

• 药剂与工艺 •

基于 AHP-CRITIC 综合加权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选建曲发酵工艺

陈祥宁¹, 程世云^{2,3}, 李腾飞⁴, 程显隆⁵, 刘军玲^{2,3*}, 俞年军^{1*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051
3. 国家药监局中药质量研究与评价重点实验室, 安徽 合肥 230051
4. 安徽省万生中药饮片有限公司, 安徽 阜阳 236072
5. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629

摘要: 目的 优选建曲发酵工艺, 为建曲发酵的规范化生产提供参考依据。方法 以橙皮苷、柚皮素、橙皮素、醇溶性浸出物含量、糖化酶活力及外观性状为评价指标, 对炮制过程的发酵时间、发酵温度、相对湿度 (relative humidity, RH) 进行考察, 通过 AHP-CRITIC 综合加权法确定各评价指标的权重系数, 联合单因素实验与 Box-Behnken 设计-响应面法, 以综合评分作为评价指标, 优选最佳发酵工艺参数。结果 AHP-CRITIC 综合赋权法确定的橙皮苷、柚皮素、橙皮素、醇溶性浸出物含量及糖化酶活力和外观性状的权重系数分别为 0.070 2、0.107 1、0.078 0、0.058 5、0.235 4、0.450 8; 优选的建曲发酵工艺为将处方中各中药细粉、麦麸与面粉稀糊揉合均匀并压制成块后, 置发酵箱内, 在发酵温度 35 °C、RH 80%条件下连续发酵 23 h。平行 3 次的验证试验综合评分均值为 87.889, 与预测值的相对偏差为 1.07%, 且各质量指标的 RSD 均小于 3.0%。结论 采用响应面法建立的模型科学准确, 优选的建曲发酵工艺稳定可行, 可为以建曲为代表的发酵类中药规范化生产和质量标准提高提供参考依据。

关键词: 建曲; 发酵工艺; AHP-CRITIC 混合加权法; Box-Behnken 设计-响应面法; 橙皮苷; 柚皮素; 橙皮素; 酶活力

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)03-0785-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.006

Optimization of fermentation process of Jianqu based on AHP-CRITIC comprehensive weighting method combined with Box-Behnken design-response surface method

CHEN Xiangning¹, CHENG Shiyun^{2,3}, LI Tengfei⁴, CHENG Xianlong⁵, LIU Junling^{2,3}, YU Nianjun¹

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China
3. Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicines of National Medical Products Administration, Hefei 230051, China
4. Anhui Wansheng Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Fuyang 236072, China
5. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Abstract: Objective To optimize the fermentation process of Jianqu and provide reference for the standardized production of Jianqu fermentation. **Methods** Using the contents of hesperidin, naringenin, hesperetin and alcohol soluble extract, glucoamylase activity

收稿日期: 2024-09-27

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项 (2023YFC3504105)

作者简介: 陈祥宁, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准规范化。E-mail: 2281266385@qq.com

*通信作者: 刘军玲, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药质量研究与成分分析。E-mail: 2043270722@qq.com

俞年军, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药生物技术与栽培药材质量。E-mail: ynj2005288@sina.com

and appearance characteristics. as evaluation indexes, the fermentation time, fermentation temperature and relative humidity (RH) during processing were investigated, and the weight coefficients of each index were determined by AHP-CRITIC hybrid weighting method. Combined with single factor experiment and Box-Behnken design-response surface method, the comprehensive score was used as the evaluation index to optimize the fermentation process parameters. **Results** The weight coefficients of hesperidin, naringenin, hesperetin and alcohol soluble extract, glucoamylase activity and appearance traits determined by AHP-CRITIC comprehensive weighting method were 0.070 2, 0.107 1, 0.078 0, 0.058 5, 0.235 4 and 0.450 8, respectively. The optimal fermentation process of Jianqu was as follows: the fine powder of traditional Chinese medicine, wheat bran and flour paste in the prescription were evenly kneaded and pressed into blocks, and then placed in a fermentation box for continuous fermentation for 23 h at fermentation temperature of 35 °C and fermentation humidity of RH 80%. The average comprehensive score of three parallel verification tests was 87.889, the relative deviation from the predicted value was 1.07%, and the RSD of each quality index was less than 3.0%. **Conclusion** The model established by response surface method is scientific and accurate, and the optimized fermentation process of Jianqu is stable and feasible, which can provide reference for standardized production and quality standard improvement of fermented Chinese medicines represented by Jianqu.

Key words: Jianqu; fermentation process; AHP-CRITIC hybrid weighting method; Box-Behnken design-response surface method; hesperidin; naringenin; hesperetin; enzymatic activity

建曲是传统发酵类中药的代表性药物, 收录于《卫生部药品标准中药成方制剂》(第 17 册)(简称为《部颁标准》), 由辣蓼、苍耳草、青蒿等 21 味中药和辅料麦麸、面粉混合发酵而成, 具有理气化湿、芳香化浊、解表和中的功效^[1], 临床需求量较大。现代研究表明, 建曲经过发酵炮制后具有更加显著的调血脂、保护肝肾以及提高胃肠动力等药理作用^[2]。

目前, 市面上建曲的质量参差不齐, 不同生产厂家的建曲在色泽和气味等方面都存在较大差异。各省炮制规范中存在建曲处方组成和发酵终点的判断标准不够统一, 缺少建曲发酵的具体工艺参数及发酵类中药的质量评价方法等问题^[3-4], 说明建曲的发酵炮制工艺不统一, 生产工艺参数未细化是市场上建曲质量存在差异的一个重要因素。

本研究采用 AHP-CRITIC 综合加权法计算橙皮苷、柚皮素、橙皮素、醇溶性浸出物含量、糖化酶活力及外观性状 6 项质量指标的权重系数, 以综合评分为评价指标, 结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优选建曲发酵工艺, 从而确保建曲生产工艺的可控性, 提升建曲质量的稳定性, 为建曲的规范化生产和质量标准建立提供了参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

