

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)10-0048-08  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.10.010



# CRITIC - AHP 复合赋权法结合 Box - Behnken 响应面法 优选蜜桑叶炒制工艺\*

陈泽键<sup>1,2</sup>, 徐晓青<sup>1</sup>, 韩燕全<sup>1,2</sup>, 朋汤义<sup>1,2△</sup>

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230031)

**摘要:**目的 优选蜜桑叶的炒制工艺。方法 以炒制温度、炒制时间、辅料用量为考察因素,以绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、醇溶性浸出物、总黄酮、水分为指标成分,采用 CRITIC 熵权法及层次分析法(AHP)确定各指标成分的权重,以上述指标成分的综合评分为评价指标,采用 Box - Behnken 响应面法优选蜜桑叶炒制工艺并验证。结果 优选的炒制工艺为加 25% 辅料,170 °C 炒制 10 min。绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、醇溶性浸出物、总黄酮平均含量分别为 1.412, 1.038, 2.207, 1.231, 31.816, 106.702 mg / g, 水分平均含量为 10.99%。综合评分的理论值为 98.019 分,实测值(97.585 分)与之接近(RSD 为 0.843%)。结论 优选出的蜜桑叶炒制工艺稳定、合理、可行,可为蜜桑叶的工业化生产提供依据。

**关键词:** 蜜桑叶;炒制工艺;Box - Behnken 响应面法;CRITIC 熵权法;层次分析法;超高效液相色谱法

## Optimization of Stir - Frying Process of Honey - Roasted Mori Folium Based on CRITIC - AHP Composite Weighting Method Combined with Box - Behnken Response Surface Methodology

CHEN Zejian<sup>1,2</sup>, XU Xiaqing<sup>1</sup>, HAN Yanquan<sup>1,2</sup>, PENG Tangyi<sup>1,2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230031)

**Abstract: Objective** To optimize the stir - frying process of honey - roasted Mori Folium. **Methods** Chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, astragaloside, ethanol - soluble extractives, total flavonoids and moisture were used as the indicator components. The CRITIC - entropy weight method and analytic hierarchy process (AHP) were used to determine the weights of each indicator component. The stir - frying process of honey - roasted Mori Folium was optimized by the Box - Behnken response surface methodology, with the stir - frying temperature, stir - frying time and excipient amount as the investigation factors, and with the comprehensive score of the above indicator components as the evaluation indicator. Then the verification test was conducted. **Results** The optimal stir - frying process was as follows: the excipient amount was 25%, the stir - frying temperature was 170 °C, and the stir - frying time was 10 min. The average contents of chlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, astragaloside, ethanol - soluble extractives and total flavonoids were 1.412, 1.038, 2.207, 1.231, 31.816, 106.702 mg / g respectively, and the average content of moisture was 10.99%. The theoretical value of the comprehensive score was 98.019 points, which was close to the measured value (97.585 points), with an RSD of 0.843%. **Conclusion** The optimal stir - frying process of honey - roasted Mori Folium is stable, rational and feasible, which can provide a basis for the industrial production of Mori Folium.

**Key words:** honey - roasted Mori Folium; stir - frying process; Box - Behnken response surface methodology; CRITIC - entropy weight method; analytic hierarchy process; ultra - high - performance liquid chromatography

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,有疏散风热、清肺润燥、清肝明目功效<sup>[1]</sup>。其含有黄酮、多酚、生物碱、多糖、甾醇等多种有效成分<sup>[2]</sup>,具有抗氧化、降血糖、降胆固醇、抗衰老、预防癌症、抗炎、护肝、调节肠道菌群等作用<sup>[3-5]</sup>,广泛用于食品、药物等领域。桑叶炮制应用历史悠久,历代炮制方法多种多样,如桑叶烧灰外用、醋煮桑叶、酒拌蒸桑叶、九蒸九晒桑叶、芝麻拌蒸桑叶等,而现代主要为蜜制。蜜桑叶的应用始载于《太平圣惠方》,较生品润肺作用增强,多用于肺燥咳嗽<sup>[6]</sup>。多

个省级中药饮片炮制规范均收录了蜜桑叶,但均缺少具体炮制工艺参数。同时,蜜桑叶的水分、指标成分含量也是生产加工和质量控制的难题,且有关蜜桑叶炮制工艺的文献报道较少。鉴于此,本研究中采用 CRITIC - 层次分析法(AHP)复合赋权法计算桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、总黄酮、醇溶性浸出物、水分 7 项指标的权重系数,并以上述指标的综合评分为评价指标,以炒制温度、炒制时间、辅料用量为考察因素,采用 Box - Behnken 响应面法优化蜜桑叶的炒制工艺,为其

\*基金项目:安徽省第一批中医药学术流派传承工作室建设项目[皖中医药发展秘[2021]30号]。

第一作者:陈泽键,男,在读硕士研究生,初级中药师,研究方向为中药炮制,(电子信箱)1486986564@qq.com。

△通信作者:朋汤义,男,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药炮制,(电子信箱)hfspty@yeah.net。

