宁市康健医药产业研究院有限公司, 湖北 咸宁

收稿日期: 2024年3月25日; 录用日期: 2024年5月22日; 发布日期: 2024年5月30日

摘要

目的: 探索十子强肾酒处方药材淫羊藿的药效成分淫羊藿苷的溶出规律, 为缩短十子强肾酒制备工艺周期提供依据。方法: 以浸提温度、浓度差、浸提时间进行三因素三水平正交试验, 通过HPLC法测定淫羊藿苷含量, 直观分析法确定最优工艺, 极差分析法确定各影响因素的主次关系。结果: 十子强肾酒中淫羊藿苷溶出的影响因素主次顺序为浓度差 > 浸提温度 > 浸提时间, 最优制备工艺组合为45℃、150 rpm、10 h。结论: 以淫羊藿苷含量为评价指标, 对药材进行温浸预处理, 在45℃, 150 rpm振摇的提取状态下, 十子强肾酒每次的浸提时间可由20天缩短至10 h。

关键词

十子强肾酒, 淫羊藿苷, 影响因素, 浸提温度, 浓度差, 浸提时间

Study on Influencing Factors of Icarin Dissolution in ShiZiQiangShenJiu

Mengke Qiu¹, Shanshan Bao¹, Mengyao Wu¹, Xingguo Mei^{1,2}

¹School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei

²Xianning Kangjian Pharmaceutical Industry Research Institute Co., Ltd., Xianning Hubei

Received: Mar. 25th, 2024; accepted: May 22nd, 2024; published: May 30th, 2024

Abstract

Objective: To explore the dissolution behavior of icariin, the pharmacodynamic component of Herba Epimedii from a prescription herb of ShiZiQiangShenJiu, and to provide a basis for shortening the preparation process cycle of ShiZiQiangShenJiu. **Methods:** Three factors with three levels of orthogonality were tested, including soaking temperature, concentration difference, and soaking time, to determine the content of icariin by HPLC method, visual analysis method to determine

the optimal process, and extremely poor analysis method to determine the main second relationship of each influencing factor. Results: The main and secondary influencing factors on the dissolution of icariin in ShiZiQiangShenJiu were in the order of concentration difference > extraction temperature > extraction time, and the optimal preparation process combination was 45°C, 150 rpm, and 10 h. Conclusions: Using the content of icariin as the evaluation indicator, the medicinal materials were subjected to warm soaking pretreatment. Under the extraction state of shaking at 45°C and 150 rpm, the extraction time of ShiZiQiangShenJiu can be shortened from 20 days to 10 hours each time.

Keywords

ShiZiQiangShenJiu, Icariin, Influencing Factor, Extraction Temperature, Concentration Difference, Immersion Time

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

酒与功效不同的中药按一定比例融合形成了药酒,药借酒力、酒助药势,不但发挥了中药保健养生、预防治疗疾病的作用,而且扩大了酒的临床使用范围[1]。药酒以配制方便,性质稳定、安全有效、服用方便等优点被广泛应用于临床[2],目前药酒产品种类繁多,已有 588 个药酒产品得到批准[3]。药酒的制备方法有浸渍法、渗漉法、回流提取法、超声波提取法等,不同制备方法对产品质量和生产效率影响显著[4] [5]。

十子强肾酒(批准文号:国药准字 B20020708)是国家食品药品监督管理局批准的保健药酒,由枸杞子、淫羊藿、五味子、大枣、麦冬、肉苁蓉、金樱子、黄精、西洋参、锁阳、熟地黄、覆盆子等二十七味中药组成。功能主治为补肾助阳,适用于肾阳不振,症见形寒肢冷、精神倦怠、疲乏无力、腰膝酸软等。十子强肾酒制备工艺经过 3 次浸提,每次浸提时间分别为 20 天、20 天和 5 天,并需静置 20 天整个过程历时 65 天[6]。制备工艺周期长、生产效率低。本研究以淫羊藿苷含量为指标,采用正交试验法考察十子强肾酒制备工艺中淫羊藿苷溶出的影响因素,为缩短十子强肾酒制备工艺周期提供依据。

2. 材料

2.1. 药品与试剂

淫羊藿苷标准品, 200112-210503w, 江苏永健医药科技有限公司; 枸杞子统, ZY003-20210701, ; 五味子统, 21061001; 大枣统, 21012701; 沙苑子统, 21070201; 菟丝子统, 21031201; 蛇床子统, 21052201; 锁阳统, 19112801; 熟地黄统, 21032201; 山茱萸统, 21022501; 女贞子统, 19052001; 杜仲统, 20081401; 续断统, 20020501; 麦冬统, 20092901; 西洋参统, 21061410; 肉桂统, 21030501; 陈皮统, 21050401 以上药材均为安徽汇中州中药饮片有限公司采购。

