

基于响应面及加权评分的黄芪蜜炙工艺优化

杨志城^{1,2,3}, 孙彩虹^{1,2,3}, 鄂秀辉^{2,3*}, 何毅^{2,3*}

1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

2. 天士力控股集团有限公司 天士力研究院现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 采用 Box-Behnken 响应面分析法结合多属性决策优化黄芪蜜炙工艺。方法 以蜜水稀释比、炒制温度、炒制时间为考察因素, 以蜜炙黄芪中毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、总皂苷、总多糖、总黄酮、含水量为考察指标, 采用优序图法对各指标进行权重赋予, 并计算综合权重。结果 黄芪最佳工艺为蜜水稀释比 1:0.603 4, 炒制温度为 147.74 °C, 炒制时间为 4.887 min, 综合得分值为 0.638~0.678。结论 基于响应面及加权综合评分优选的黄芪蜜炙工艺可有效减少炮制过程中成分的损失, 饮片成色佳, 工艺可重现性强, 为黄芪蜜炙工艺的开发提供可靠理论证据。

关键词: 黄芪; 蜜炙工艺; BBD 实验设计; 加权评分; 工艺优化; 毛蕊异黄酮苷; 黄芪甲苷; 总皂苷; 总多糖; 总黄酮
中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2247-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.007

Astragali Radix honey roasting process optimization based on response surface and weighted score

YANG Zhi-cheng^{1,2,3}, SUN Cai-hong^{1,2,3}, E Xiu-hui^{2,3}, HE Yi^{2,3}

1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Development Center of Modern Chinese Medicine, Research Institute of Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To optimize the honey roasting process of *Astragali Radix* by using Box-Behnken response surface analysis method combined with multi-attribute decision-making. **Methods** Taking honey-water dilution ratio, frying temperature, and frying time as investigating factors, and using the isoflavone glycosides, astragaloside IV, total saponins, total polysaccharides, total flavonoids, and water content in honey roasted *Astragali Radix* as the inspection indicators, the optimal sequence diagram method was used to assign weights to each indicator and calculate the comprehensive weight. **Results** The optimal parameters of the honey roasting process of *Astragali Radix* was the honey-water dilution ratio of 1:0.603 4, the frying temperature was 147.74 °C, and the frying time was 4.887 min, the comprehensive score was 0.638—0.678. **Conclusion** The honey roasting process of *Astragali Radix* was optimized by response surface and weighted comprehensive score can effectively reduce the loss of ingredients in the process of processing. The decoction has good color and process reproducibility, which provides reliable theoretical evidence for the development of the honey roasting process of *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; honey roasting process; BBD experimental design; weighted scoring; process optimization; calycosin-7-glucoside; astragaloside IV; total saponins; total polysaccharides; total flavonoids

蜜炙黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus membranaceus* (Fisch.) Bunge 和蒙古黄芪 *A. (Bunge) Hsiao* 生饮片加入适量的炼蜜拌匀、翻炒所

收稿日期: 2020-12-12

基金项目: 国家科技重大专项课题——中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究 (2017ZX09301005)

作者简介: 杨志城, 男, 硕士研究生, 专业方向为工业药学。E-mail: m15657995175@163.com

*通信作者: 鄂秀辉, 男, 主要从事中药新药开发与质量控制研究。E-mail: exh@tasly.com

何毅, 女, 主要从事中药新药研究与开发。E-mail: hy@tasly.com

得, 饮片呈淡棕黄色或淡棕褐色, 闻之有蜜香, 嚼之略带豆腥味^[1]。蜜炙过程中黄芪与炼蜜化学成分之间相互作用, 从而导致药理活性改变, 因此, 蜜炙品相较于生品补中益气、润燥作用显著增强, 为中医补气之要药, 临床多用于肺虚气短、气虚血弱、气虚便秘、内伤劳倦等^[2]。因炙黄芪临床使用量较大, 对炙黄芪工艺研究报道较多, 但评价方法多集中于黄芪甲苷含量、外观质量等, 缺少整体综合性的比较研究^[3-6]。多属性决策 (multiple attribute decision making, MADM) 也称有限方案多目标决策, 是指在同时考虑多个属性的情况下, 选择最优备选方案或进行方案排序的决策问题, 是现代决策科学的一个重要组成部分^[7]。多属性决策方法克服了由于单一指标或指标选取不全面等原因导致的决策偏差, 丰富了决策结果包含的信息量, 使最终决策结果可信度更高。多属性决策与中药炮制研究有机结合, 根据重要程度赋予相应权重, 对不同的评价体系所得结果进行数据标准化, 最终获得综合评分, 为中药的工艺探索和质量评价研究等提供了一个更好的思路。基于此, 本实验结合权重理念, 考察不同因素对炙黄芪综合评分的影响, 优化黄芪最佳蜜炙工艺。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪、Agilent G4260 蒸发光散射检测器、安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱, 美国 Agilent 公司; GCK3308 全自动空气源, 北京中惠普分析技术研究所; 药典四号筛, 浙江上虞市纱网厂; Models-30-1060 鼓风干燥箱, 美墨尔特有限公司; DK-98-2 水浴锅、DX-60 小型药材粉碎机,

天津市泰斯特仪器有限公司; CX-60 药材断片机, 邢台亿资莱机械制造有限公司; XS 205D 电子分析天平, 瑞士梅特勒托利多公司; GCK3308 全自动空气源, 北京中惠普分析技术研究所; U3900 紫外分光光度计, 日本日立公司; RJ2202 赛米控电磁炉, 赛米控电子科技有限公司。

黄芪药材由甘肃中天药业责任有限公司提供, 经天士力鄂秀辉高级工程师鉴定为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *A. membranacells* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。甲醇为分析纯, 购于天津市康科德化学试剂有限公司; 乙腈为色谱纯, 购于美国默克公司; 水为超纯水。对照品黄芪甲苷 (批号 110781-201717, 质量分数 $\geq 97.4\%$)、毛蕊异黄酮苷 (批号 111920-201505, 质量分数 $\geq 97.6\%$) 购自中国药品食品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 权重研究