规范化生产提供依据。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Waters Acquity 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);1510型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DHG-9202-2型电热恒温干燥箱、DK-S24型电热恒温水浴锅(上海三发科学仪器有限公司);KQ-300DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XY-100MW-T型水分测定仪(常州幸运电子设备有限公司);BS200S型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为0.1 mg);

### 1.2 试药

绿原酸对照品(批号为 PU0100-0025,含量 ≥ 98%),芦丁对照品(批号为 PU0001-0025,含量 ≥ 98%),异槲皮苷对照品(批号为 PS011802,含量 ≥ 98%),紫云英苷对照品(批号为 PS011379,含量 ≥ 98%),均购自成都普思生物科技有限公司;亚硝酸钠(上海苏懿化学试剂有限公司,批号为 0101020);硝酸铝(上海麦克林生化科技有限公司,批号为 C10792299);氢氧化钠(天津市津北精细化工有限公司,批号为 900720);枣花蜂蜜(北京百花蜂业科技发展有限公司,批号为 20221220);乙腈、甲醇均为色谱纯,甲酸为分析纯,水为屈臣氏纯净水。桑叶样品(2022年11月12日采自西安市临潼区,晒干后备用),经安徽中医药大学第一附属医院朋汤义副主任中药师鉴定为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

生桑叶:取桑叶样品适量,除去杂质,搓碎,去柄,筛去灰屑。取净制桑叶 30 g,粉碎,过 3 号筛,备用。

炼蜜<sup>[7]</sup>:取蜂蜜适量,加水拌匀,倒入锅中,边倒边搅拌,中火加热至沸,撇去浮沫,后用小火加热至 116~118 °C 保持微沸,出现浅黄色有光泽的均匀鱼眼气泡,炼制至挂旗状态,待蜜呈棕褐色,手捻之有黏性,两指间尚无长白丝出现时,迅速出锅,备用。

蜜桑叶<sup>[8]</sup>:取上述净制桑叶 30 g,按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0213 蜜炙法炒至不黏手。另取炼蜜 7.5 g,以 2 倍量的沸水稀释,淋入药材中拌匀,稍焖,置热锅中,文火(120~160 °C)炒至表面深黄色,微有光泽,不黏手时取出,晾干,粉碎,过 3 号筛,备用。

### 2.2 指标成分含量测定

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.5% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~3 min 时 10%A → 15%A, 3~8 min 时 15%A, 8~15 min 时 15%A → 25%A, 15~25 min 时 25%A → 45%A, 25~27 min 时 45%A → 70%A, 27~30 min 时 70%A → 100%A, 30~32 min 时 100%A → 10%A, 32~35 min 时 10%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:358 nm;柱温:30 °C;进样量:5 μL。

#### 2.2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷对照品各适量,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,加入甲醇定容,制成含绿原酸 0.816 mg/mL、芦丁 0.581 mg/mL、异槲皮苷 0.489 mg/mL、紫云英苷 0.435 mg/mL 的对照品贮备液。分别精密吸取 0.74, 0.55, 0.80, 0.33 mL, 置 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容,超声(功率 300 W、频率 40 kHz,下同)处理 5 min,即得芦丁、绿原酸、异槲皮苷、紫云英苷质量浓度分别为 0.121, 0.064, 0.078, 0.029 mg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取蜜桑叶样品粉末 1.0 g,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加入甲醇定容,密塞,称定质量,超声处理 30 min,取出,冷却至室温,再次称定质量并以甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,12 000 r/min 离心(离心半径 3 cm)20 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

空白对照溶液:以甲醇为空白对照溶液。

#### 2.2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:取 2.2.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。

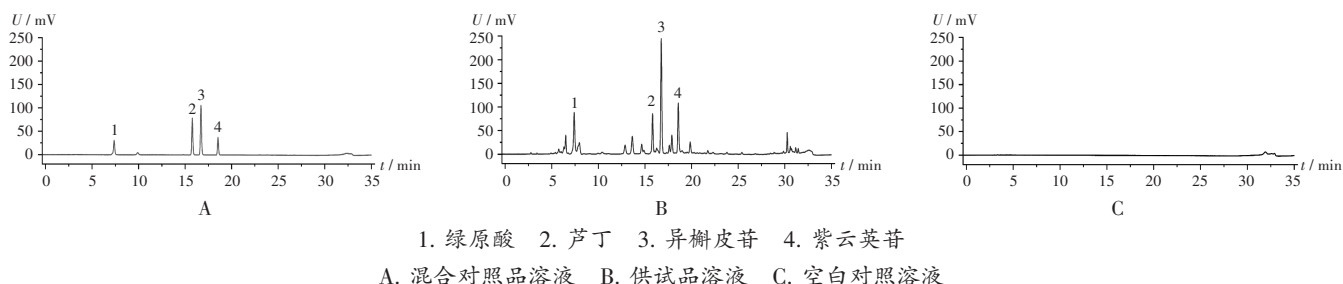


图1 超高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Rutin 3. Isoquercitrin 4. Astragaloside  
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Blank reference solution

