

R 语言多目标优化养阴通脑颗粒组方中 3 种黄酮类指标成分提取工艺

虞立, 张宇燕, 杨洁红, 周惠芬, 金伟锋, 万海同*

浙江中医药大学 心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 多目标优化养阴通脑颗粒组方中 3 种黄酮类指标成分的提取工艺。方法 以养阴通脑颗粒组方中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率为检测指标, 采用 4 因素 3 水平的正交试验设计方法进行提取工艺考察。通过 R 语言结合熵权法赋予权值, 建立 BP 神经网络模型, 再利用遗传算法对网络进行目标寻优, 从而得到养阴通脑颗粒组方中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率的最佳提取工艺。结果 养阴通脑颗粒组方中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的最优工艺条件为乙醇体积分数 85%、提取时间 1.5 h、提取温度 80 °C、乙醇用量 25 倍, 模型综合评价预测值为 0.389, 而实验所得的平均综合评价值为 0.394, 相对误差为 1.27%, 表明具有良好的网络预测性。结论 结合所得 3 个指标成分的提取率和提取工艺的可操作性、可重复性, 建立的数学模型可用于对养阴通脑颗粒组方中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取工艺进行分析和预测, 为实现中药有效成分多目标寻优提供了新的参考。

关键词: R 语言; 养阴通脑颗粒组方; 熵权法; 神经网络; 遗传算法; 多目标优化

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)08-1156-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.011

Study on three indicator flavonoids extraction of multi-objective optimization formula of Yangyin Tongnao Granules by R language

YU Li, ZHANG Yu-yan, YANG Jie-hong, ZHOU Hui-fen, JIN Wei-feng, WAN Hai-tong

Cerebrovascular Disease Research Institute, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective Multi-objectively optimizing the extraction technology for three indicator flavonoids in the formula of Yangyin Tongnao Granules. **Methods** Taking the extraction yield of puerarin, calycosin, and formononetin in the formula of Yangyin Tongnao Granules as the detecting indicators, the extraction technology was investigated by 4 factors 3 levels orthogonal test design method. Using R language, combining the entropy weight method to give weight, and establishing the BP neural network model, using the genetic algorithm to target the optimization of network, so as to get the best extraction technology for puerarin, calycosin, and formononetin. **Results** The optimization of extraction technology was as follows: ethanol concentration was 85%, extraction time was 1.5 h, extraction temperature was 80 °C, and ethanol dosage was 25 times. Under the condition, the predictive value of model comprehensive evaluation was 0.389, the predictive value of the average comprehensive evaluation obtained in the experiment was 0.394, the relative error was 1.27%. So it had a better network prediction. **Conclusion** Combining the feasibility and repeatability of the extraction yield and extraction technology for the three index component to establish the mathematical model for analyzing and predicting the extraction technology of puerarin, calycosin, and formononetin in the formula of Yangyin Tongnao Granules and providing a new reference to realize the multi-objective optimization of the extraction technology for the active constituents in Chinese materia medica.

Key words: R language; formula of Yangyin Tongnao Granules; entropy weight method; neural network; genetic algorithm; multi-objective optimization

养阴通脑颗粒组方是现代中药复(处)方制剂, 1.2:0.67 组成, 提取制备得到养阴通脑颗粒, 药品
其组方由生地黄、黄芪、葛根、川芎按比例 1:1: 临床研究批文为 2003L00206, 已完成 II 期、III 期

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374053, 81202636, 81274176); 浙江省自然科学基金资助项目(LR12H27001); 浙江省中医药(中西医结合)重点学科项目(2012-XK-A06)

作者简介: 虞立(1991—), 男, 浙江海宁人, 主要从事生物化工、中药有效成分分离及药动学研究。Tel: (0571)86613716 E-mail: yuli9119@126.com

*通信作者 万海同 Tel: (0571)86613711 E-mail: whtong@126.com

临床研究。其具有生津、益气、活血等功效，特别在治疗心脑血管疾病方面有明显的疗效^[1]。

药理研究表明，总黄酮类成分是抗缺血作用主要的有效部位^[2]。其中，葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素为君药葛根和黄芪中的主要活性成分^[3-4]。3个成分都具有保护心脑血管，提高免疫力，抗氧化、清除自由基等药理活性^[5-7]。