2.1.1 权重对比矩阵 采用优序图法设计评价指标两两对比矩阵^[8], 送予 5 位来自中药炮制、质量控制等方向黄芪研究专家 (A~E), 并基于群决策、聚类分析及矩阵相容性理论确认专家权重系数 (ω), 最终集成评价指标的最终权重 (ω_z)。对比矩阵如表 1 (以专家 A 为例) 所示, 打分方式: 指标 α 、 β , 指标 α 重要性大于指标 β , 则指标 α 得 1 分; 指标 β 作用大于指标 α , 则指标 α 得 0 分; 指标 α 与指标 β 同等重要, 则各得 0.5 分。

2.1.2 权重结果统计 根据专家填写的权重对比矩阵计算各指标的权重, 结果见表 2。根据各专家对于不同指标的权重赋予结果, 建立专家之间评价相

表 1 炙黄芪饮片蜜炙工艺指标权重统计 (专家 A)

Table 1 Questionnaire on weights of honey roasting technology indexes of roasted *Astragali Radix* decoction pieces (expert A)

指标 α	指标 β								
	浸出物	总皂苷	总多糖	总黄酮	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮苷	样品颜色	饮片完整度	含水量
浸出物	0.5	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0
总皂苷	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
总多糖	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
总黄酮	1	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
黄芪甲苷	1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	0.5
毛蕊异黄酮苷	1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	0.5
样品颜色	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
饮片完整度	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
含水量	1	1	1	1	0.5	0.5	1	1	0.5

表 2 专家权重统计

Table 2 Expert weight statistics table

专家	浸出物	总皂苷	总多糖	总黄酮	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮苷	样品颜色	饮片完整度	含水量
A	0.037 0	0.086 4	0.086 4	0.086 4	0.185 2	0.185 2	0.074 1	0.074 1	0.185 2
B	0.088 6	0.164 6	0.164 6	0.164 6	0.151 9	0.151 9	0.038 0	0.012 7	0.063 3
C	0.086 4	0.148 1	0.135 8	0.135 8	0.197 5	0.185 2	0.037 0	0.037 0	0.037 0
D	0.037 0	0.111 1	0.061 7	0.086 4	0.148 1	0.148 1	0.197 5	0.012 3	0.197 5
E	0.086 4	0.135 8	0.135 8	0.135 8	0.197 5	0.197 5	0.037 0	0.012 3	0.061 7

似矩阵, 并求得传递矩阵。根据传递矩阵结果进行聚类分析^[9-11]。根据已有的研究结果, 矩阵相容性的指标临界值为 0.8 左右, 故在本实验中取阈值为 $0.730 1 < \text{矩阵相容性指标取值}(\lambda) < 0.879 4$, 可以将专家分为 4 类: {C, E}、{B}、{D}、{A}, 则

$\alpha_C = \alpha_E = 2$, $\alpha_B = 1$, $\alpha_D = 1$, $\alpha_A = 1$, 采用归一化法计算专家权重可知, $\omega_C = \omega_E = 2/7$, $\omega_B = \omega_D = \omega_A = 1/7$ 。根据专家自身权重系数, 结合专家赋权结果, 计算集成后权重(由于饮片完整性、颜色权重过低, 故不再将其列为综合考察指标), 结果见表 3。

表 3 综合权重统计

Table 3 Comprehensive weight statistics table

指标	专家 A	专家 B	专家 C	专家 D	专家 E	指标权重
专家权重	1/7	1/7	2/7	1/7	2/7	
浸出物	0.037 0	0.088 6	0.086 4	0.037 0	0.086 4	0.074 7
总皂苷	0.086 4	0.164 6	0.148 1	0.111 1	0.135 8	0.136 7
总多糖	0.086 4	0.164 6	0.135 8	0.061 7	0.135 8	0.125 8
总黄酮	0.086 4	0.164 6	0.135 8	0.086 4	0.135 8	0.129 5
黄芪甲苷	0.185 2	0.151 9	0.197 5	0.148 1	0.197 5	0.187 5
毛蕊异黄酮苷	0.185 2	0.151 9	0.185 2	0.148 1	0.197 5	0.183 9
含水量	0.185 2	0.063 3	0.037 0	0.197 5	0.061 7	0.094 6

2.2 考察指标测定

2.2.1 水分测定 称取炙黄芪饮片 5 g, 于已干燥至恒定质量的蒸发皿中平铺, 精密称定后于 105 °C 下干燥 4 h, 取出, 置干燥器中, 冷却 30 min, 精密称定, 继续将样品及蒸发皿放置于 105 °C 下干燥 1 h 后取出, 放冷 30 min, 精密称定, 至连续 2 次称定质量之间误差不超过 5 mg 为止。依据减少的质量, 计算样品中含水量^[1]。

2.2.2 浸出物含量测定 称取炙黄芪饮片粉末约 4 g (过 2 号筛), 精密称定 (W_1), 置 250 mL 磨口锥形瓶中, 精密加入纯化水 100 mL, 密塞, 冷浸, 前 6 h 内时时振摇, 再静置 18 h。滤过, 精密量取续滤液 20 mL, 置已干燥至恒定质量 (W_2) 的蒸发皿中, 100 °C 水浴蒸干后 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量。继续将样品及蒸发皿放置于 105 °C 下干燥 1 h 后取出, 放冷 30 min, 精密称定 (W_3), 至连续 2 次称定质量之间误差不超过 5 mg 为止^[1]。

$$\text{浸出物含量} = (W_3 - W_2) \times 5 / W_1$$

2.2.3 总皂苷含量测定^[12]