DTC-33J 型超声波清洗机, 鼎泰 (湖北) 生化科技设备制造有限公司; Acquity UPLC™ 型超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; XP26 型百万分之一电子分析天平、XP-205 型十万分之一电子分析天平, 瑞士 Mettler 公司; KS 4000 i control 型控温摇

床, 德国 IKA 集团; TGL-20000cR 型高速台式冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; DDL-1KW 型硅控可调万用电炉、XMTE-205 型水浴锅, 常州国宇仪器制造有限公司; UV-2700 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; FJX-192 型发酵箱, 杭州金竺机械有限公司; FD240 型电热恒温干燥箱, 德国 Binder 公司; Milli-Q 型超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

1.2 药材

建曲原料药材 (辣蓼、苍耳草、青蒿、苦杏仁、赤小豆、麦芽、谷芽、炒山楂、陈皮、广藿香、苍术、厚朴、川木香、白芷、槟榔、麸炒枳壳、薄荷、紫苏、香附、官桂、甘草) 由安徽省万生中药饮片有限公司采集, 经安徽省食品药品检验研究院刘军玲主任中药师鉴定, 辣蓼为蓼科蓼属植物辣蓼 *Persicaria hydropiper* (L.) Spach 的干燥全草, 苍耳草为菊科苍耳属植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder 的干燥地上部分, 青蒿为菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分, 苦杏仁为蔷薇科杏属植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子, 赤小豆为豆科豇豆属植物赤小豆 *Vigna umbellata* Ohwi et Ohashi 的干燥成熟种子, 麦芽为禾本科大麦属植物大麦 *Hordeum vulgare* L. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品, 谷芽为禾本科狗尾草属植物粟 *Setaria italica* (L.) Beauv. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品, 山楂为蔷薇科山楂属植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 陈皮为芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 广藿香为唇形科藿香属植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的

干燥地上部分，苍术为菊科苍术属植物北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎，厚朴为木兰科木兰属植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮，川木香为菊科川木香属植物川木香 *Vladimiria souliei* (Franch.) Ling 的干燥根，白芷为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根，槟榔为棕榈科槟榔属植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子，枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实，薄荷为唇形科薄荷属植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分，紫苏叶为唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶（或带嫩枝），香附为莎草科莎草属植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎，肉桂为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮，甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

1.3 试药

对照品柚皮素（批号 L21O10Q100513）、橙皮素（批号 C03F6Y1），均购自上海源叶生物科技有限公司，质量分数均 $\geq 98.0\%$ ；对照品橙皮苷（批号 110721-201818，质量分数 96.2%）、葡萄糖（批号 110833-202109，质量分数 99.9%），均购自中国食品药品检定研究院；3,5-二硝基水杨酸（3,5-dinitrosalicylic acid, DNS）为化学纯，上海麦克林生化科技有限公司；苯酚为分析纯，天津市大茂化学试剂厂；甲醇、95%乙醇、氢氧化钠、四水酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠、乙酸铵、冰醋酸、可溶性淀粉均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；乙腈、甲酸为色谱级，赛默飞世尔科技有限公司；超纯水由 Milli-Q 超纯水仪制备。

2 方法与结果

2.1 指标成分定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱（100 mm $\times$ 2.1 mm，1.8 μ m）；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~5 min，7%~14%乙腈；5~20 min，14%~24%乙腈；20~45 min，24%~55%乙腈；45~55 min，55%~70%乙腈；55~60 min，70%~7%乙腈；体积流量 0.2 mL/min；检测波长 300 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 1.0 μ L。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取建曲样品粉末 1.0 g，置于锥形瓶中，加入甲醇 20 mL，称定质

量，超声处理 30 min，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀滤过，滤液于 70 $^{\circ}$ C 水浴挥干，残渣加甲醇溶解定容至 5 mL 量瓶中，混匀，过 0.22 μ m 微孔滤膜，取续滤液，即得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷、柚皮素、橙皮素对照品适量，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，配制成单一对照品溶液，精密移取适量单一对照品溶液，配制成质量浓度分别为 927.1、112.9、116.8 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.1.4 专属性考察 分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液及建曲供试品溶液，照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 1。供试品溶液色谱在与混合对照品溶液色谱相应的保留时间处有相同的色谱峰，且空白溶剂无干扰，表明该方法专属性良好。

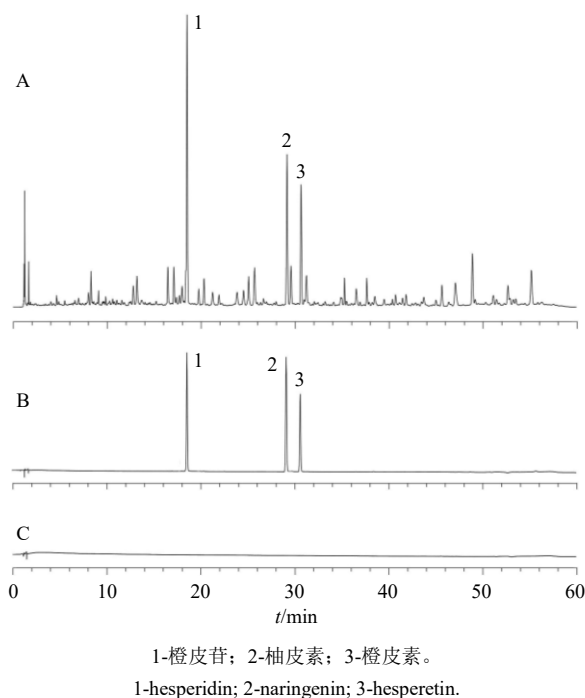


图 1 建曲样品 (A)、混合对照品 (B) 和空白溶剂 (C) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC of Jianqu sample (A), mixed reference substances (B) and blank solvent (C)