Fig. 1 UPLC chromatograms

结果理论板数按绿原酸峰计不低于5 000,按芦丁峰、异槲皮苷峰计均不低于15 000,按紫云英苷峰计不低于25 000。分离度均大于1.5,拖尾因子均为0.95~1.05,表明色谱峰对称性良好,且空白对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:分别精密吸取2.2.2项下混合对照品溶液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0  $\mu\text{L}$ ,按2.2.1项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量( $X$ ,  $\mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test

待测成分	线性方程	$R^2$	线性范围( $\mu\text{g}$ )
绿原酸	$Y_1 = 514\,908.55X_1 - 87.66$	0.9999	0.121~1.210
芦丁	$Y_2 = 2\,014\,006.12X_2 + 551.14$	0.9999	0.064~0.640
异槲皮苷	$Y_3 = 2\,323\,460.94X_3 - 3\,480.93$	0.9999	0.078~0.780
紫云英苷	$Y_4 = 2\,063\,856.02X_4 + 1\,837.57$	0.9999	0.029~0.290

精密度试验:精密量取2.2.2项下供试品溶液5  $\mu\text{L}$ ,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积及保留时间。结果峰面积的RSD为0.14%~1.02%,保留时间的RSD为1.05%~13.16%( $n=6$ ),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0,4,8,12,16,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.30%~0.63%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取蜜桑叶样品粉末6份,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.10%~0.34%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的蜜桑叶样品粉末6份,每份0.5 g,精密称定,分别加入与样品中成分含量接近的单一对照品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的平均加样回收率分别为100.22%,99.84%,100.27%,99.65%,RSD分别为0.41%,0.71%,0.36%,0.76%( $n=6$ )。

#### 2.2.4 样品含量测定

按2.1项下方法分别制备生桑叶、蜜桑叶样品各10份,各取粉末适量,精密称定,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,结果生品中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量分别为3.16,0.66,1.85,0.86 mg/g,蜜炙品中分别为1.73,0.92,2.33,1.02 mg/g。可见,桑

叶蜜炙后绿原酸含量显著降低( $P < 0.01$ ),芦丁、异槲皮苷、紫云英苷含量显著升高( $P < 0.01$ )。

#### 2.3 总黄酮含量测定

溶液制备:取芦丁对照品10.11 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,用95%乙醇定容,摇匀,即得质量浓度为0.4044 mg/mL的对照品溶液。取蜜桑叶样品粉末0.5 g,精密称定,置25 mL具塞锥形瓶中,加入55%乙醇15 mL,称定质量,50  $^{\circ}\text{C}$ 超声处理17 min,取出,冷却至室温,再次称定质量,以甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取2 mL置离心管内,12 000 r/min离心(离心半径3 cm)20 min,取上清液,即得供试品溶液<sup>[9]</sup>。

线性关系考察<sup>[10-11]</sup>:精密吸取上述对照品溶液0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置2 mL离心管中,再分别加入95%乙醇1.0,0.9,0.8,0.6,0.4,0.2 mL,封盖,混匀,得系列对照品溶液,加入20%亚硝酸钠溶液150  $\mu\text{L}$ ,充分混匀后静置5 min;加入40%硝酸铝溶液200  $\mu\text{L}$ ,充分混匀后静置5 min;再加入20%氢氧化钠溶液500  $\mu\text{L}$ ,充分混匀后静置15 min。得质量浓度分别为0,0.022,0.044,0.087,0.131,0.175,0.219 mg/mL的对照品溶液。以95%乙醇作为空白对照溶液,每个质量浓度各取200  $\mu\text{L}$ ,加入96孔板,记录每个孔中芦丁的质量浓度。采用全自动酶标仪,在510 nm波长处,测定吸光度值。以芦丁质量浓度( $X$ , mg/mL)为横坐标、吸光度( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 5.5311X + 0.0721$ ( $R^2 = 0.9995$ )。结果芦丁质量浓度在0~0.219 mg/mL范围内与吸光度值线性关系良好。

按相关要求方法进行方法学考察,结果精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%,表明仪器精密度良好,供试品溶液室温放置12 h内基本稳定,方法重复性良好。

含量测定:取供试品溶液1.0 mL,置离心管中,按标准曲线法测定样品中总黄酮的含量,并根据公式 $W = c \times n \times (V/M)$ [其中 $c$ 为总黄酮质量浓度(mg/mL), $n$ 为稀释倍数, $V$ 为样品体积(mL), $M$ 为样品质量(g)]计算蜜桑叶中总黄酮含量(mg/g),重复3次,取平均值。

#### 2.4 醇溶性浸出物含量测定

按2020年版《中国药典(四部)》通则2201项下热浸法,取蜜桑叶样品粉末1.000 g,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密量取25 mL无水乙醇,密塞,静置1 h,水浴锅内煮沸1 h,冷却至室温后,密塞,称定,用甲醇补足减失的质量,减压滤过。精密量取10 mL滤液,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后于105  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥3 h至恒重,置干燥器中冷却至室温,迅速称定质量,精密称定,重复3次,取平均值。