(1) 供试品制备: 取黄芪药材粉末 (过 60 目筛) 0.5 g, 精密称定, 加甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 减压回收甲醇 (65 °C), 残渣用 25 mL 水饱和正丁醇分 3 次转移至分液漏斗中, 氨试液洗涤 3 次, 每次 15 mL, 正丁醇层减压回收至干, 甲醇溶解, 溶液转移至 25 mL 量瓶中并定容至刻度, 摇匀, 即得检测黄芪总皂苷的供试品溶液。

(2) 线性关系考察: 取黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇配制成含黄芪甲苷 205.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。精密量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 对照品溶液于具塞玻璃试管中, 空气吹干溶剂, 加入质量分数为 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸溶液 0.8 mL, 涡旋混匀, 60 °C 水浴加热 20 min。取出冰浴至室温。快速加入冰醋酸 5 mL, 涡旋混匀, 539 nm 波长下测定吸光度值。该波长下黄芪对照品溶液及黄芪皂苷供试品溶液在此波长下有最大吸

收。以质量浓度为横坐标 (X), 吸光度值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=4.101\ 3\ X-0.042\ 8$, $r=0.999\ 5$ 。

(3) 测定方法: 精密量取供试品溶液各 0.5 mL 于具塞玻璃试管中, 空气吹干后, 加质量分数为 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL, 高氯酸溶液 0.8 mL, 60 °C 水浴加热 20 min, 取出后立即冰浴, 冷却至室温, 再加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 用于吸光度值的测定, 通过回归方程计算得到黄芪总皂苷含量。

2.2.4 总多糖含量测定^[13-14]

(1) 供试品溶液的制备: 精密称取黄芪药材粉末 1 g, 加入纯化水 12 mL, 超声提取, 超声温度 65 °C, 超声时间 13 min, 功率 300 W, 频率 40 kHz。提取结束后 11 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 加入无水乙醇 4 mL, 4 °C 冰箱冷藏放置过夜。次日, 11 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 沉淀加纯化水溶解, 定容至 100 mL 量瓶, 摇匀, 即为供试品溶液。

(2) 线性关系考察: 取 105 °C 下干燥至恒定质量的无水葡萄糖 102.12 mg, 配制成含葡萄糖 0.102 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 对照品溶液于 15 mL 离心管中, 加蒸馏水至 1 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 再快速加入 5 mL 95% 浓硫酸, 涡旋均匀。于 30 °C 下反应 20 min, 流水浴冷却至室温, 于 485 nm 处测定吸光度。葡萄糖对照品和黄芪多糖供试品溶液在此波长处有共同的最大吸收, 以吸光度值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=7.681\ 4\ X-0.012\ 9$, $r=0.996\ 0$ 。

(3) 测定方法: 取供试品溶液 0.5 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 再快速加入浓硫酸 5 mL, 涡旋均匀, 30 °C 下反应 20 min, 流水浴冷却至室温, 于 485 nm 处测定吸光度, 通过回归方程计算得到黄芪总多糖含量。

2.2.5 总黄酮含量测定^[15-16]

(1) 供试品溶液的制备: 取黄芪炮制品, 精密称定, 取样量按生品折算为 2 g, 每组平行 3 份, 加 34 mL 70% 乙醇, 冷浸 1 h, 水浴回流提取 75 min, 放凉, 滤过, 滤液浓缩并定容至 25 mL 量瓶中, 得总黄酮供试品溶液。

(2) 对照品溶液的制备: 取毛蕊异黄酮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含毛蕊异黄酮苷 0.5 mg/mL 的溶液, 即得毛蕊异黄酮苷对照品溶液。

(3) 线性关系考察: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶液的制备: 取 0.5 mg/mL 毛蕊异黄酮苷甲醇溶液, 分别吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容。以空白溶剂为对照, 以吸光度值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性拟合, 得回归方程 $Y=41.551\ X+0.039\ 4$, $r=0.999\ 8$ 。

(4) 测定方法: 取 1 mL 供试品溶液于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容。以甲醇为空白对照, 加入石英比色池中, 于 280 nm 处测定吸光度, 通过回归方程计算得到黄芪总黄酮含量。

2.2.6 毛蕊异黄酮苷含量的测定^[1]

(1) 对照品溶液的制备: 取毛蕊异黄酮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含毛蕊异黄酮苷 50 µg/mL 的溶液, 即得毛蕊异黄酮苷对照品溶液。

(2) 供试品溶液制备: 取各批次黄芪药材粉末 1 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 4 h, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.22 µm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(3) 色谱条件: G1311B 型四元泵、G7129A 型进样模块、G4212B 型柱温箱、G1316A 型检测器, Empower 3.0 工作站; 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 µm); 流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 80%~60% 乙腈; 20~30 min, 60% 乙腈; 检测波长为 260 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 µL; 理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算不低于 3000。

(4) 样品测定: 分别精密吸取毛蕊异黄酮苷对照品溶液与供试品溶液各 10 µL, 注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件进样测定, 计算毛蕊异黄酮苷的含量。

2.2.7 黄芪甲苷含量的测定^[1]

(1) 对照品溶液的制备: 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成含黄芪甲苷 0.5 mg/mL 的溶液, 即得黄芪甲苷对照品溶液。

(2) 供试品溶液的制备: 取各批次黄芪药材粉末 4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 含 4% 浓氨的 80% 甲醇溶液, 密塞, 加热回流 1 h, 放冷, 用上述溶剂补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣

加 80% 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

(3) 色谱条件: G1311B 型四元泵、G7129A 型进样模块、G4212B 型柱温箱、G1316A 型检测器, Empower 3.0 工作站; 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-水 (32:68) 为流动相; 蒸发光散射检测器检测; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 理论塔板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4000。

(4) 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液 5、10 μL , 供试品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件进样测定, 用外标两点法对数方程计算黄芪甲苷含量, 即得。