鹿茸统, ZJ114-171201; 远志统, ZY008-20210701; 淫羊藿统, ZY060-201201, 以上药材均为山西正来制药有限公司采购。

韭菜子统, 1905058; 沉香统, 2010017; 丁香统, 2004020; 黄精统, 2003052; 楮实子统, 2103048; 金樱子统, 2003001; 覆盆子统, 2105003; 肉苁蓉统, 2010094, 以上药材均为安徽亳药千草中药饮片有

限公司购得。

甲醇分析纯, 20200313, 国药集团化学试剂有限公司; 正丁醇分析纯, 20221011, 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈色谱纯, 2022082503, 诺尔施; 甲酸色谱纯, 20190801, 天津市大茂化学试剂厂; 泸州老窖原浆酒 60% (v/v), 食品级, 四川不老谭酒业有限公司; 冰糖食品级, 20210322, 广东中轻糖业集团。

2.2. 仪器与设备

ME104 型电子天平(梅特勒托利多); 多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司); SHA-B 型数显恒温振荡器(常州天瑞仪器有限公司); LD5-2B 型高速离心机(河北医众医疗器械有限公司); YRE-2000 型旋转蒸发器(巩义市科贝仪器设备有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津); KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

3. 方法与结果

3.1. 正交试验十子强肾酒制备

在预实验基础上, 以淫羊藿苷为考察指标, 浸提温度(A)、浓度差(B)、浸提时间(C)为考察因素(浓度差通过振荡实现、每次浸提时间按原工艺比例缩短), 每个因素选取三个水平, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验[7] [8]。因素水平见表 1, 正交试验设计见表 2。

Table 1. Level table of orthogonal test factors

表 1. 正交试验因素水平表

| 水平 | 因素 | | | | |
|----|----------|-------------|-----------|----|-----|
| | A 温度(°C) | B 振荡幅度(rpm) | C 浸提时间(h) | | |
| 1 | 36 | 50 | 6 | 6 | 1.5 |
| 2 | 45 | 100 | 8 | 8 | 2 |
| 3 | 50 | 150 | 10 | 10 | 2.5 |

Table 2. Orthogonal experimental design

表 2. 正交试验设计

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| (1) $A_1B_1C_1$ (36°C, 50 rpm, 6 h) | (4) $A_2B_1C_2$ (45°C, 50 rpm, 8 h) | (7) $A_3B_1C_3$ (50°C, 50 rpm, 10 h) |
| (2) $A_1B_2C_2$ (36°C, 100 rpm, 8 h) | (5) $A_2B_2C_3$ (45°C, 100 rpm, 10 h) | (8) $A_3B_2C_1$ (50°C, 100 rpm, 6 h) |
| (3) $A_1B_3C_3$ (36°C, 150 rpm, 10 h) | (6) $A_2B_3C_1$ (45°C, 150 rpm, 6 h) | (9) $A_3B_3C_2$ (50°C, 150 rpm, 8 h) |

制备工艺: 将二十七味中药材分别粉碎成粗粉(全部通过药典二号筛), 称取处方量混匀, 装入纱布袋, 置容器中, 加入组合温度纯化水 100 ml 后, 置数显恒温振荡器中 20 min [9] [10]。加入泸州老窖原浆酒 200 ml 温浸并计时, 结束后将药袋取出, 置离心机中以 5000 r/min 的速度离心 20 min, 离心后取上清液备用; 第二次浸提与第一次相同, 两次上清液合并, 备用; 将第二次离心取液后的药袋置容器中, 加纯化水 500 ml, 放入数显恒温振荡器中温浸并计时, 结束后放至室温, 将药袋取出, 置离心机中将第三次浸液分离, 上清液与前两次合并; 加冰糖 30 g, 加适量水, 加热至溶化, 加纯化水至 1000 ml 置容器中静置, 滤过, 取上清液, 即得。

3.2. 淫羊藿苷含量测定

采用 HPLC 法, 色谱条件: Promosil C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 按体积比 A 为

乙腈, B 为 0.1% 甲酸水溶液, 进行梯度洗脱, 洗脱方法见表 3; 流速: $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 40°C ; 进样体积: $10 \mu\text{L}$ [11]。