## 2.5 水分含量测定

取蜜桑叶样品粉末3.000 g,精密称定,均匀平铺于水分测定仪样品盘中,厚度不超过5 mm,启动仪器,干燥至读数保持1 min不变化,记录读数。根据药典及《中药饮片质量标准通则(试行)》(简称《通则》)对饮片水分含量的要求,本研究中以水分含量7%~13%为最佳值,赋5分;<7%或>13%~15%为优值,赋4分;>15%~20%为中值,赋3分;>20%~30%为劣值,赋2分;>30%为最差值,赋1分。

## 2.6 综合评分方法

### 2.6.1 CRITIC 熵权法<sup>[12-13]</sup>

本试验中选择的7个指标成分之间存在关联性,因此选用CRITIC熵权法进行客观赋权。指标性成分含量评分越高,说明炒制工艺参数越好,故选用正向指标进行数据标准化处理,即 $Y = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \times 100\%$ (其中, $X_i$ 为测量值, $X_{\min}$ 为最小测量值, $X_{\max}$ 为最大测量值)。得到标准化值后,对各数据的相关性进行分析,得到相关性矩阵(见表2)。依据CRITIC法公式,分别计算绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、总黄酮、醇溶性浸出物、水分7个指标的权重(见表3)。

表2 CRITIC熵权法相关性矩阵

Tab. 2 Correlation matrix of CRITIC - entropy weight method

指标	绿原酸	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷	总黄酮	醇溶性浸出物	水分
绿原酸	1.000	0.180	0.178	0.164	0.130	-0.009	0.206
芦丁	0.180	1.000	0.278	0.267	0.216	0.156	0.297
异槲皮苷	0.178	0.278	1.000	0.255	0.191	0.131	0.266
紫云英苷	0.164	0.267	0.255	1.000	0.178	0.133	0.249
总黄酮	0.130	0.216	0.191	0.178	1.000	0.161	0.288
醇溶性浸出物	-0.009	0.156	0.131	0.133	0.161	1.000	0.155
水分	0.206	0.297	0.266	0.249	0.288	0.155	1.000

表3 指标权重计算结果

Tab. 3 Results of indicator weights calculation

项目	绿原酸	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷	总黄酮	醇溶性浸出物	水分
对比强度( $S$ )	0.250	0.341	0.296	0.282	0.315	0.243	0.400
冲突性( $\delta$ )	5.152	4.606	4.702	4.755	4.837	5.274	4.538
综合权重( $C$ )	1.287	1.571	1.391	1.343	1.522	1.280	1.816
权重( $W_i$ )	0.126	0.154	0.136	0.132	0.149	0.125	0.178

### 2.6.2 AHP<sup>[14-16]</sup>

AHP基于主观判断构建分析矩阵,从而将各因素分为有序层次进行分析。以蜜桑叶炒制工艺作为决策目标,可由7个指标(次级目标)来反映,建立层次结构模型。参考《湖北省中药饮片炮制规范》(2018年版)、《山东省中药饮片炮制规范》(2012年版),依据对蜜桑叶的质量控制贡献大小,依次选取芦丁、醇溶性浸出物与水分、总黄酮及异槲皮苷、紫云英苷、绿原酸(其中醇溶性浸出物与水分,异槲皮苷与紫云英苷、绿原酸贡献

相当)为控制指标。通过构建两两比较的判断矩阵(见表4),根据重要性及优先级顺序,计算得芦丁、醇溶性浸出物、水分、总黄酮、异槲皮苷、紫云英苷及绿原酸的权重( $W_A$ )。矩阵的一致性比例因子(CI)为0.007及一致性比率(CR)为0.005,均小于0.10,表明所构建的优先级判断矩阵具有较好的一致性,计算所得相应权重有效。

表4 AHP指标成对比较判断矩阵

Tab. 4 Pairwise comparison matrix of AHP indicators

指标	芦丁	醇溶性浸出物	水分	总黄酮	异槲皮苷	紫云英苷	绿原酸	$W_A$
芦丁	1.00	2.00	2.00	3.00	4.00	4.00	4.00	0.31
醇浸出物	0.50	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	3.00	0.19
水分	0.50	1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	3.00	0.19
总黄酮	0.33	0.50	0.50	1.00	2.00	2.00	2.00	0.11
异槲皮苷	0.25	0.33	0.33	0.50	1.00	1.00	1.00	0.06
紫云英苷	0.25	0.33	0.33	0.50	1.00	1.00	1.00	0.06
绿原酸	0.25	0.33	0.33	0.50	1.00	1.00	1.00	0.06

### 2.6.3 复合权重及综合评分<sup>[17]</sup>

将通过CRITIC法计算得到的客观权重 $W_i$ 及通过AHP法计算得到的客观权重 $W_A$ ,以式(1)综合计算得到复合权重 $W$ ,以式(2)计算综合评分OD值,结果见表5。