R语言是一种有着强大统计分析及作图功能的开源软件系统语言和操作环境，具有操作简单、浮点运算功能强大、作图功能强大、统计分析能力突出等特点^[8]。目前，许多研究者在研究中药提取等方面通常借助Matlab等对数据进行分析优化^[9-10]，程序繁琐且过程相对复杂。然而，在R语言环境下运用BP神经网络和遗传算法对中药有效成分提取进行优化和验证尚未见报道。

本实验在建立定量测定方法学的基础上对养阴通脑颗粒中3个指标成分进行定量测定，得出的数据结果运用R语言并结合BP神经网络和遗传算法进行处理和分析，最后优化得到最佳提取工艺。

1 仪器与材料

赛多利斯(Sartorius)BS110S电子天平，北京赛多利斯天平有限公司；Millipore Simplicity纯水仪，美国Millipore公司；HH系列数显恒温水浴锅，上海江星仪器有限公司；SHB-III A循环水式多用真空泵，河南省太康科教器材厂；Agilent 1200型高效液相色谱系统，包括G1311A四元梯度泵、G1316A柱温箱、G1315D二极管阵列检测器、G1315D DAD检测器、G1322A在线脱气机和化学工作站。

葛根素对照品，批号110752-201313，中国食品药品检定研究院，质量分数98%；毛蕊异黄酮对照品(批号20130408，质量分数98%)、芒柄花素对照品(批号20130408，质量分数98%)，天津士兰科技有限公司；水为超纯水；乙腈为色谱纯；其他化学试剂均为分析纯。

生地黄(河南，批号140601)、葛根(安徽，批号140601)、黄芪(甘肃，批号140701)、川芎(四川，批号140401)均购于浙江中医药大学中药饮片有限公司，经浙江中医药大学药学院药剂教研室主任黄绳武教授鉴定，生地黄为玄参科植物地黄*Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根，葛根为豆科植物野葛*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi的干燥根，黄芪为豆科植物膜荚黄芪*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.的干燥根，川芎为伞形

科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎，均符合《中国药典》2010年版相关规范要求。

使用的软件为The R Foundation for Statistical Computing开发的R version 3.1.1软件，熵权法、神经网络模型代码和遗传算法rgenoud工具包。

2 方法与结果

2.1 葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的HPLC同时测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，采用线性梯度洗脱程序：0~5 min, 8%乙腈；5~10 min, 8%~15%乙腈；10~15 min, 15%~30%乙腈；15~20 min, 30%~50%乙腈；体积流量1.00 mL/min；检测波长251 nm；柱温为30℃；进样量20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品适量，葛根素对照品置于10 mL量瓶中，加甲醇至刻度线，充分摇匀，制成含葛根素1.44 mg/mL的单一成分储备液。毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品置于10 mL量瓶中，加甲醇至刻度线，充分摇匀，制成含毛蕊异黄酮0.67 mg/mL和芒柄花素0.64 mg/mL的混合对照品储备液。分别精密吸取上述2个储备液5.0 mL和2.0 mL，置于同一10 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液(葛根素720.0 μg/mL、毛蕊异黄酮134.0 μg/mL、芒柄花素128.0 μg/mL)。

2.1.3 养阴通脑颗粒组方溶液的提取与供试品溶液的制备 按养阴通脑颗粒组方中药材的比例称取药材4 g，精密称定，置于圆底烧瓶中，精密加入70%乙醇300 mL，称定质量，在80℃下加热回流提取3 h，放冷至室温，补足减失的质量，摇匀，抽滤，即得提取溶液。提取溶液旋转蒸发至近干，用适量甲醇溶解，转入10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，用0.22 μm的微孔滤膜滤过，滤液作为供试品溶液。

2.1.4 系统适应性试验 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液各20 μL，注入液相色谱仪，测定。3种成分可达基线分离，分离度达到《中国药典》2010年版要求大于1.5，色谱图见图1。

2.1.5 线性关系的考察 混合对照品溶液作为1号溶液，采用倍比稀释法制成系列质量浓度溶液，得2~8号混合对照品溶液在“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积，以对照品质量浓度为横坐标(X)，相