2.2.8 综合得分 实际测得数据经数据归一化去除单位限制, 各指标权重与归一化得分相乘, 再加和, 得最终综合得分。

综合得分 = 浸出物得分 $\times$ 0.074 7 + 总皂苷得分 $\times$ 0.136 7 + 总多糖得分 $\times$ 0.125 8 + 总黄酮得分 $\times$ 0.129 5 + 黄芪甲苷得分 $\times$ 0.187 5 + 毛蕊异黄酮苷得分 $\times$ 0.183 9 + 含水量得分 $\times$ 0.094 6

2.3 样品制备

取筛去杂质后的黄芪药材饮片 200 g, 根据实验设计方案将药材进行闷润等前处理, 将锅面烧至实验设定的炒制温度, 炒制实验设定的时间, 取出, 放凉。

2.4 Plackett-Burman 实验筛选蜜炙工艺显著影响因素

2.4.1 实验设计 采用 Design-Expert 12.0 软件设

计 Plackett-Burman 实验, 以浸出物含量 (Y_1)、总皂苷含量 (Y_2)、总多糖含量 (Y_3)、总黄酮含量 (Y_4)、黄芪甲苷含量 (Y_5)、毛蕊异黄酮苷含量 (Y_6)、含水量 (Y_7)、综合得分 (Y) 为考察指标, 筛选对蜜炙工艺影响较为显著的因素进行进一步考察, 分别为虚拟指标 (X_1)、焖润前是/否烘干 (X_2)、焖润时间 (X_3)、焖润温度 (X_4)、蜜水稀释比 (X_5)、炼蜜类型 (嫩蜜/中蜜, X_6)、炒制时间 (X_7)、炒制温度 (X_8)。

2.4.2 数据归一化处理 数据的标准化是将数据按比例缩放, 使之落入一个小的特定区间。去除数据的单位限制, 将其转化为无量纲的纯数值, 便于不同单位或量级的指标能够进行比较和加权, 而最典型手段即为归一化处理^[17]。本实验采用 min-max 法对原始数据进行线性变换, 使之落入 [0, 1] 区间。

2.4.3 显著性指标筛选 实验设计方案及结果如表 4 所示, 采用 Design-Expert 12.0 对软件对 Plackett-Burman 实验结果进行方差分析, 结果见表 5。由方差分析可以看出, 模型 $F=12.10$, $P=0.032\ 4$, $R^2=0.969\ 9$ 说明该多项式模型中各因素与响应值之间的线性关系显著, 响应面模型可信度高, 分析结果可信。Adeq Precision >4 的表示响应充分, 模型可用于空间设计。

加权综合得分 Y 拟合方程为 $Y=0.452\ 889+0.013\ 855\ 5\ X_1-0.051\ 062\ 4\ X_2+0.012\ 024\ 9\ X_3-0.015\ 451\ 6\ X_4-0.017\ 912\ 8\ X_5-0.025\ 236\ 7\ X_6-0.04\ 033\ 86\ X_7+0.028\ 900\ 9\ X_8$, 方差分析结果可知焖润前烘干、蜜水稀释比、炒制温度、炒制时间以

表 4 Plackett-Burman 实验设计方案及结果 (归一化)

Table 4 Plackett-Burman experimental design scheme and results (normalization)

序号	X_1	X_2	X_3/h	$X_4/^{\circ}\text{C}$	X_5	X_6	X_7/min	$X_8/^{\circ}\text{C}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	$Y_5/\%$	$Y_6/\%$	$Y_7/\%$	Y
1	(-1)	是	1.0 (+1)	20 (-1)	1:0.8 (+1)	中蜜	3 (-1)	175 (+1)	44.55	0.92	9.75	0.66	0.19	0.05	16.78	0.526 6
2	(+1)	是	1.0 (+1)	60 (+1)	1:0.4 (-1)	中蜜	6 (+1)	175 (+1)	41.92	0.88	8.31	0.72	0.19	0.04	5.43	0.485 2
3	(-1)	否	1.0 (+1)	20 (-1)	1:0.8 (+1)	中蜜	6 (+1)	115 (-1)	37.45	0.84	6.35	0.57	0.18	0.04	13.94	0.320 0
4	(+1)	是	1.0 (+1)	60 (+1)	1:0.8 (+1)	嫩蜜	3 (-1)	115 (-1)	44.71	0.92	14.53	0.55	0.16	0.04	16.06	0.551 7
5	(+1)	否	0.5 (-1)	60 (+1)	1:0.8 (+1)	中蜜	3 (-1)	115 (-1)	35.55	0.80	8.57	0.55	0.18	0.04	17.60	0.337 7
6	(-1)	是	0.5 (-1)	20 (-1)	1:0.4 (-1)	嫩蜜	3 (-1)	115 (-1)	47.54	0.96	5.46	0.64	0.21	0.05	9.38	0.537 7
7	(-1)	是	0.5 (-1)	60 (+1)	1:0.4 (-1)	中蜜	6 (+1)	115 (-1)	45.60	0.88	8.93	0.56	0.18	0.05	9.70	0.396 3
8	(+1)	否	1.0 (+1)	20 (-1)	1:0.4 (-1)	嫩蜜	6 (+1)	115 (-1)	46.63	0.89	5.98	0.65	0.19	0.06	8.39	0.400 0
9	(+1)	否	0.5 (-1)	20 (-1)	1:0.4 (-1)	中蜜	3 (-1)	175 (+1)	46.48	0.90	8.05	0.61	0.18	0.04	8.15	0.499 6
10	(-1)	否	0.5 (-1)	60 (+1)	1:0.8 (+1)	嫩蜜	6 (+1)	175 (+1)	44.43	0.81	4.46	0.75	0.19	0.05	5.74	0.347 7
11	(-1)	否	1.0 (+1)	60 (+1)	1:0.4 (-1)	嫩蜜	3 (-1)	175 (+1)	44.73	0.97	4.10	0.72	0.20	0.05	7.07	0.505 5
12	(+1)	是	0.5 (-1)	20 (-1)	1:0.8 (+1)	嫩蜜	6 (+1)	175 (+1)	45.80	0.81	8.50	0.80	0.19	0.04	4.96	0.525 6