$$W = W_i \times W_A / \sum_{A=1}^n (W_i \times W_A) \quad (1)$$

$$OD = 100 \times \sum_{i=1}^n W \times X_i / X_{\max} \quad (2)$$

表5 各指标复合权重

Tab. 5 Composite weights of various indicators

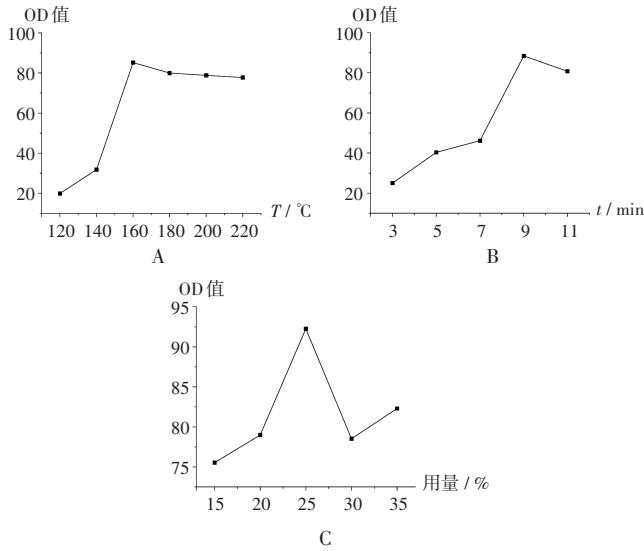
权重	芦丁	醇溶性浸出物	水分	总黄酮	异槲皮苷	紫云英苷	绿原酸
$W_i$	0.15	0.13	0.18	0.15	0.14	0.13	0.13
$W_A$	0.31	0.19	0.19	0.11	0.07	0.07	0.07
$W$	0.32	0.16	0.23	0.11	0.06	0.06	0.06

## 2.7 单因素试验

炒制温度:称取净制桑叶样品粉末6份,每份30 g,以2倍量的沸水融化7.5 g(含辅料25%)炼蜜,焖润4 min,分别以120,140,160,180,200,220 °C炒制9 min,制备供试品溶液。分别测定上述7个指标含量,计算 $W$ 及OD值。结果炒制温度为160 °C时各项指标含量均较高且OD值最高,故选择160 °C作为响应面试验中炒制温度的中心点(见图2 A)。

炒制时间:称取净制桑叶样品粉末5份,每份30 g,以2倍量的沸水融化7.5 g(含辅料25%)的炼蜜,焖润4 min,以160 °C分别炒制3,5,7,9,11 min,制备供试品溶液。分别测定上述7个指标,计算 $W$ 及OD值。结果炒制时间为9 min时OD值最高,故选择9 min为响应面试验中炒制时间的中心点(见图2 B)。

辅料用量:称取净制桑叶样品粉末5份,每份30 g,



A. 炒制温度 B. 炒制时间 C. 辅料用量

图2 单因素试验结果

A. Stir - frying temperature B. Stir - frying time C. Excipient amount

Fig. 2 Results of single - factor test

以2倍量的沸水分别融化4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 10.5 g(分别含辅料15%, 20%, 25%, 30%, 35%)炼蜜, 焖润4 min, 以160 °C炒制9 min, 制备供试品溶液, 并测定上述7个指标的含量及OD值。结果含辅料25%时OD值最高, 故选择25%作为响应面试验中辅料用量的中心点(见图2 C)。

### 2.8 响应面法优化工艺试验

试验设计: 以炒制温度(因素a)、炒制时间(因素b)、辅料用量(因素c)为影响因素, 以绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、总黄酮、醇浸出物、水分含量的OD值为评价指标, 采用Design Expert 13软件进行三因素三水平试验设计, 因素与水平见表6, 试验设计与结果见表7。

表6 因素与水平

Tab. 6 Factors and their levels

水平	因素a(°C)	因素b(min)	因素c(%)
-1	120	7	15
0	160	9	25
1	200	11	35

模型拟合及显著性分析: 使用Design Expert 13软件, 对数据进行二次多项回归及拟合, 得OD值的回归方程  $Y' = 93.99 + 17.88a + 5.98b + 1.58c - 3.96ab - 1.17ac + 2.07bc - 31.49a^2 - 4.23b^2 - 5.45c^2$  ( $R^2 = 0.9911$ ), 表明该模型拟合度较好。结果见表8。可见, 拟合模型  $P < 0.0001$ , 说明本模型拟合程度极显著, 拟合方程符合蜜桑叶炒制工艺的实际操作; 失拟项  $P = 0.1549 > 0.1$ , 极不显著, 说明本模型拟合良好, 无失拟项影响, 调整系数  $R^2_{adj} = 0.9796$ ,  $RSD$  为4.17%, 即该