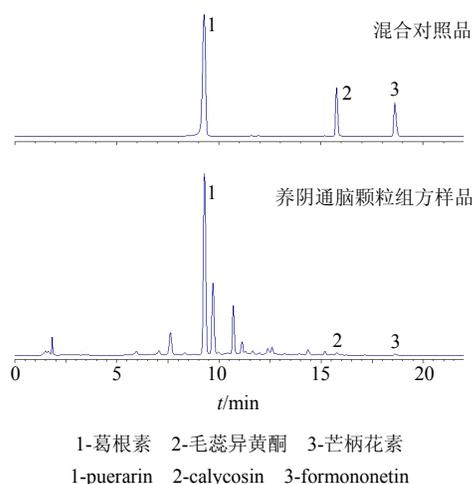


图 1 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms

应的峰面积积分为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程。葛根素 $Y=78.365 X+22.355$, $r=0.999 8$; 毛蕊异黄酮 $Y=117.12 X+39.539$, $r=0.999 9$; 芒柄花素 $Y=141.18 X+1.778$, $r=0.999 9$ 。葛根素在 $5.63 \sim 720.00 \mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系; 毛蕊异黄酮在 $1.05 \sim 134.00 \mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系; 芒柄花素在 $1.00 \sim 128.00 \mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系。

2.1.6 精密度试验 精密吸取 2 号混合对照品溶液，按“2.1.1”项色谱条件重复进样 6 次，记录混合对照品溶液中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的色谱峰面积并计算 RSD 值分别为 0.53%、0.74%、0.57%，表明精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 按照“2.1.3”项下方法制备的供试品溶液 1 份，按“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样，记录葛根素、毛蕊异黄

酮和芒柄花素的色谱峰面积，供试品溶液色谱峰面积的 RSD 值分别为 1.10%、1.29%、1.16%，表明供试品溶液均在 12 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 同一批药材，按养阴通脑颗粒组方中药材的比例称取药材 4 g，精密称定，取样 6 份，按“2.1.3”项方法制备供试品溶液，记录葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的色谱峰面积，计算得其质量分数的 RSD 值分别为 1.74%、2.47%、2.32%，表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取已测定的同一批药材，按养阴通脑颗粒组方中药材的比例称取药材 4 g，精密称定，共 6 份，按照“2.1.3”项方法制备提取样品溶液，每份各精密加入葛根素对照品储备液 3.0 mL、毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品储备液 60 μL ，制备供试品溶液，按照色谱条件进行测定，葛根素的平均回收率为 99.2%，RSD 值为 2.59%；毛蕊异黄酮的平均回收率为 97.52%，RSD 值为 3.31%；芒柄花素的平均回收率为 96.65%，RSD 值为 3.72%。

2.2 正交试验设计

2.2.1 因素水平设计 在单因素试验的基础上确定影响养阴通脑颗粒组方中 3 种指标黄酮提取率的 4 个因素：乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、提取温度 (C)、乙醇用量 (D)，进行 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验设计，筛选最佳提取工艺。见表 1。

2.2.2 试验方法 按养阴通脑颗粒组方中药材的比例称取药材 200 g，共 9 份，按照正交试验设计条件进行提取，残渣重复提取 1 次，回流提取后放冷，抽滤，旋转蒸发至尽干，用适量甲醇溶解，转入 50 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，从中精密吸取

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果 ($n=3$)
Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=3$)

编号	因素				提取率/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$			综合评价
	A/%	B/h	C/ $^{\circ}\text{C}$	D/倍	葛根素	毛蕊异黄酮	芒柄花素	
1	55 (1)	1.5 (1)	60 (1)	15 (1)	1 790	10.15	5.80	0.317
2	55 (1)	2.0 (2)	70 (2)	20 (2)	1 923	15.20	5.30	0.342
3	55 (1)	2.5 (3)	80 (3)	25 (3)	2 140	13.10	6.45	0.379
4	70 (2)	1.5 (1)	70 (2)	25 (3)	2 212	6.10	5.60	0.388
5	70 (2)	2.0 (2)	80 (3)	15 (1)	1 860	7.80	5.95	0.328
6	70 (2)	2.5 (3)	60 (1)	20 (2)	1 900	14.70	4.90	0.337
7	85 (3)	1.5 (1)	80 (3)	20 (2)	1 980	7.30	4.50	0.348
8	85 (3)	2.0 (2)	60 (1)	25 (3)	2 168	1.54	4.40	0.384
9	85 (3)	2.5 (3)	70 (2)	15 (1)	1 852	7.30	5.15	0.326