表 5 Plackett-Burman 试验设计的因素水平及效应分析

Table 5 Factor level and effect analysis of Plackett-Burman trial design

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.079 2	8	0.009 9	12.10	0.032 4	显著	X_7	0.019 5	1	0.019 5	23.85	0.016 4	显著
X_1	0.002 3	1	0.002 3	2.81	0.192 1		X_8	0.010 0	1	0.010 0	12.24	0.039 5	显著
X_2	0.031 3	1	0.031 3	38.21	0.008 5	极显著	残差	0.002 5	3	0.000 8			
X_3	0.001 7	1	0.001 7	2.12	0.241 5		总离差	0.081 7	11				
X_4	0.002 9	1	0.002 9	3.50	0.158 2		R^2	0.969 9					
X_5	0.003 9	1	0.003 9	4.70	0.118 6		信噪比	9.888 6					
X_6	0.007 6	1	0.007 6	9.33	0.055 2	显著							

及炼蜜类型均对炙黄芪药材质量有重要作用 ($P < 0.15$, 因 Plackett-Burman 仅为 2 水平实验, 误差概率较大, 故在选取显著性时可适当放大其 P 值)。由 P 值大小 ($P < 0.05$) 及数据模拟分析, 焖润前烘干与否具有显著性差异, 故默认在后续试验中, 统一采用 60 °C 烘干半小时后的饮片。受蜜源单一等因素影响, 故在本次蜜炙工艺考察中不进行考察。

2.5 爬坡实验

响应面实验设计中, 为建立有效的响应面拟合方程, 所选各因素的水平需接近最大综合评分值附近, 故需进行最陡爬坡实验。因此根据 Plackett-Burman 实验结果拟合方程设计爬坡步长和方向, 设计实验方案, 实验方案及综合评分结果见表 6。炮制过程中发现, 当炒制温度为 190 °C 时, 极易出现焦片等现象, 故选取综合评价分值最优范围为温度 130~170 °C, 时间为 4~6 min, 蜜水稀释比为 1:0.4~1:0.8。

2.6 响应面实验

在爬坡实验的基础上, 采用 Design-Expert 12.0 基于 Box-Behnken 设计法设计响应面实验, 对显著因素进行进一步优化, 对蜜水稀释比 (X_5)、炒制时间 (X_7)、炒制温度 (X_8) 3 因素分别取 3 个水平, 以加权综合评分为其响应指标, 采用 Design-Expert 12.0 设计软件设计 3 因素 3 水平实验, 中心点重复

5 次, 实验设计方案及结果见表 7, 采用 Design-Expert 12.0 对实验数据进行方差检验分析, 结果如表 8 所示。

由图 1 可知, 综合得分的残差正态分布趋近于直线, 残差与方程预测值之间无规律, 预测值与实验真实值接近一条直线, 证明该模型假定正确, 由方差分析表 8 可知饮片合格率响应面实验设计得到的多项式模型中 $F=9.03$, $P < 0.05$, 说明该多项式模型中各因素与响应值之间的线性关系显著, 响应面模型可信度高。失拟项 $P=0.069\ 3 > 0.05$, 失拟项不显著, 说明随机误差为实验误差的主要来源, 未被纳入因素或不明因素对实验的结果影响程度较小, 模型显著。其相关系数 R^2 值为 0.909 4, R_{adj}^2 值为 0.818 8, 实验值与预测值之间一致性良好, 说明该响应面模型的可靠度比较高, 误差较小。方差分析结果显示, X_5^2 、 X_7^2 、 X_8^2 对综合评分结果影响显著。

加权综合得分 (Y) 与蜜水稀释比 (X_5)、炒制时间 (X_7)、炒制温度 (X_8) 之间的二次多项式模型为 $Y=0.643\ 8-0.012\ 723\ 8\ X_5-0.034\ 98\ X_7-0.004\ 8\ X_8-0.028\ 0\ X_5X_7+0.025\ 205\ 8\ X_5X_8-0.047\ 029\ 5\ X_7X_8-0.126\ 412\ X_5^2+0.082\ 937\ 1\ X_7^2+0.117\ 996\ X_8^2$, 各因素及交互因素自由度均为 $1 \leq x \leq 10$, 证明各因素相关性可容忍。

表 6 最陡爬坡实验设计及结果

Table 6 Design and results of steepest climbing experiment

X_5	X_7/min	$X_8/^\circ\text{C}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	$Y_5/\%$	$Y_6/\%$	$Y_7/\%$	Y
1.0	7	110	43.77	0.91	7.92	0.79	0.17	0.03	18.02	0.265 0
0.8	6	130	42.52	0.91	7.71	0.75	0.15	0.05	12.29	0.254 5
0.6	5	150	42.07	0.98	9.88	0.72	0.18	0.05	11.49	0.668 7
0.4	4	170	41.81	0.96	7.93	0.78	0.16	0.05	8.00	0.460 9
0.2	3	190	41.70	1.00	8.43	0.96	0.18	0.04	4.35	0.565 8