2.1.5 线性关系考察 精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液适量，逐级稀释，以甲醇配制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X)，以对应的峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，得到各组分的线性回归方程和线性范围分别为

橙皮苷 $Y=9.20 \times 10^5 X-2420.7$, $r=0.9997$, 线性范围 46.4~927.1 $\mu\text{g/mL}$; 柚皮素 $Y=1.00 \times 10^7 X-4497.8$, $r=0.9997$, 线性范围 5.6~112.9 $\mu\text{g/mL}$; 橙皮素 $Y=1.00 \times 10^7 X-4290.9$, $r=0.9997$, 线性范围 5.8~116.8 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明, 各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度考察 精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液 1 μL , 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得橙皮苷、柚皮素、橙皮素峰面积的 RSD 分别为 0.19%、0.17%、0.16%, 表明该仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性考察 取同一份供试品溶液(发酵 48 h 样品), 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别于放置后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 计算得橙皮苷、柚皮素、橙皮素峰面积的 RSD 分别为 1.04%、0.61%、1.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 重复性考察 精密称取同一批建曲样品(发酵 48 h 样品) 1.0 g, 共 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算得橙皮苷、柚皮素、橙皮素质量分数的 RSD 分别为 0.70%、1.07%、0.38%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率考察 精密称取已测知指标成分含量的建曲样品(发酵 48 h 样品) 0.5 g, 共 6 份, 按原有量与对照品 1:1 比例分别加入橙皮苷、柚皮素、橙皮素对照品适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算得橙皮苷、柚皮素、橙皮素的平均加样回收率分别为 92.02%、93.66%、86.02%, RSD 分别为 1.41%、2.28%、2.19%, 表明该方法准确性良好。

2.1.10 样品中 3 种指标成分的测定 取各待测样品, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 根据回归方程计算 3 种指标成分的含量。

2.2 糖化酶活力测定

2.2.1 供试品溶液的制备 称取 1.0 g 干燥建曲粉末, 精密移取 pH 4.5 醋酸铵缓冲溶液 10 mL, 混匀, 置 40 $^{\circ}\text{C}$ 控温摇床中保温振摇提取 1 h。8 000 r/min 离心(离心半径 11 cm) 10 min, 取上清液即为粗酶液。取 2% 可溶性淀粉溶液 200 μL 于离心管内, 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。预热酶液, 精密吸取酶液 50 μL 于离心管中, 继续 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 立即加入 2% NaOH 溶液 50 μL 终止反应。加入 DNS 试剂 500

μL , 加水定容至 5 mL, 沸水浴 10 min 显色, 冷却至室温, 即得供试品溶液。

2.2.2 空白对照溶液的制备 将粗酶液沸水浴处理 5 min, 得到灭活酶液。取 2% 可溶性淀粉溶液 200 μL , 精密吸取灭活酶液 50 μL 于离心管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 立即加入 2% NaOH 溶液 50 μL , 再加入 DNS 试剂 500 μL , 加水定容至 5 mL, 沸水浴 10 min 显色, 冷却至室温, 即得空白对照溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖对照品适量, 加水配制成质量浓度为 2.0 mg/mL 的对照品溶液, 精密加入 DNS 试剂 500 μL , 再加水定容至 5 mL, 沸水浴 10 min 显色, 冷却至室温, 即得对照品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 葡萄糖对照品溶液(2.0 mg/mL) 分别置于离心管中, 按照“2.2.3”项下方法制备不同质量浓度的对照品溶液, 在 540 nm 波长下测定吸光度(A) 值。以 A 值为纵坐标(Y), 葡萄糖浓度为横坐标(X) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 求得回归方程为 $Y=0.6730X-0.3064$, $r=0.9979$, 线性范围为 0.4~2.7 $\mu\text{mol/mL}$ 。

2.2.5 精密度考察 取同一份供试品溶液(发酵 48 h 样品), 在 540 nm 波长下平行测定 6 次 A 值, 求得 A 值的 RSD 为 0.11%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取同一份供试品溶液(发酵 48 h 样品), 分别于溶液制备后 0、2、4、8、12、24 h, 在 540 nm 波长下测定 A 值, 求得 A 值的 RSD 为 1.84%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性考察 精密称取同一批建曲样品(发酵 48 h 样品) 1.0 g, 共 6 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在 540 nm 波长下测定 A 值, 求得葡萄糖质量分数的 RSD 为 1.76%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密称取已测定葡萄糖含量的建曲样品(发酵 48 h 样品) 0.5 g, 共 6 份, 按“2.2.1”项下方法提取粗酶液, 待酶解完成后加入葡萄糖 902.7 μg , 再继续按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在 540 nm 波长下测定 A 值, 求得葡萄糖的平均加样回收率为 102.62%, RSD 为 2.28%, 表明该方法准确度良好。

2.2.9 样品中糖化酶活力的测定 采用 DNS 比色法测定建曲中的糖化酶活力^[5-6]。按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备空

白对照溶液，于 540 nm 波长处测定各样品的 A 值。以 40 ℃、pH 4.5 时，每克建曲 1 min 内水解可溶性淀粉产生 1 μmol 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位 (U/g)。

2.3 醇溶性浸出物含量测定

取建曲样品粉末 2 g，精密称定，按照《中国药典》2020 年版四部通则 2201 醇溶性浸出物测定法项下的热浸法，以稀乙醇作为溶剂进行测定^[7]。

2.4 外观性状评分

参照外观性状评分方法^[8]，根据《卫生部药品标准中药成方制剂》(第 17 册)对建曲发酵终点“遍起白霉，有酒香气”的性状描述^[1]，本实验选择表面颜色和气味为指标，每项指标总分 10 分，评分 = 表面颜色得分 $\times$ 80% + 气味得分 $\times$ 20%，具体评分标准见表 1。