表7 Box - Behnken 响应面法试验设计与结果

Tab. 7 Design and results of Box - Behnken response surface methodology

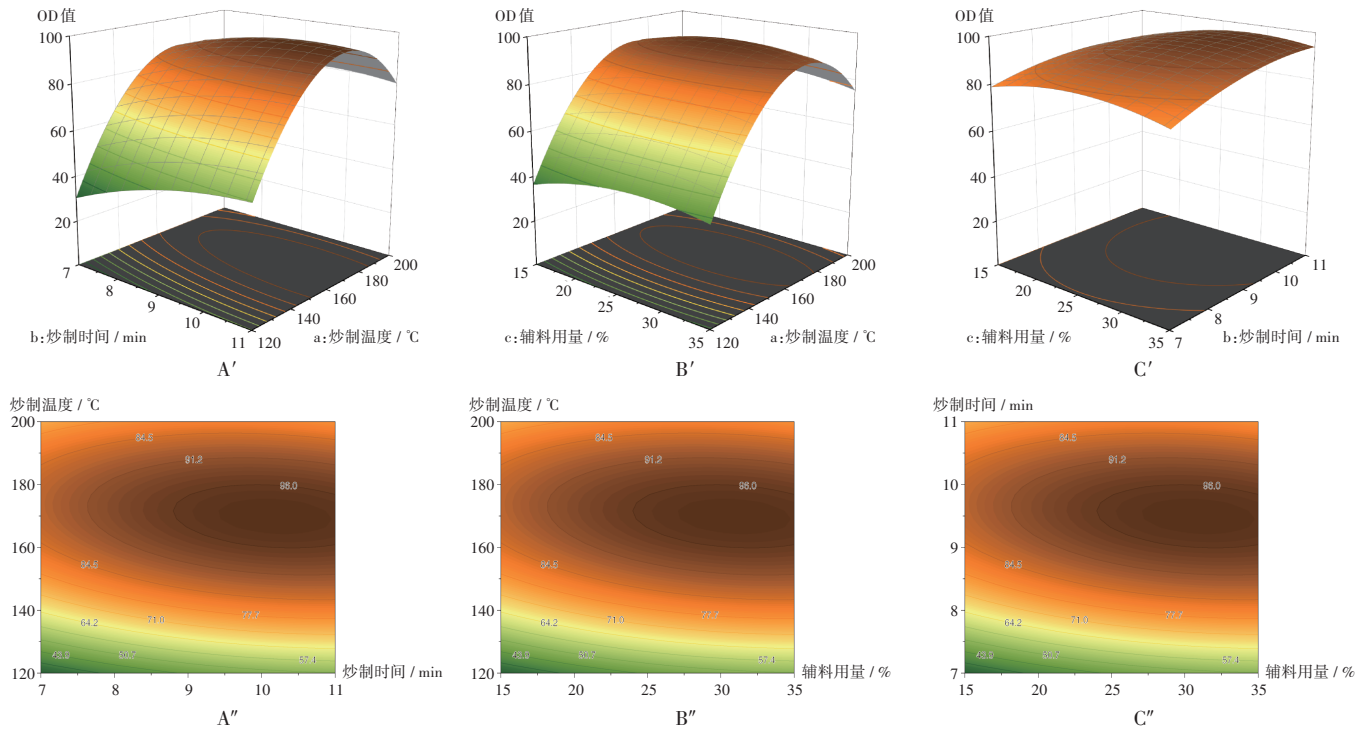
序号	因素			芦丁 (mg/g)	醇溶性浸出 物(mg/g)	水分 (分)	总黄酮 (mg/g)	绿原酸 (mg/g)	异槲皮苷 (mg/g)	紫云英苷 (mg/g)	OD值
	a	b	c								
1	1	0	1	0.523	103.188	5	30.128	0.825	1.156	0.589	75.030
2	0	-1	1	0.681	112.000	4	29.263	1.254	1.454	0.749	80.856
3	0	0	0	0.927	102.345	5	27.727	1.527	1.965	1.027	95.254
4	-1	-1	0	0.069	76.667	1	20.163	0.392	0.305	0.082	28.679
5	0	0	0	0.909	102.333	5	26.743	1.863	1.873	0.935	94.626
6	1	0	-1	0.588	98.481	5	29.716	0.735	1.178	0.527	75.768
7	0	1	-1	0.764	96.333	5	30.587	0.982	1.356	0.603	83.603
8	0	0	0	0.934	104.333	5	28.959	1.418	2.085	1.014	96.167
9	-1	0	-1	0.122	75.551	2	21.452	0.552	0.525	0.217	36.729
10	0	1	1	0.932	100.213	5	30.895	0.921	1.622	0.912	92.469
11	1	-1	0	0.493	96.781	5	28.591	0.618	1.312	0.452	71.394
12	-1	0	1	0.152	77.472	2	24.189	0.711	0.627	0.353	40.660
13	0	0	0	0.908	99.000	4	26.795	1.545	2.028	1.086	90.291
14	0	0	0	0.882	98.252	5	27.532	1.659	2.032	1.024	93.592
15	1	1	0	0.629	103.667	5	31.126	0.843	1.304	0.644	79.937
16	0	-1	-1	0.673	98.000	5	26.547	1.321	1.372	0.564	80.272
17	-1	1	0	0.332	80.463	3	24.782	0.842	0.862	0.413	53.044

模型可解释97.96%响应值的变化, 模型拟合度较高, 说明该回归方程可对炒制工艺进行较好地预测。拟合模型中a, b对模型具有极显著影响( $P < 0.01$ ), 即a和b为极显著项, 是影响炒制品质量的主要因素。交互项ab, ac, bc均无显著差异( $P > 0.05$ ), 表明各因素间交互作用不明显。二次项 $a^2, b^2, c^2$ 均有显著差异( $P < 0.01$ ), 表明各因素与OD值并非简单的线性关系。由F值和方