Table 3. Gradient elution method
表 3. 梯度洗脱方法

| 洗脱时间 | A (乙腈) | B (0.1% 甲酸水溶液) |
|-----------|---------|----------------|
| 0~10 min | 15% | 85% |
| 10~15 min | 15%~18% | 85%~82% |
| 15~20 min | 18% | 82% |
| 20~40 min | 18%~35% | 82%~65% |
| 40~42min | 35%~45% | 6%~55% |
| 42~75 min | 45%~85% | 55%~15% |

实验操作如下:

(1) 混合对照品溶液的制备: 精密称定淫羊藿苷标准品 0.0020 g 置 25 ml 容量瓶中, 加约 20 ml 甲醇超声溶解, 用甲醇稀释至刻度, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤即得浓度为 $76.56 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的淫羊藿苷对照品溶液。

(2) 供试品溶液的制备: 精密量取正交试验制备的十子强肾酒 9 批各 50.0 ml 置 100 ml 蒸发皿中, 将蒸发皿置水浴锅上浓缩至约 20 ml 。将浓缩液转移至 100 ml 分液漏斗中, 用少量纯化水冲洗蒸发皿并转移到分液漏斗中。用水饱和的正丁醇 30 ml 振摇萃取 3 次, 合并萃取液置圆底烧瓶中。放旋转蒸发仪上蒸干, 用少量甲醇将残渣超声溶解并转移到 5 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤即得。

(3) 流动相 B 的配制: 精密量取甲酸 1.0 ml 置 1000 ml 容量瓶中, 加纯化水稀释至刻度摇匀, 超声脱气即得 0.1% 甲酸水溶液。

精密量取甲醇空白溶液、淫羊藿苷对照品溶液和 9 批十子强肾酒供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别注入色谱仪, 记录色谱图(甲醇空白溶液、淫羊藿苷对照品溶液和(1)号十子强肾酒供试品溶液液相色谱图见图 1~3)。

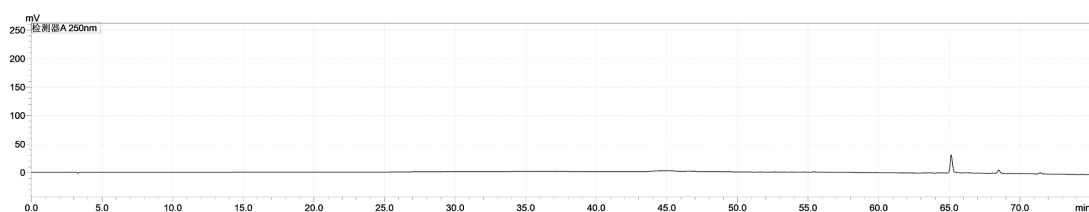


Figure 1. chromatogram of methanol blank solution

图 1. 甲醇空白溶液色谱图

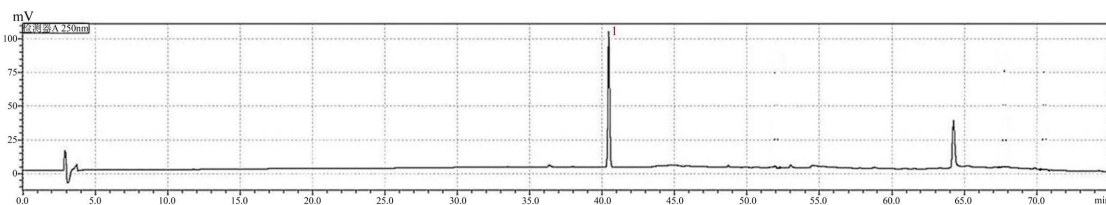


Figure 2. chromatogram of icariin reference solution

图 2. 淫羊藿苷对照品溶液色谱图

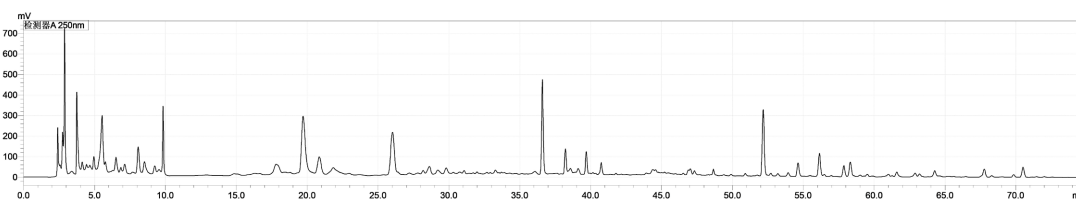


Figure 3. (1) Chromatogram of ShiZiQiangShenJiu

图 3. (1)号十子强肾酒色谱图

淫羊藿苷对照品溶液色谱峰的保留时间 $t_{1/2} = 40.723$ 、峰面积为 858,450，在淫羊藿苷保留时间附近分别读取 9 批十子强肾酒供试品溶液色谱图中淫羊藿苷峰面积，按照外标法计算每批十子强肾酒中淫羊藿苷的含量(见表 4)。计算公示如下：

$$\text{含量}(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{C_{\text{对}} * A_{\text{供}} * D}{A_{\text{对}}}$$