表 1 建曲外观性状评分标准

Table 1 Appearance scoring criteria of Jianqu

指标	分值 (7~10)	分值 (4~6)	分值 (0~3)
表面颜色	遍布白霉	少量白霉	白霉泛黑
气味	酒香气浓	微有酒香气	无酒香气

2.5 综合评分的计算

2.5.1 AHP 法确定权重系数 (ω_{AHP}) AHP 法是将决策者的经验判断予以量化的主观赋权法^[9-11]。“辨状论质”是极具中医药特色的质量评价体系，“状”是指药材的外观性状，“质”则是指药材的内在品质，中药的外观性状与其内在品质密切相关，性状特征能够在一定程度上反映药材的品质优劣^[12]。基

于课题组前期研究结果，本实验遵循“辨状论质”理论，采用外观性状与内在成分含量相结合的质量评价方法，以外观性状评分 (表面颜色、气味) 和内在含量评价 (橙皮苷、柚皮素、橙皮素和醇溶性浸出物含量、糖化酶活力) 作为指标。

由于外观性状和内在含量评价具有同等重要作用，因此外观性状排序应优先于各项含量评价内容。在含量评价内容中，包括醇溶性浸出物含量、3 种主要化学成分含量、糖化酶活力，由于建曲成分复杂，活性成分尚不明确，多种成分含量普遍较低，醇溶性浸出物作为指标能够有效控制质量；柚皮素和橙皮素主要由苷类成分经水解生成，是发酵后含量显著上升的 2 种成分，对建曲的质量评价具有重要意义；橙皮苷是建曲中含量最高的成分，但其生物利用度较低；糖化酶具有一定活性，作为新增的酶活性指标对发酵工艺的控制具有参考意义。

经过主观分析，确定各指标的优先顺序，即外观性状 > 醇溶性浸出物 > 柚皮素 > 橙皮素 > 橙皮苷 > 糖化酶，采用 1~9 标度法对 6 项指标进行两两比较，构建优先判断矩阵，结果见表 2。计算得到橙皮苷含量、柚皮素含量、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量、外观性状评分 6 项指标的 ω_{AHP} 分别为 0.081 6、0.126 5、0.102 5、0.060 6、0.255 0、0.373 7，对所得 ω_{AHP} 进行一致性检验，得到一致性指标 (consistency index, CI) = 0.043，一致性比率 (consistency ratio, CR) = 0.035 < 0.1，表明矩阵符合一致性检验，权重系数合理有效。

表 2 AHP 法指标成对比较的判断优先矩阵及权重系数

Table 2 Judgment priority matrix and weight coefficient for pairwise comparison of AHP indicators

指标	橙皮苷	柚皮素	橙皮素	糖化酶	醇溶性浸出物	外观性状	ω_{AHP}	CI	CR
橙皮苷	1	1/2	1/2	2	1/3	1/4	0.081 6	0.043	0.035
柚皮素	2	1	2	2	1/3	1/4	0.126 5		
橙皮素	2	1/2	1	2	1/3	1/4	0.102 5		
糖化酶	1/2	1/2	1/2	1	1/4	1/4	0.060 6		
醇溶性浸出物	3	3	3	4	1	1/2	0.255 0		
外观性状	4	4	4	4	2	1	0.373 7		

2.5.2 CRITIC 法确定权重系数 (ω_{CRITIC}) CRITIC 法是完全依据数据本身属性而进行科学评价的客观赋权法^[13]。为方便赋权计算，要对指标进行无量纲化处理，将橙皮苷含量、柚皮素含量、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量、外观性状评分 6 项指标的原始数据进行归一化处理，本实验所用指标均为正向指标，因此采用公式 $Y = (Y - Y_{\min}) /$

$(Y_{\max} - Y_{\min})$ 进行归一化^[14]，使用 SPSSAU 24.0 在线统计软件处理数据，计算得到橙皮苷含量、柚皮素含量、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量、外观性状评分 6 个指标的 ω_{CRITIC} 分别为 0.154 7、0.152 1、0.136 7、0.173 6、0.165 9、0.216 8。

2.5.3 AHP-CRITIC 法确定综合权重系数 ($\omega_{\text{综合}}$) AHP 法计算权重系数时主观性强于 CRITIC 法，而

CRITIC 法相比于 AHP 法更能客观评价各指标的权重系数,将 2 种方法相结合,即主观评价与客观评价相结合,能够更加科学合理地综合评价各指标^[15]。计算公式为 $\omega_{\text{综合}} = \omega_{\text{AHP}} \omega_{\text{CRITIC}} / \sum \omega_{\text{AHP}} \omega_{\text{CRITIC}}$, 计算得到橙皮苷含量、柚皮素含量、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量、外观性状评分 6 个指标的 $\omega_{\text{综合}}$ 分别为 0.070 2、0.107 1、0.078 0、0.058 5、0.235 4、0.450 8。

2.5.4 综合评分计算方法 根据各试验结果和 AHP-CRITIC 法计算的 $\omega_{\text{综合}}$, 按照公式综合评分 = (橙皮苷含量/橙皮苷含量最大值) × 0.070 2 + (柚皮素含量/柚皮素含量最大值) × 0.107 1 + (橙皮素含量/橙皮素含量最大值) × 0.078 0 + (糖化酶活力/糖化酶活力最大值) × 0.058 5 + (醇溶性浸出物含量/醇溶性浸出物含量最大值) × 0.235 4 + (外观性状评分/外观性状评分最大值) × 0.450 8, 计算各个试验的综合评分。