表8 蜜桑叶炒制工艺响应面回归模拟方差分析结果

Tab. 8 Results of analysis of variance of response surface regression for stir - frying process of honey - roasted Mori Folium

项目	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	7503.56	9	833.73	86.31	<0.0001
a	2556.73	1	2556.73	264.67	<0.0001
b	286.23	1	286.23	29.63	0.001
c	19.98	1	19.98	2.07	0.1935
ab	62.58	1	62.58	6.48	0.0384
ac	5.45	1	5.45	0.5642	0.4771
bc	17.15	1	17.15	1.78	0.2245
$a^2$	4174.68	1	4174.68	432.16	<0.0001
$b^2$	75.5	1	75.5	7.82	0.0267
$c^2$	125.13	1	125.13	12.95	0.0088
残差	67.62	7	9.66		
失拟项	47.04	3	15.68	3.05	0.1549
纯误差	20.58	4	5.15		
总离差	7571.18	16			



A', B', C'. 响应面图 A'', B'', C''. 等高线图  
A', A''. 炒制时间与炒制温度 B', B''. 辅料用量与炒制温度 C', C''. 辅料用量与炒制时间

图3 各因素交互作用响应面图及等高线图

A', B', C'. Response surface diagrams A'', B'', C''. Contour diagrams

A', A''. Stir - frying time and stir - frying temperature B', B''. Excipient amount and stir - frying temperature C', C''. Excipient amount and stir - frying time

Fig. 3 Response surface diagrams and contour diagrams of interaction of various factors

差分析结果可知,蜜桑叶炒制品质量的影响因素强度排序为  $a > b > c$ 。

结果分析:响应面试验结果见图3,可见,炒制温度与炒制时间、炒制温度与辅料用量之间的交互作用对OD值影响较大,炒制温度达到160℃前,OD值呈直线快速上升趋势,之后则呈下降趋势。说明蜜桑叶的有效成分含量在一定范围内随炒制温度的升高而增加,达到峰值后下降,呈先升高后降低的趋势。同时,炒制时间与辅料用量之间交互作用对OD值影响较小。

最佳炒制工艺预测:运用Design Expert 13软件对蜜桑叶炒制工艺条件进行优化,发现最高理论OD值为98.019,其对应蜜桑叶炒制工艺为炒制温度169.17℃、炒制时间9.94 min、辅料用量25.74%。结合实际情况优化后,得炒制温度170℃、炒制时间10 min、辅料用量25%。

## 2.9 验证试验

依照优化后的工艺进行3次试验,测定上述7个指标,并计算复合权重及OD值。结果见表9[其中,偏差为OD实测值相对理论值(98.019)的偏差,其RSD为0.834%( $n = 3$ );编号1-3样品水分含量分别为11.09%,11.03%,10.85%,平均10.99%]。表明结果稳定,在预测值条件下的蜜桑叶炒制工艺稳定且可控。

表9 工艺验证试验结果( $n = 3$ )

Tab. 9 Results of process verification test ( $n = 3$ )

序号	绿原酸 (mg/g)	芦丁 (mg/g)	异槲皮苷 (mg/g)	紫云英苷 (mg/g)	总黄酮 (mg/g)	醇溶性浸出 物(mg/g)	水分 (分)	OD值 (分)	偏差 (%)
1	1.415	1.036	2.091	1.306	32.169	104.863	5	97.405	-0.626
2	1.424	0.996	2.366	1.204	31.613	108.266	5	96.865	-1.177
3	1.396	1.082	2.163	1.182	31.665	106.976	5	98.465	0.455
$\bar{x}$	1.412	1.038	2.207	1.231	31.816	106.702	5	97.578	

## 3 讨论

### 3.1 试验材料选取与处理

本课题组前期开展关于不同产地桑叶的指纹图谱研究,包括安徽亳州、合肥,陕西西安(临潼区),江苏南京,广东清远等10个产地的桑叶。结果显示,临潼区的桑叶中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的含量最高,图谱出峰较多且分离度较好,故本试验选取该产地的桑叶作为试验材料。根据前期的预试验结果,本试验中蜜桑叶用沸水稀释炼蜜的比例以桑叶:沸水 = 1:2(m/m,下同)最合适。过多的水会导致桑叶水分过多,延长炒干时间,增加蜜水粘在锅底损耗的量,影响结果的准确性。过少的水则会导致蜜水无法浸润到全部桑叶,无法拌匀,且由于吸水不均导致炒制时受热不均,同样影响结果的

准确性,故选取桑叶:沸水 = 1:2 稀释炼蜜。

### 3.2 试验条件选择

对于色谱条件的选择,前期做了预试验筛选最佳条件。分别对不同流动相系统(乙腈 - 0.2% 磷酸<sup>[18]</sup>、乙腈 - 0.5% 磷酸<sup>[8]</sup>、甲醇 - 0.5% 甲酸<sup>[19]</sup>、乙腈 - 0.5% 甲酸)进行考察,结果为乙腈 - 0.5% 甲酸水溶液时各待测成分峰形和分离度最优。还考察了乙醇回流与甲醇超声2种提取方法,结果显示两者的色谱图信息差异不明显,但甲醇超声法操作简单,故选用甲醇超声的方法制备供试品溶液。