表 7 响应面实验设计方案及结果

Table 7 Response surface experimental design scheme and results

序号	X_5	X_7/min	$X_8/^\circ\text{C}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	$Y_5/\%$	$Y_6/\%$	$Y_7/\%$	Y
1	0.6 (0)	5 (0)	150 (0)	42.98	1.02	8.34	0.69	0.19	0.05	9.40	0.686 4
2	0.4 (-1)	6 (+1)	150 (0)	42.61	0.93	9.22	0.64	0.19	0.04	14.19	0.453 1
3	0.8 (+1)	5 (0)	130 (-1)	42.62	0.90	8.53	0.57	0.18	0.05	9.56	0.343 2
4	0.4 (-1)	5 (0)	130 (-1)	43.81	0.89	7.87	0.53	0.19	0.04	12.07	0.388 2
5	0.4 (-1)	5 (0)	170 (+1)	41.04	0.89	6.11	0.94	0.21	0.04	9.97	0.405 1
6	0.8 (+1)	4 (-1)	150 (0)	42.41	0.98	9.14	0.58	0.19	0.04	15.58	0.471 8
7	0.6 (0)	6 (+1)	130 (-1)	42.76	1.00	8.23	0.62	0.20	0.04	6.79	0.500 7
8	0.6 (0)	4 (-1)	130 (-1)	43.54	1.00	8.24	0.59	0.19	0.05	12.40	0.471 5
9	0.6 (0)	5 (0)	150 (0)	43.04	1.06	9.11	0.70	0.19	0.05	13.08	0.718 3
10	0.4 (-1)	4 (-1)	150 (0)	43.63	0.92	6.30	0.66	0.17	0.05	10.54	0.472 1
11	0.6 (0)	6 (+1)	170 (+1)	42.23	0.92	4.89	0.60	0.19	0.04	9.01	0.320 1
12	0.8 (+1)	5 (0)	170 (+1)	41.66	0.96	6.47	0.97	0.20	0.04	7.43	0.460 9
13	0.6 (0)	4 (-1)	170 (+1)	42.63	0.90	5.60	0.81	0.21	0.04	10.85	0.479 0
14	0.6 (0)	5 (0)	150 (0)	42.19	1.07	8.36	0.69	0.18	0.05	10.74	0.621 3
15	0.8 (+1)	6 (+1)	150 (0)	41.52	0.98	9.28	0.60	0.17	0.04	10.95	0.340 8
16	0.6 (0)	5 (0)	150 (0)	43.11	1.06	8.11	0.75	0.19	0.05	10.48	0.638 2
17	0.6 (0)	5 (0)	150 (0)	42.80	1.06	8.36	0.67	0.19	0.05	10.76	0.616 5

表 8 蜜炙工艺响应面回归模拟方差分析

Table 8 Analysis of variance in response surface regression simulation of honey roasting process

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.217 7	9	0.024 2	7.810 0	0.006 5	极显著	X_7^2	0.033 5	1	0.033 5	10.800 0	0.013 4	显著
X_5	0.001 3	1	0.001 3	0.418 0	0.538 5		X_8^2	0.064 9	1	0.064 9	20.960 0	0.002 5	极显著
X_7	0.009 8	1	0.009 8	3.150 0	0.119 0		失拟项	0.021 7	7	0.003 1			
X_8	0.000 2	1	0.000 2	0.059 3	0.814 6		纯误差	0.013 8	3	0.004 6	2.330 0	0.215 6	不显著
X_5X_7	0.003 1	1	0.003 1	1.010 0	0.347 9		总离差	0.007 9	4	0.002 0			
X_5X_8	0.002 5	1	0.002 5	0.820 2	0.395 2		方差	0.909 4					
X_7X_8	0.008 8	1	0.008 8	2.860 0	0.134 9		调整方差	0.818 8					
X_5^2	0.074 0	1	0.074 0	23.900 0	0.001 8	极显著							

利用模型可拟合出单因素作用曲线、以及两两因素相互作用响应面图 (图 2~4)。通过拟合的曲线及响应面图, 可以进一步研究单因素、交互因素对加权综合得分作用的强弱。响应面图 (图 2) 结果显示, 峰开口均朝下, 表明该模型有中心最高点, 与实验结果符合。由图形陡峭程度可知, 因素交互对综合得分影响程度较弱, 不具显著性, 与方差分析结果吻合。

单因素曲线结果 (图 3) 显示炒制温度、炒制时间、蜜水稀释比均对加权综合得分有显著性影响, 均出现明显的峰尖, 由走势可知, 单因素对综合得

分结果影响显著。图 4 为两两因素交互作用时极端水平作用曲线, 由图可得出, 不同因素之间交互作用对加权综合得分影响不明显。

2.7 模型优化

用 Design-Expert 12.0 软件优化工艺参数, 参数限制设置如表 9。得到的最优工艺为蜜水稀释比 1:0.603 4 时, 炒制温度为 147.74 $^\circ\text{C}$, 炒制时间为 4.887 min。该条件下, 加权综合得分为 0.645, 其中, 浸出物得分为 0.627, 含水量得分 0.695, 总黄酮得分 0.324, 毛蕊异黄酮苷得分 0.791, 黄芪甲苷得分 0.695, 总皂苷得分 0.908, 总多糖得分 0.824。

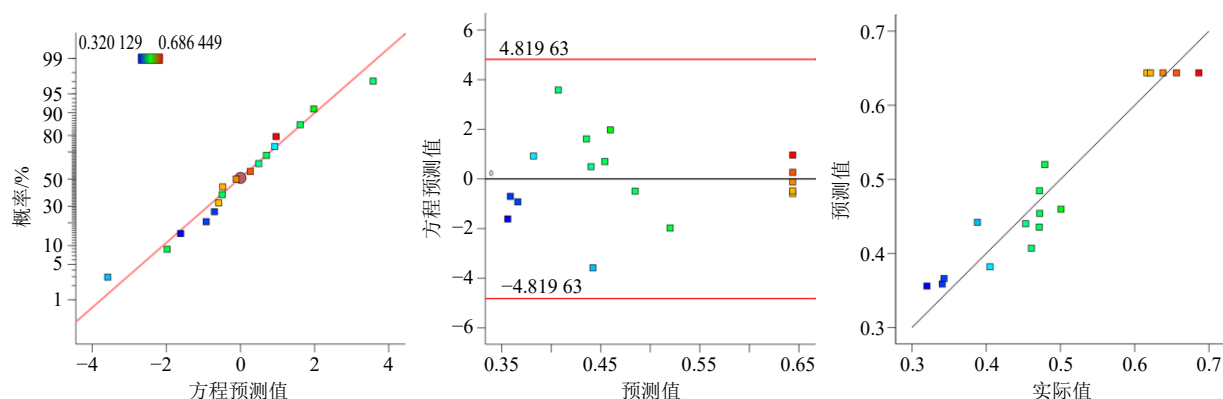


图 1 残差正态概率分布图 (A)、残差与方程预测值的对应关系图 (B) 和预测值与试验实际值的对应关系图 (C)