2.6 单因素试验

2.6.1 发酵时间考察 参考《部颁标准》中收录建曲的处方组成和配比^[1], 将各中药细粉、麦麸与面粉稀糊揉合均匀, 压制成块, 置发酵箱内, 在温度 35 ℃、相对湿度 (relative humidity, RH) 80% 条件下分别发酵 12、24、36、48 h。依据橙皮苷、柚皮素、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量测定结果和外观性状评分 (表 3), 按照 AHP-CRITIC 法计算综合评分, 结果分别为 61.88、91.50、67.62、55.36。综合评分在发酵 24 h 时达到最大值, 因此将 24 h 定为响应面试验中发酵时间的中心点, 对 12、24、36 h 这 3 个水平进行优化。

表 3 发酵时间考察结果

Table 3 Investigation results of fermentation time

发酵时间/h	质量分数/(mg·g ⁻¹)			糖化酶/ (U·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%	外观性状评分	综合评分
	橙皮苷	柚皮素	橙皮素				
12	5.911 0	0.123 6	0.077 7	42.43	31.19	4.0	61.88
24	5.780 6	0.275 7	0.153 8	113.17	27.68	7.8	91.50
36	5.905 9	0.305 6	0.180 5	134.77	24.76	3.4	67.62
48	6.026 5	0.332 9	0.195 4	107.71	24.37	1.2	55.36

2.6.2 发酵温度考察 参考《部颁标准》中收录建曲的处方组成和配比^[1], 将各中药细粉、麦麸与面粉稀糊揉合均匀, 压制成块, 置发酵箱内, 分别在温度 30、35、40、45 ℃, RH 80% 条件下发酵 24 h。依据橙皮苷、柚皮素、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量测定结果和外观性状评分 (表

4), 按照 AHP-CRITIC 法计算综合评分, 结果分别为 62.32、92.02、66.67、61.32。综合评分在 35 ℃ 发酵时达到最大值, 因此将 35 ℃ 定为响应面试验中发酵温度的中心点, 对 30、35、40 ℃ 这 3 个水平进行优化。

表 4 发酵温度考察结果

Table 4 Investigation results of fermentation temperatures

发酵温度/℃	质量分数/(mg·g ⁻¹)			糖化酶/ (U·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%	外观性状评分	综合评分
	橙皮苷	柚皮素	橙皮素				
30	5.723 6	0.165 4	0.103 2	64.25	18.70	5.2	62.32
35	5.892 1	0.269 8	0.145 7	114.28	27.32	8.0	92.02
40	5.676 7	0.249 7	0.146 6	42.26	25.89	4.4	66.67
45	5.254 3	0.232 4	0.103 4	38.84	25.66	4.0	61.32

2.6.3 RH 考察 参考《部颁标准》中收录建曲的处方组成和配比^[1], 将各中药细粉、麦麸与面粉稀糊揉合均匀, 压制成块, 置发酵箱内, 分别在 RH 60%、70%、80%、90%, 温度 35 ℃ 条件下发酵 24 h。依据橙皮苷、柚皮素、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量测定结果和外观性状评分, 按照 AHP-CRITIC 法计算综合评分 (表 5), 结果分别为 58.30、86.13、91.65、81.44。综合评分在 RH 80% 发酵时达到最大值, 因此将 RH 80% 定为响应面试验中 RH 的中心点, 对 RH 70%、80%、90% 这 3 个水平进行优化。

表 5 RH 考察结果

Table 5 Investigation results of RH

RH/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)			糖化酶/ (U·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%	外观性状评分	综合评分
	橙皮苷	柚皮素	橙皮素				
60	5.011 4	0.171 7	0.060 6	71.06	26.53	3.8	58.30
70	5.853 0	0.241 3	0.110 2	60.35	25.76	8.0	86.13
80	5.912 9	0.266 5	0.155 2	112.75	28.01	7.8	91.65
90	5.364 3	0.286 3	0.152 6	43.37	24.59	7.0	81.44

2.7 BBD-RSM 优选建曲发酵工艺

2.7.1 BBD-RSM 试验设计及结果 在前期单因素试验的基础上, 以发酵时间 (X_1)、发酵温度 (X_2)、RH (X_3) 为考察因素, 因素水平见表 6。以橙皮苷含量、柚皮素含量、橙皮素含量、糖化酶活力、醇溶性浸出物含量、外观性状评分 6 个指标的综合评分为响应值, 应用 BBD-RSM, 利用 Design Expert 13 软件进行 3 因素 3 水平 17 个试验点的设计, 得到的 17 种实验方案与综合评分结果见表 6。

2.7.2 模型拟合与方差分析 利用 Design Expert 13 软件对表 6 试验数据进行多元回归拟合, 得到回

归方程: 综合评分 $Y=89.400-3.050 X_1-2.810 X_2-0.5979 X_3+0.0398 X_1 X_2-1.140 X_1 X_3-2.900 X_2 X_3-24.060 X_1^2-6.590 X_2^2-8.850 X_3^2$ 。

方差分析结果见表 7。建立的回归模型 $F=55.890$, $P<0.0001$, 失拟项 $F=1.970$, $P=0.2607>0.05$, 表明此方程的回归模型度良好, 具有统计学意义, 失拟项不显著, 试验受到未知因素的影响较小。模型 R^2 为 0.9686, R_{pred}^2 为 0.8604, 表明方程