### 3.3 赋权法选择

CRITIC 熵权法可客观反映各因素间的重要性,而 AHP 则是通过主观决策分析分配权重的方法,本试验将两种赋权方法结合,既能顾及人为规定的要求又能避免过度主观导致的误差。兼顾客观指标评价与主观人为规定两者优势,避免了单一客观评价导致结果不能满足法典规定,也避免了单一主观评价导致结果稳定性及可重复性降低的问题,能保证所选炒制工艺可用于实际大生产。

### 3.4 方法评价

蜜桑叶较生桑叶的绿原酸含量降低,芦丁、异槲皮苷、紫云英苷含量升高,这可能是由于绿原酸在蜜水中加热发生水解、氧化及异构化<sup>[20]</sup>,导致绿原酸的含量降低。王星敏等<sup>[21]</sup>的研究表明,水加热时间及加热温度对异槲皮苷的溶出起主要作用。郭晨思<sup>[22]</sup>建立了水热法提取芦丁的动力学模型,并对大孔树脂吸附芦丁的过程进行了热力学和动力学探讨,发现提高温度有助于芦丁的提取,但温度过高不利于芦丁的吸附。故黄酮类成分含量升高可能是由于温度升高黄酮类成分在蜜水中溶出率升高而导致的。吴劲轩等<sup>[23]</sup>的研究发现,桑叶在干燥过程中的黄酮、总糖、多糖的含量随温度的升高呈先升高后降低趋势。程聪梅等<sup>[18]</sup>的研究结果表明,多批次的炒桑叶与蜜桑叶中的绿原酸、芦丁、异槲皮素的平均含量高于生桑叶。BAI 等<sup>[24]</sup>比较了3种加工方式对桑叶活性的影响,结果表明,蜜桑叶各活性成分均较生品增加。上述研究均提示了温度对桑叶成分变化的关键作用。因此,在单因素试验中选取炒制温度与炒制时间作为考察因素。此外,单因素试验选取辅料用量为25%,这与地方炮制规范中规定的辅料用量一致。在单因素试验中显示辅料用量对OD值的影响不大,回归方程中辅料用量前后结果基本一致,即辅料用量对炒制质量的影响较小,但根据前期试验结果,在拟订的加蜜量范围内,随着加蜜量的增加,蜜桑叶中总黄酮及醇溶性浸出物的含量均增加,而绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷含量均呈先上升后降低趋势,将呈现2种趋势的因素

综合加权得出的OD值趋势变化不明显,因此,通过此试验得到的关于辅料用量与蜜桑叶炒制质量的关系后期还需通过更多试验(如进行药物效应动力学研究)验证。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 310.
- [2] 张倩, 张立华. 桑叶的化学成分及开发利用进展[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(15): 16 - 19.
- [3] 李来成, 张士凯, 许方舟, 等. 桑叶综合利用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 397 - 404.
- [4] SHI Y, ZHONG L, FAN Y, et al. The protective effect of mulberry leaf flavonoids on high - Carbohydrate - Induced liver oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiota disturbance in *monopterus albus* [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 976.
- [5] LIN Z, GAN T, HUANG Y, et al. Anti - Inflammatory activity of mulberry leaf flavonoids *in vitro* and *in vivo* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 7694.
- [6] 曹辉, 付静. 全国中药炮制经验与规范集成(增修本)[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2017: 657.
- [7] 龚千锋. 中药炮制学(第四版)[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 241.
- [8] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药饮片炮制规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 92.
- [9] 张心壮, 刘宇, 芒来. 响应面法优化桑叶黄酮的提取工艺及提取物抗氧化性能的研究[J]. 饲料工业, 2021, 42(19): 42 - 48.
- [10] 章烨雯, 臧青民, 陈荣, 等. 金橘叶中总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(1): 46 - 54.
- [11] 黄晓彤, 史锐, 刘苗苗, 等. 同属不同种桑叶总黄酮的含量测定及分析[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(8): 91 - 95.
- [12] 陈发贵, 李翠华, 庾洋, 等. 基于 CRITIC 结合 Box - Behnken 响应面法优选桂枝炒制工艺[J]. 中药材, 2022, 45(8): 1848 - 1852.
- [13] 黄潇, 刘婧, 付小梅, 等. 基于 CRITIC 法计算权重系数的 Box - Behnken 响应面法优化栀子炭微波炮制工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1133 - 1138.
- [14] 阴美华, 袁蒙蒙, 唐志书, 等. 层次分析法结合响应面法优化南五味子醋制工艺[J]. 中药材, 2021, 44(10): 2316 - 2320.
- [15] 黄宝泰, 刘星彤, 毛英民, 等. 响应面法结合层次分析法优化灸菟丝子的炮制工艺[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1890 - 1894.
- [16] 李苏运, 于欢, 温柔, 等. 变异系数法 - AHP 综合加权结合响应面法优选酒栀子炮制工艺[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 617 - 622.
- [17] 袁诗农, 王少男, 段绪红, 等. 基于 AHP - CRITIC 复合熵权法和响应面法的蛇床子盐炙工艺优选[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 345 - 350.