$C_{\text{对}}$: 对照品溶液中淫羊藿苷浓度；

$A_{\text{对}}$: 对照品溶液中淫羊藿苷峰面积；

$A_{\text{供}}$: 供试品溶液中淫羊藿苷峰面积；

D : 供试品溶液稀释倍数。

Table 4. Area and content of icarii in ShiZiQiangShenJiu

表 4. 十子强肾酒淫羊藿苷峰面积及含量(单位: $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

| 试验号 | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|
| 峰面积 | 1,027,494 | 1,157,111 | 1,239,824 | 1,164,955 | 1,257,111 | 1,486,036 | 1,249,506 | 929,524 | 1,212,034 |
| 含量 | 9.16 | 10.32 | 11.06 | 10.39 | 11.21 | 13.25 | 11.14 | 8.29 | 10.81 |

淫羊藿苷含量正交试验结果见表 5:

Table 5. Results of orthogonal experiment of icariin content

表 5. 淫羊藿苷含量正交试验结果

| 试验号 | 因素 | | | 淫羊藿苷(单位: $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) |
|-----|-----------------------|--------------------------|----------------------|---|
| | A | B | C | |
| (1) | A ₁ (36°C) | B ₁ (50 rpm) | C ₁ (6 h) | 9.16 |
| (2) | A ₁ (36°C) | B ₂ (100 rpm) | C ₂ (8 h) | 10.32 |
| (3) | A ₁ (36°C) | B ₃ (150 rpm) | C ₃ (10h) | 11.06 |
| (4) | A ₂ (45°C) | B ₁ (50 rpm) | C ₂ (8h) | 10.39 |
| (5) | A ₂ (45°C) | B ₂ (100 rpm) | C ₃ (10h) | 11.21 |
| (6) | A ₂ (45°C) | B ₃ (150 rpm) | C ₁ (6h) | 13.25 |
| (7) | A ₃ (50°C) | B ₁ (50 rpm) | C ₃ (10h) | 11.14 |
| (8) | A ₃ (50°C) | B ₂ (100 rpm) | C ₁ (6h) | 8.29 |
| (9) | A ₃ (50°C) | B ₃ (150 rpm) | C ₂ (8h) | 10.81 |
| K1 | 30.54 | 30.69 | 30.70 | |

续表

| | | | |
|------|----------------|--|----------------|
| K2 | 34.85 | 29.82 | 31.52 |
| K3 | 30.24 | 35.12 | 33.41 |
| k1 | 10.18 | 10.23 | 10.23 |
| k2 | 11.62 | 9.94 | 10.51 |
| k3 | 10.08 | 11.71 | 11.14 |
| R | 1.54 | 1.77 | 0.90 |
| 主次顺序 | | B > A > C | |
| 优水平 | A ₂ | B ₃ | C ₃ |
| 优组合 | | A ₂ B ₃ C ₃ | |

正交试验制备的 9 批十子强肾酒中淫羊藿苷含量最大值为 13.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，最小值为 8.29 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，均能达到质量标准中每 1 ml 含淫羊藿苷不低于 8.0 μg 的要求。由正交试验结果可知影响十子强肾酒中淫羊藿苷溶出的影响因素主次顺序为 B > A > C，即浓度差 > 浸提温度 > 浸提时间，浸提温度、浓度差、浸提时间三个因素的优水平分别为 A₂、B₃、C₃，即 45℃、150 rpm、10 h，最优制备工艺组合为 A₂B₃C₃，即 45℃、150 rpm、10 h。

4. 结论

浓度差对淫羊藿苷的溶出有显著影响；浸提温度对淫羊藿苷的溶出有较大影响；浸提时间对淫羊藿苷的溶出影响较小。由于最优制备工艺组合为 45℃、150 rpm、10 h，因此，以淫羊藿苷含量为评价指标，对药材进行温浸预处理，在 45℃，150 rpm 振摇的提取状态下，十子强肾酒每次的浸提时间可由 20 天缩短至 10 h。