表 6 BBD-RSM 试验设计及结果

Table 6 Experimental design and results of BBD-RSM experiment

试验号	X_1/h	$X_2/^\circ C$	$X_3/\%$	质量分数/(mg·g ⁻¹)			糖化酶/(U·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%	外观性状评分	综合评分
				橙皮苷	柚皮素	橙皮素				
1	12 (-1)	30 (-1)	80 (0)	5.920 7	0.150 3	0.115 2	41.48	28.81	4.8	63.17
2	36 (+1)	30	80	6.784 2	0.396 2	0.203 2	85.67	22.91	2.4	58.50
3	12	40 (+1)	80	6.159 9	0.192 8	0.134 0	37.95	28.83	3.6	58.92
4	36	40	80	6.719 2	0.425 3	0.222 4	73.08	23.21	1.4	54.42
5	12	35 (0)	70 (-1)	6.974 9	0.180 2	0.128 8	43.28	28.58	4.0	61.31
6	36	35	70	6.690 8	0.404 5	0.200 4	79.85	23.20	1.9	55.95
7	12	35	90 (+1)	6.380 2	0.180 7	0.132 9	42.29	27.95	3.8	59.31
8	36	35	90	7.146 5	0.436 2	0.226 3	58.82	22.50	0.5	49.41
9	24 (0)	30	70	6.658 8	0.254 5	0.133 5	91.73	26.36	6.0	73.66
10	24	40	70	6.587 1	0.284 3	0.154 7	85.62	27.15	5.4	72.38
11	24	30	90	6.735 1	0.344 0	0.174 5	94.37	24.96	7.0	81.34
12	24	40	90	6.062 2	0.358 1	0.206 5	76.02	26.53	4.2	68.45
13	24	35	80	5.950 7	0.252 8	0.152 5	114.43	28.14	9.0	91.22
14	24	35	80	5.843 0	0.266 5	0.147 1	111.88	27.65	8.8	89.73
15	24	35	80	6.350 0	0.260 6	0.145 3	113.37	27.92	8.8	90.32
16	24	35	80	5.859 4	0.259 9	0.149 5	114.25	28.02	8.8	90.09
17	24	35	80	6.399 6	0.264 3	0.146 4	110.38	27.08	8.0	85.65

表 7 拟合回归方程的方差分析结果

Table 7 ANOVA results for fitting regression equations

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	3 348.31	9	372.03	55.890 0	<0.000 1	X_2^2	182.97	1	182.97	27.490 0	0.001 2
X_1	74.53	1	74.35	11.200 0	0.012 3	X_3^2	329.60	1	329.60	49.520 0	0.000 2
X_2	63.30	1	63.30	9.510 0	0.017 7	残差	46.59	7	6.66		
X_3	2.86	1	2.86	0.429 7	0.533 1	失拟项	27.78	3	9.26	1.970 0	0.260 7
$X_1 X_2$	0.01	1	0.01	0.001 0	0.976 2	纯误差	18.81	4	4.70		
$X_1 X_3$	5.16	1	5.16	0.774 7	0.408 0	总离差	3 394.91	16			
$X_2 X_3$	33.69	1	33.69	5.060 0	0.059 2	R^2	0.99				
X_1^2	2 436.63	1	2 436.63	366.080 0	<0.000 1	R_{adj}^2	0.97				

拟合度较好, 模型预测性能良好, 可应用此模型来开展预测与分析^[16]。一次项 X_1 、 X_2 的 P 值均小于 0.05, 其对建曲发酵工艺有显著性影响, $P_{X_1}<P_{X_2}<P_{X_3}$, 表明各因素对综合评分的影响程度为 $X_1>X_2>X_3$, 即发酵时间>发酵温度>RH; 交互项 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 的 P 值均大于 0.05, 说明 3 者之间的交互作用均不显著; 二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 P 值均小于 0.01, 有极显著性影响。

2.7.3 交互作用分析 利用 Design Expert 13 软件

绘制发酵时间、发酵温度和 RH 的交互作用对建曲发酵工艺综合评分影响的 3D 响应面图, 结果见图 2。通过响应曲面 3D 图倾斜度可以确定两者对响应值的影响程度, 倾斜度越高, 说明两者交互作用越显著; 等高线图呈椭圆形表示两因素交互作用显著, 呈圆形表示两因素交互作用不显著, 2 个因素间不是简单的线性关系。从图 2 中可以看出 X_1 与 X_2 , X_1 与 X_3 的交互作用比较显著, X_2 与 X_3 的交互作用不显著。