Fig. 1 Normal probability distribution of residuals (A), corresponding relationship between residuals and predicted values of the equation (B), and corresponding relationship between predicted values and actual experimental values (C)

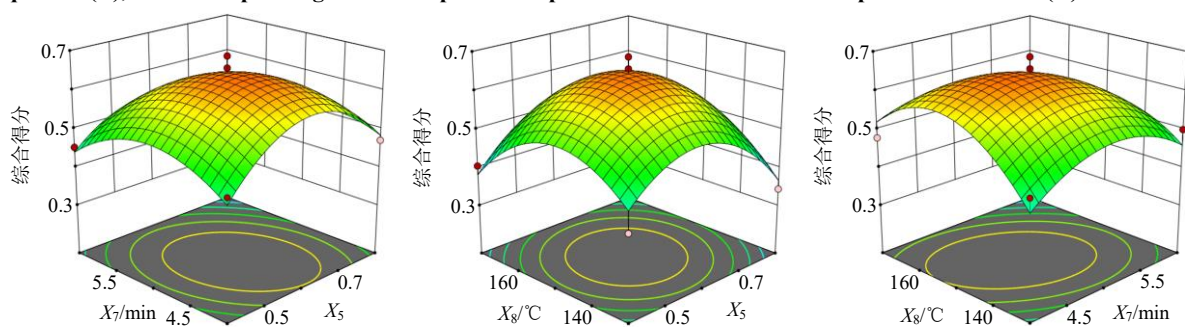


图 2 因素交互响应面图

Fig. 2 Factor interaction response surface diagram

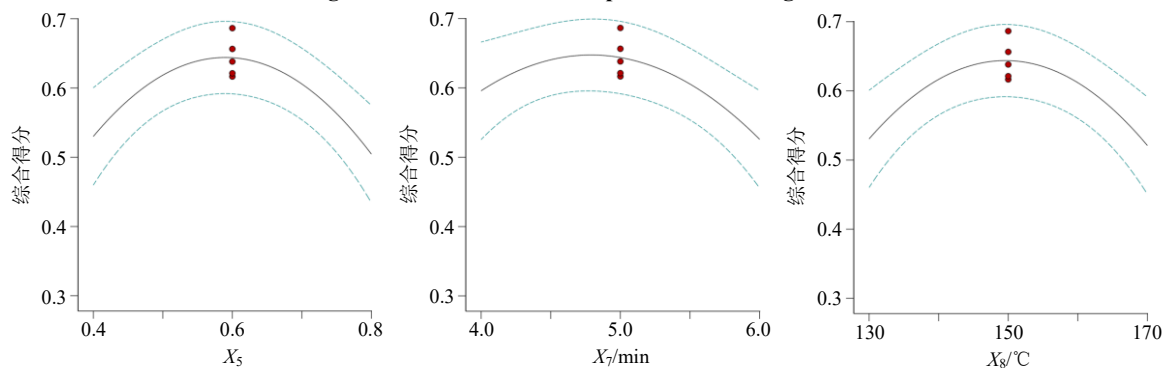


图 3 单因素响应图

Fig. 3 Single factor response diagram

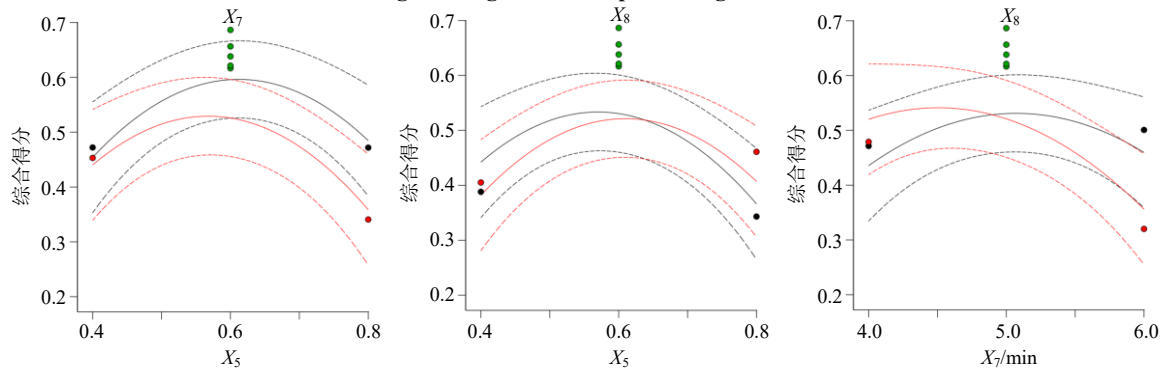


图 4 极端水平因素交互作用图

Fig. 4 Extreme level factor interaction diagram

表 9 参数优化限制 (编码后)

Table 9 Parameter optimization line limit table (coded)

名称	目标	最低限	最高限	重要性
X_3	界内	0.4 (-1)	0.8 (+1)	3
X_7/min	界内	4 (-1)	6 (+1)	3
$X_8/^\circ\text{C}$	界内	130 (-1)	170 (+1)	3
综合得分	最大化	0.320 129	1.000	3