5. 讨论

十子强肾酒的制备方法为浸渍法中的温浸法，该方法有提取时间长、提取效率低、溶剂挥发较多、药液损耗大等缺点[12]。处方中药材淫羊藿的功效为补肾阳、强筋骨、祛风湿，其主要成分淫羊藿苷是十子强肾酒质量标准控制的有效成分，是保证十子强肾酒补肾助阳功效的重要成分[13] [14]。确保淫羊藿苷的含量符合质量要求是工艺变更的前提，因此，影响淫羊藿苷溶出的因素对工艺变更、缩短制备工艺周期起到关键作用。

影响中药材有效成分浸出的因素主要有溶剂、粉碎粒度、浸提温度、浓度差、浸提时间等。中药材有效成分提取主要的溶剂有水和乙醇，同一成分在不同溶剂中溶解度差异很大。药材的粉碎粒度应适宜，不宜过大或过细，粒度过大溶出缓慢，过细是药材粉粒表面积过大，吸附作用增强不利于溶出。浸提温度越高提取效率越高，但温度升高可加快有机溶剂的挥发。浓度差越高提取效率越高。本实验发现浸提时间并非越长越好，药材组织达到浸提平衡延长也不会提高浸提效率。通过改变影响中药材有效成分浸出因素中的一种或多种加速有效成分的溶出[15] [16]。

在预实验中，对单味药材进行了白酒浓度、浸提温度、浓度差、浸提时间四个因素的初步考察。本研究选取了浸提温度、浓度差、浸提时间三个因素三个水平进行正交试验，结果证明以淫羊藿苷含量为评价指标，在保证淫羊藿苷含量符合质量要求的前提下，提高浸提温度、增大浓度差可以将十子强肾酒制备工艺周期由 65 天缩短至 1 天。使提取时间大大缩短、溶剂挥发减少、药液损耗降低。十子强肾酒的工艺变更是一个系统的工程，不能只考虑淫羊藿苷含量这一个指标，还需要对质量标准中其他项目如乙

醇量、总固体等进行考察, 综合评定制备工艺条件, 初步确定新工艺并进行优化。

参考文献

- [1] 岳国超, 王斌娥, 焦玉, 等. 鹤寿酒制备工艺研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(6): 62-64.
- [2] 刘志萍, 辛宁, 于长江, 等. 中药药酒的控制技术及临床应用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(19): 19-21.
- [3] 刘璐, 林晓兰, 庄伟. 临床药师对药酒合理使用的思考[J]. 临床合理用药, 2024, 17(8): 172-176.
- [4] 陈晓明, 莫小林, 韦振源, 等. 正交试验优选十一方药酒的超声提取工艺[J]. 中国药房, 2014, 25(43): 4062-4065.
- [5] 宛玉祥, 梁雪娟, 刘浩, 等. 药酒现存问题与建议[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(12): 56-59.
- [6] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理总局国家药品标准 WS-5687(B-0687)-2014Z——十子强肾酒[S]. 北京: 国家食品药品监督管理总局, 2014.
- [7] 钟敬飞, 徐效勇, 李跃, 等. 新型山药酒的酿造工艺[J]. 酿酒, 2017, 44(5): 83-86.
- [8] 邱泉, 覃聪慧, 黄秋燕, 等. 神农蛇药酒制备工艺研究[J]. 蛇志, 2017, 29(3): 273-274+277.
- [9] 王建升, 杨辉, 刘俊玲. 中药饮片的水分含量与储存养护[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 35-36.
- [10] 章宇宁, 吕阳成, 骆广生. 根类中药材孔隙结构及其分形特征[J]. 高校化学工程学报, 2009, 23(2): 199-204.
- [11] 罗吉, 丁晓江, 杨剑湖, 等. 正交试验结合指纹图谱优选冯了性风湿跌打药酒工艺研究[J]. 广东化工, 2021, 48(10): 66-68.
- [12] 李化. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中药材, 2001(4): 299-300.
- [13] 孙清廉. 补肾壮阳良药淫羊藿[J]. 家庭中医药, 2013, 20(1): 48-49.
- [14] 周晓洁, 姚辛敏, 周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(11): 112-115.
- [15] 邢建录. 中药提取工艺的原理及影响中药提取效果的因素探讨[J]. 科技传播, 2014(14): 2.
- [16] 罗永明, 主编. 天然药物化学[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2011: 16-17.