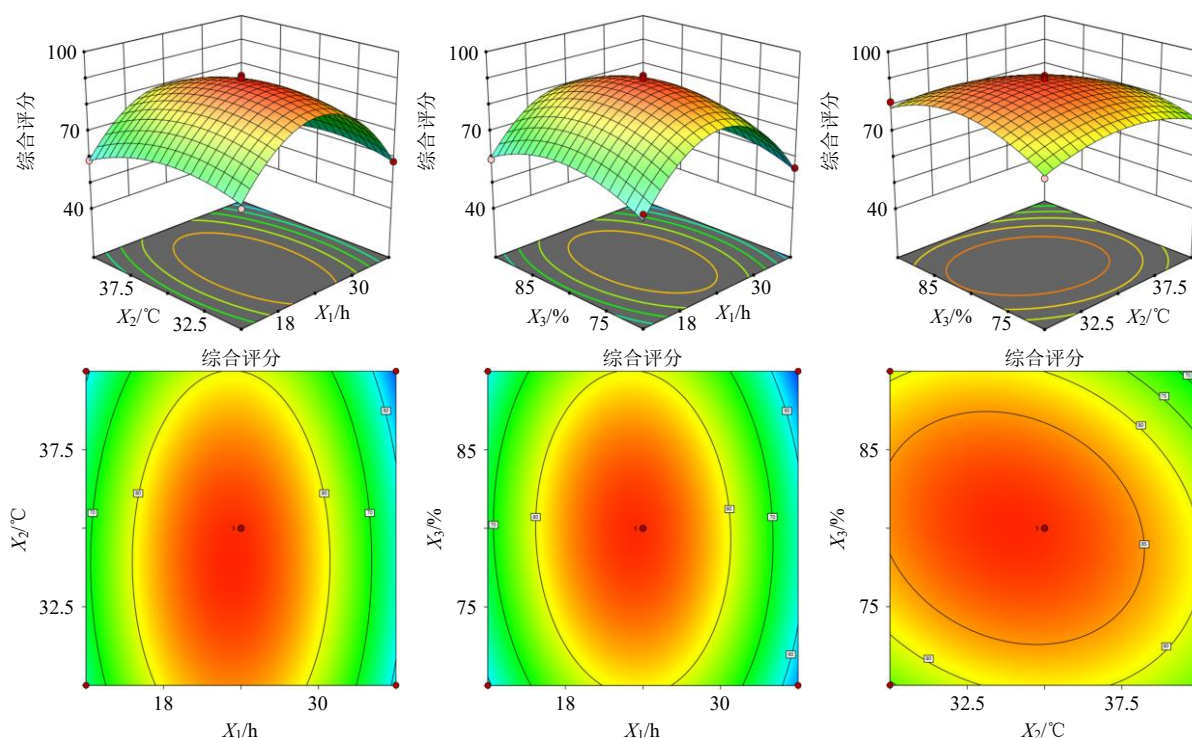


图 2 各因素相互作用响应面分析图

Fig. 2 Analysis graphics of interaction response surface of each factor

2.7.4 最佳发酵工艺预测及试验验证 以综合评分最大值为筛选条件, 根据模型拟合结果, 得到建曲的最佳发酵工艺为发酵时间 23.236 h, 发酵温度 33.929 °C, RH 80.051%, 综合评分理论值为 89.796。结合实际情况, 最终确定建曲发酵工艺为发酵时间 23 h, 发酵温度 35 °C, RH 80%。在此条件下进行 3 组验证试验, 结果见表 8。3 次验证试验的平均综合评分为 87.889, 与预测值的相对偏差为 1.07%, 与预测结果比较接近, 且各指标的 RSD 均小于 3.0%, 说明所建立的模型具有良好的预测性, 优选的建曲发酵工艺稳定可行。

表 8 验证试验结果

Table 8 Verify test results

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			糖化酶/ (U·g ⁻¹)	醇溶性浸 出物/%	外观性 状评分	综合 评分
	橙皮苷	柚皮素	橙皮素				
1	7.082 8	0.280 4	0.150 1	103.27	27.01	8.6	89.42
2	6.781 5	0.270 1	0.147 1	105.81	26.97	8.4	87.87
3	6.801 6	0.266 9	0.142 0	104.39	26.75	8.2	86.38
RSD/%	2.45	2.58	2.80	1.22	0.52	2.38	1.73

3 讨论

建曲的发酵过程, 实质上是借助微生物和酶的催化分解作用, 使药物发泡, 产生次生代谢物、消化酶等活性成分, 从而达到增强药效的目的^[17]。课

题组前期研究发现, 建曲在发酵过程中柚皮素、橙皮素的含量持续上升, 橙皮苷的含量先降低后上升, 可能是因为部分微生物产生了能够降解柚皮苷和橙皮苷的酶, 使其发生分解并生成代谢产物。有研究表明^[18-19], 建曲在发酵过程中真菌群落的多样性和丰富度明显比细菌高, 建曲真菌的优势类群为曲霉属。黑曲霉是曲霉属真菌的 1 个常见菌种, 能够产生柚皮苷酶和橙皮苷酶, 黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* TC-01 产生的柚皮苷酶可将柚皮苷去糖基化生成柚皮素^[20], 菌株 *Aspergillus niger* CP-2 产生的橙皮苷酶可将橙皮苷脱糖基化生成橙皮素-7-O-葡萄糖苷和橙皮素^[21], 致其含量下降; 随着发酵时间的推移, 可能由于建曲中真菌群落的多样性和丰富度呈下降趋势, 且菌种的产酶能力有限, 酶解反应体系的转化能力逐渐趋于饱和, 橙皮苷含量又在这一阶段得到富集。

建曲具有理气化湿、芳香化浊、解表和中的功效。中医理论认为, 湿阻与高脂血症的发生发展密切相关^[22], 因此, 建曲在临床上不仅可以用于食积、湿阻等症的治疗, 还具有显著的调血脂及保肝作用等^[23]。建曲中含有柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、柚皮素、芹菜素、橙皮素等多种黄酮类成分^[24-25], 经过发酵炮制后, 建曲中的橙皮苷、柚皮

素、橙皮素含量总体呈上升趋势, 并且成为建曲中含量最高的 3 个成分, 其药理作用与建曲的功效紧密关联。橙皮苷可调节肝脏脂质代谢和围脂滴蛋白 1 (Perilipin 1, *PLIN1*) 基因表达^[26]、改善急性肾损伤^[27]。柚皮素可降低血脂^[28], 抑制胃癌细胞内基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 及 MMP-9 的表达, 起到抗癌的作用^[29]。橙皮素可减轻高脂血症所致的血管内皮损伤^[30], 抑制肝癌进程^[31]。此外, 建曲发酵过程中产生的淀粉酶、蛋白酶、糖化酶等消化酶, 在成品中仍保持部分活性, 可促进食物消化, 改善肠胃功能^[32]。

传统建曲的发酵条件不够规范严格, 成品的质量评价仅通过经验鉴别, 对评价人员的理论实践经验要求较高且主观性强, 而中药质量的优劣应该是由外观性状和内在含量综合决定。AHP 法是将决策者的经验判断予以量化的主观赋权法, CRITIC 法是完全依据数据本身属性而进行科学评价的客观赋权法, AHP-CRITIC 评分法是将主观与客观评价相结合, 能够更加科学合理地综合评价各指标。本研究以橙皮苷、柚皮素、橙皮素 3 种主要化学成分和醇溶性浸出物含量、糖化酶活力、外观性状评价为质量指标, 采用 AHP-CRITIC 综评分法评价建曲发酵成品的质量优劣, 得到评价特色鲜明, 考察指标全面的评判标准。