5.2 mL 置于 250 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 9 个样品溶液, 密封放置冰箱内备用。最后测定葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率。提取率 = 各指标黄酮的量/生药材量, 结果见表 1。

2.2.3 综合评价值的计算 使用 R 语言进行编程, 计算熵权权重值^[11], 得到葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的权重系数分别为 0.173、0.436 和 0.391。综合评价值 = 葛根素提取率 × 0.173 + 毛蕊异黄酮提取率 × 0.436 + 芒柄花素提取率 × 0.391。正交试验结果见表 1。

2.3 R 语言环境下 BP 神经网络建模

本实验采用 3 层结构的 BP 神经网络来建立模型, 输入节点数为 4 个, 即乙醇体积分数、提取时间、提取温度、乙醇用量; 输出节点数为 1 个, 即综合评价值。9 组正交试验数据分别采用留一法交叉验证进行训练, 初始随机权 (rang) 为 0.3, 参数重量衰变 (decay) 为 5×10^{-5} , 最大迭代次数 (maxit) 为 600, 其他参数设为默认值。而隐层中的神经元 (size) 数则经过前期的调试训练, 选取为 0。

由结果可知, 9 组数据经留一法交叉验证, 其平均拟合误差为 1.25%, 平均预测误差为 3.30%, 均小于 5%, 都具有显著性意义。综上所述, 此 BP 神经网络稳定可靠。

2.4 R 语言编程中遗传算法进行目标优化

采用实数编码方式, 种群大小为 1 000, 接近的最大代数为 100, 最大不可变代数为 10, 收敛公差为 1×10^{-4} , 其他参数均设为默认值。运用 R 语言代码进行编程, 由遗传算法得到的结果如下: 总共运行了 12 代, 运行时间为 5 s, 运行到第 2 代时得出网络预测综合评价值为 0.389。得到该结果的条件分别为乙醇体积分数 85%, 提取时间 1.5 h, 提取温度 80 °C, 乙醇用量 25 倍。

2.5 验证试验

按上述优化后的提取工艺条件, 称取 200 g 药材, 共 4 份, 进行乙醇热回流提取实验, 测定总黄酮中葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率。结果见表 2。由表 2 可知, 其平均综合评价值为 0.394, 网络预测值为 0.389, 实验测量值和网络预测值的相对误差为 1.27%。优化后提取工艺的测量值结果与预测值吻合度较优, 说明模型具有较好的网络预测性。

3 讨论

3.1 实验因素的确定

查阅文献和相关资料^[12-13], 乙醇体积分数、提

表 2 最佳工艺下的验证试验

Table 2 Varification under optimal condition

编号	提取率/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			综合评价值
	葛根素	毛蕊异黄酮	芒柄花素	
1	2 278	10.90	5.05	0.401
2	2 220	11.00	5.70	0.392
3	2 187	10.10	5.65	0.385
4	2 254	9.65	5.00	0.397

取次数、提取时间、提取温度和乙醇用量对葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素提取率有较大影响。

分别考察了回流提取乙醇体积分数 55%、70%、85%, 提取次数 1、2、3 次, 提取时间 1.5、2.0、2.5 h, 提取温度 60、70、80 °C, 乙醇用量 15、20、25 倍, 发现乙醇体积分数、提取时间、提取温度和乙醇用量对葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素提取率影响最大。发现经提取 3 次后, 葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素提取率没有明显增加, 从环保、经济等考虑, 将提取次数定为 2 次。

3.2 考察指标的确定

据已有文献报道^[14]和《中国药典》2010 年版^[15], 4 味药材中黄酮类物质的量较高的为葛根与黄芪, 而该 2 味药材的黄酮类部位中又以葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素为典型代表。故以上述 3 个成分为考察指标, 为养阴通脑颗粒组方中有效成分的质量评价和质量控制提供参考, 也可为中药复方定量测定提供参考。

3.3 液相测定方法的选择

据相关文献报道^[16]和《中国药典》2010 年版^[15]记载葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素的液相测定条件, 在此基础上摸索并加以改进。