2.8 验证实验

取同批次黄芪饮片 200 g, 按最佳优化工艺平行炮制 3 份, 实际测定数据见表 10, 归一化 (代入响应面优化数据) 及综合得分见表 11, 实验结果显示重复性样品综合得分与预测值差异较小, 工艺稳定可靠, 可为后期蜜炙工艺开发提供参考。

表 10 验证试验结果

Table 10 Verification test and results

序号	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	$Y_5/\%$	$Y_6/\%$	$Y_7/\%$
1	42.49	1.03	8.56	0.67	0.18	0.05	10.55
2	42.84	1.04	8.91	0.68	0.19	0.05	10.96
3	43.16	1.07	8.44	0.66	0.18	0.05	10.78

表 11 验证试验归一化结果

Table 11 Verification test and results (normalization)

序号	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y
1	0.766	0.786	0.527	0.314	0.837	0.523	0.974	0.638 1
2	0.704	0.808	0.709	0.337	0.916	0.650	0.780	0.660 2
3	0.731	0.994	0.761	0.291	0.809	0.765	0.724	0.678 1

3 讨论

黄芪为中医临床常用补气药材, 素有“十药九芪”之说^[18]。黄芪炮制方法有炒制, 盐制, 酒炙, 煮制, 蜜制, 醋制、辅药汁制、米汁制等多种炮制方法^[19]。黄芪蜜炙是由生黄芪充分吸收蜜液, 加热翻炒而得。中医理论认为黄芪蜜炙后可增强补中益气、升阳固表的效果, 从而用于脾肺气虚, 中气下陷等证。传统黄芪蜜炙工艺评价主要通过形态鉴定, 如饮片颜色、气味、触感等, 其炒制时间、温度、加蜜量、蜜水稀释比等变量没有具体参考值, 炙黄芪饮片质量控制仅依赖于炮制工作者丰富的炮制经验, 不同批次间容易出现质量参差不齐等问题^[2]。现代关于黄芪蜜炙工艺炮制文献或专利仅对于其指标性成分含量进行研究^[20], 而对其整体性活性成分含量研究较少, 此类工艺开发方法与中药“多成分、多靶点”的特点不相符合。本文立足于黄芪生产中

常用成分——浸出物、总皂苷、总黄酮、总多糖, 结合药典规定指标性成分毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷对黄芪蜜炙工艺进行考察、优化, 兼顾了中药多成分的特点, 采用响应面实验设计结合多属性决策的实验方法, 优化黄芪蜜炙工艺, 经优化后, 最佳工艺参数为黄芪闷润前需进行烘制, 试验过程中发现, 烘制后黄芪药材疏松, 吸蜜更均匀, 烘干后药材与蜜液混匀 (蜜液组成为炼蜜与水比例 1:0.603 4), 室温闷润 1 h, 炒制温度为 147.74 $^\circ\text{C}$, 炒制时间为 4.887 min, 成品综合得分为 0.645, 重复验证后中证明该工艺条件下黄芪蜜炙综合得分为 0.638 1~0.678 1, 接近优化值, 各基础参数变化幅度小, 该工艺稳定可行, 可为工业化生产炙黄芪饮片建立提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 315.
- [2] 蔡金坊. 蜜炙黄芪的质量评价及其蜜炙机理的初步探究 [D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [3] 黄云娟. 蜜炙黄芪炮制过程中的质量控制 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(6): 1336-1337.
- [4] 孙立立, 周倩, 阎雪生, 等. 一种蜜炙黄芪的炮制方法: 中国, CN103301183A [P]. 2013-09-18.
- [5] 杨志雄, 唐永红, 陈锡琨, 等. 正交实验法优选蜜炙黄芪的最佳炮制条件 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 722-723.
- [6] 宋崎, 宋英, 周小初, 等. 正交设计优选黄芪与炙黄芪的炮制工艺 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 474-476.
- [7] 徐泽水. 不确定多属性决策方法及应用/不确定理论与优化丛书 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 1-3.
- [8] 金新政, 厉岩. 优序图和层次分析法在确定权重时的比较研究及应用 [J]. 中国卫生统计, 2001, 18(2): 119-120.
- [9] 徐泽水, 达庆利. 衡量判断矩阵相容性的一个通用指标 [J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2001, 31(6): 94-97.
- [10] 吴云燕, 华中生, 查勇. AHP 中群决策权重的确定与判断矩阵的合并 [J]. 运筹与管理, 2003, 12(4): 16-21.
- [11] 闫书丽. 多属性决策与集成方法研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2005.
- [12] 刘凤波, 侯俊玲, 王文全, 等. 不同来源黄芪中黄芪总皂苷含量比较研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(8): 650-654.
- [13] 宋庆燕, 杨相, 张鲁, 等. 响应面法优化黄芪总多糖超声提取工艺 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(2): 44-47.

- [14] 王瑞海, 叶迎, 许京, 等. 甘肃红芪和黄芪总多糖含量测定对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 77-83.
- [15] 程研, 闵会, 何厚洪, 等. 紫外分光光度法测定不同产地黄芪总黄酮的含量 [J]. 江西中医药大学学报, 2015, 27(1): 58-60.
- [16] 袁惠君, 李欣, 贾鸿震, 等. 响应面法优化黄芪总黄酮提取工艺及初步纯化 [J]. 草业科学, 2019, 36(6): 1683-1691.
- [17] 马立平. 统计数据标准化: 无量纲化方法: 现代统计分析方法的学与用(三) [J]. 北京统计, 2000(3): 34-35.
- [18] 薛倩倩, 李爱平, 李科, 等. 黄芪的质量评价研究概述及质量标志物研究策略初探 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(12): 2459-2463.
- [19] 刘朝宏. 浅述蜜炙黄芪 [J]. 黑龙江中医药, 2002, 31(2): 56-64.
- [20] 吴思俊, 彭璐, 吴卫刚, 等. 黄芪炮制技术研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(22): 74-77.

[责任编辑 郑礼胜]