在单因素试验的基础上, 结合 BBD-RSM 优选建曲发酵工艺, 最终确定建曲的最佳发酵工艺为将处方中各中药细粉、麦麸与面粉稀糊揉合均匀并压制成块后, 置发酵箱内, 在发酵温度 35 °C、RH80% RH 条件下连续发酵 23 h。经试验验证, 该工艺稳定可行, 可为后续建立建曲的发酵炮制规范和质量标准提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十七册 [S]. 1998: 142.
- [2] 李德华, 王瑞生, 张振凌, 等. 基于 LKB1-AMPK 通路及 16S rDNA 测序技术研究“新建曲”发酵炮制前后降脂功效差异及作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2146-2159.
- [3] 任可心. 曲类中药的应用及研究进展 [J]. 吉林医学, 2024, 45(4): 934-937.
- [4] 王郡瑶, 程显隆, 李婷, 等. 发酵类中药质量控制现状和问题 [J]. 中国食品药品监管, 2022(2): 60-68.
- [5] 徐云, 郑璐, 相宏宇, 等. 六神曲发酵过程中 5 种消化酶的动态分析 [J]. 中国酿造, 2012, 31(10): 43-45.
- [6] 王海洋, 高文远, 张丽霞. 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2084-2087.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 59-60.
- [8] 吴松南, 王静, 袁子民. 基于多功能炒药机与 Box-Behnken 设计-效应面法优化萸黄连炮制工艺 [J]. 中国药物经济学, 2023, 18(7): 99-103.
- [9] 陈凤, 张小燕, 张跃进, 等. 基于 AHP-CRITIC 法结合响应曲面法多指标优选天麻鲜切片加工工艺 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4338-4349.
- [10] 陈晶, 王炳然, 张森, 等. 基于 Box-Behnken 响应面法结合层次分析法-熵权法优化米炒人参炮制工艺 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(6): 1384-1388.
- [11] 黄宝泰, 刘星彤, 毛英民, 等. 响应面法结合层次分析法优化酒炙菟丝子的炮制工艺 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1890-1894.
- [12] 李佳园, 魏晓嘉, 万国慧, 等. “辨状论质”的历史沿革与现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 189-196.
- [13] 丁涵, 徐忠坤, 王振中, 等. 基于 AHP-CRITIC 混合加权法和 Box-Behnken 设计-响应面法优化羌芩颗粒成型工艺及其物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 787-797.
- [14] 张佳旭, 黄成凤, 朱兴龙, 等. 基于 CRITIC 结合 Box-Behnken 响应面法的厚朴产地趁鲜加工与炮制一体化工艺研究 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5560-5567.
- [15] 欧则民, 王锦玉, 张冰冰, 等. 基于 AHP-CRITIC 优选茯苓舒筋颗粒的提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3481-3487.
- [16] 杨静容, 陈亚楠, 肖春萍, 等. 响应面法优化盐关黄柏炮制工艺及其成分与色度相关性分析 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5093-5103.
- [17] 刘莹, 郭二燕, 冯锋, 等. 曲类中药发酵炮制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(10): 1371-1381.
- [18] 谭斯尹, 潘礼业, 罗宇琴, 等. 基于高通量测序分析建曲发酵过程中微生物多样性变化 [J]. 中国现代中药, 2024, 26(1): 104-112.
- [19] Zhang Z B, Li H, Xu T, *et al.* Jianqu fermentation with the isolated fungi significantly improves the immune response in immunosuppressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113512.
- [20] 邓媛, 毛勇, 王燕, 等. 黑曲霉 TC-01 产柚苷酶对柚皮苷酶解作用的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2012(3): 108-111.
- [21] 陈玉婷, 刘昊澄, 徐玉娟, 等. 黑曲霉转化橙皮苷制备橙皮素的条件优化及其抗氧化活性的比较 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 1-11.

- [22] 刘美之, 王俊林, 边爱忠, 等. 从中医痰湿体质论治高脂血症研究进展 [J]. 陕西中医, 2024, 45(5): 719-721.
- [23] 王瑞生, 李德华, 张振凌, 等. 部颁方建曲发酵炮制对高脂血症大鼠的降脂作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(10): 41-48.
- [24] 孙梦梅, 王瑞生, 张振凌, 等. 基于指纹图谱及化学计量学研究不同发酵程度建曲中成分变化 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4340-4349.
- [25] Wang Y S, Wang R S, Zhang Z L, *et al.* Analysis of chemical constituents of traditional Chinese medicine jianqu before and after fermentation based on LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2022, 28(1): 53.
- [26] 燕炯, 杨佳敏, 许祥, 等. 橙皮苷对高脂饮食诱导 NAFLD 小鼠及其 PLIN1 基因表达的影响 [J]. 中药材, 2023, 46(4): 1016-1020.
- [27] 徐祖清, 王诗洋, 王泉, 等. 橙皮苷对庆大霉素致小鼠急性肾损伤及炎症和凋亡的影响 [J]. 中成药, 2024, 46(6): 1835-1841.
- [28] Yang Y, Trevethan M, Wang S, *et al.* Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 104: 108967.
- [29] 贾淼, 师阿盟, 史海涛, 等. 柚皮素对人胃癌 SGC-7901 细胞株增殖和转移能力的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(3): 218-222.
- [30] 霍娉婷, 张昕怡, 翟鑫铎, 等. 橙皮素对高脂血症大鼠的血管内皮保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(1): 61-65.
- [31] 李晓媛, 郭昊翊, 郭敏娟, 等. 橙皮素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 348-352.
- [32] 王郡瑶, 程显隆, 李明华, 等. 基于衍生化-HPLC 测定酶解葡萄糖的方法评价六神曲中糖化酶活力 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 121-126.

[责任编辑 郑礼胜]