由于流动相系统多采用甲醇-水系统和乙腈-水系统。因此, 本实验就以乙腈配比不同百分比的甲酸和磷酸水溶液, 甲醇配比不同百分比的甲酸和磷酸水溶液作为流动相进行初期摸索。由于本样品为中药提取物, 杂质较多, 实验发现乙腈-0.06%、0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱能初步把葛根素、毛蕊异黄酮和芒柄花素峰分离, 达到分离要求。并且 0.1% 磷酸水溶液能很好地抑制峰的拖尾现象, 且较稳定, 故最终确定流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液。由于有 3 种指标成分需分离并同时测定, 故采用上述“2.1.1”项梯度以节省时间并洗脱充分。

采用液相紫外全波长扫描, 发现 3 种指标成分

都在 251 nm 处有较大吸收, 故选取此波长进行定量测定。

3.4 熵权法赋予权重

在相关中医药类文献报道中^[17], 实验者往往主观赋予各考察指标相应的权重系数, 由于引进了人为干预, 难以摆脱人为因素及随机性的影响, 这在很大程度上具有很强的主观性。所以本实验采取了熵权法进行权重赋予, 较好地规避了人为介入产生的误差。

熵权法是一种客观赋予权重的方法。在使用过程中, 熵权法根据各个指标的变异程度, 利用信息熵计算出各指标的熵权, 再通过熵权对各指标的权重进行修正, 从而得到较为客观的指标权重。其优点主要有 2 个: ①客观性, 相对于那些主观赋值法, 精度较高、客观性较强, 能够很好地解释所得到的结果; ②适应性, 可以用于任意评价或多目标优化问题中的确定指标权重和任何需要确定权重的过程, 同时也可以结合一些方法一起使用。这种方法给出的权重系数客观、真实、有效。

多目标提取工艺评价符合中药多成分、多靶点的特点。近年来, 多目标决策方法被广泛用于中医药研究领域。本实验运用 R 语言结合 BP 神经网络和遗传算法, 进行数据处理并寻找最优工艺条件, 该数学模型具有简单、快捷、准确等优点; 且所建立的测定方法准确、灵敏、简便, 且稳定性和重复性良好, 为实现中药有效成分多目标寻优提供了新的参考。

参考文献

- [1] 万海同, 白海波, 杨洁红, 等. 养阴益气活血冲剂对脑缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2): 85-87.
- [2] 杨洁红, 别晓东, 杜月光, 等. 黄酮对脑缺血-再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 中华医学急诊杂志, 2005, 14(9): 735-737.
- [3] 郭莹, 万海同, 张莉, 等. 不同中药复方有效部位组合对脑缺血大鼠血浆中葛根素代谢变化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2531-2534.
- [4] 田圣志, 杨玉涛, 张振凌, 等. HPLC 测定黄芪蜜炙前后毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1365-1368.
- [5] 高风英. 葛根素药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1157-1158.
- [6] 郭超, 仝黎, 杨兴斌, 等. 毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(1): 34-37.
- [7] 陈建真, 吕圭源, 叶磊, 等. 黄芪黄酮的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1314-1316.
- [8] Torgo L. *Data Mining with R: Learning with Case Studies* [M]. London: Chapman & Hall, 2011.
- [9] 李晓伟, 王益民, 肖二刚, 等. 用 Matlab 实践中成药配置的数据分析 [J]. 天津中医药大学学报, 2011, 30(2): 88-90.
- [10] 蒋海强, 聂磊, 周洪雷, 等. 基于偏最小二乘回归分析的钩藤总碱和莱菔子总碱组分配伍优化研究 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2531-2536.
- [11] Zamri N, Abdullah L. A new linguistic variable in interval type-2 fuzzy entropy weight of a decision making method [J]. *Procedia Comput Sci*, 2013, 24(10): 42-53.
- [12] 丰理象, 洪小军, 庄林芳. 葛根中葛根素提取工艺的优化 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 812-813.
- [13] 陈彩云. 黄芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的富集、分离纯化及抗氧化活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [14] 王平, 梁逸曾. HPLC-DAD-MS 研究黄芪的化学成分 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 226-229.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [16] 陈有根, 辛敏通, 杨滨. 野生与栽培黄芪中毛蕊异黄酮苷的测定 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1484-1485.
- [17] 任桂玲, 李沈明, 郭艳玲, 等. 逆向连续循环低温提取金莲花口服液工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2022-2026.