

基于 2 种分析方法的补阳还五汤中有效成分提取工艺优化研究

尹 斐, 杨洁红, 方雨晨, 虞 立, 周惠芬, 金伟锋, 何 昱, 万海同*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: 目的 对比以 R 语言为基础结合 BP 神经网络和遗传算法与响应面分析 2 种方法, 优化补阳还五汤 (BHD) 中主要有效成分的提取工艺。方法 在单因素实验的基础上采用响应面实验设计方法, 利用 HPLC 法检测提取得到的 BHD 中主要有效成分, 计算其提取率。提取率结果进行熵权法赋值, 得到综合评价值。在此基础上首先采用响应面分析方法得到其最佳提取工艺和综合评价预测值。再通过另一种优化分析方法: R 语言环境下的 BP 神经网络和遗传算法, 分别进行网络模型优化和目标寻优, 以期得到另一组 BHD 中有效成分的最佳提取工艺和综合评价预测值。结果 响应面处理方法得到的最优提取工艺为提取时间 1.8 h、乙醇体积分数 51%、提取温度 91 ℃、液料比 14 : 1, 该方法下综合评价预测值为 908.45, 验证试验平均值为 897.58, 相对误差为 1.20%; R 语言环境下 BP 神经网络和遗传算法处理得到的最佳提取工艺为提取时间 2 h、乙醇体积分数 40%、提取温度 100 ℃、液料比 14 : 1, 该模型综合评价预测值为 907.71, 验证试验平均值为 905.33, 相对误差为 0.26%。结论 对比 2 种分析方法发现, 神经网络结合遗传算法的相对误差较小, 与验证试验拟合度较高, 即 R 语言环境下的 BP 神经网络和遗传算法数学模型可用来对 BHD 中有效成分的提取工艺进行分析和预测, 优于响应面分析, 为实现中药有效成分目标寻优以及中药现代化提供了新的思路 and 参考。

关键词: 补阳还五汤; 提取工艺; 响应面法; R 语言; 神经网络; 遗传算法; HPLC; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)01-0135-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.019

Optimization of extraction process of main active ingredients in Buyang Huanwu Decoction based on two analytical methods

YIN Fei, YANG Jie-hong, FANG Yu-chen, YU Li, ZHOU Hui-fen, JIN Wei-feng, HE Yu, WAN Hai-tong

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To optimize the extraction process of main active ingredients from Buyang Huanwu Decoction (BHD) by comparing BP neural network combined with genetic algorithm under R language environment with response surface analysis. **Methods** On the basis of single factor test, the response surface design method was adopted and the main active ingredients of the extract were determined by HPLC. The results were presented in the form of extraction rate. The comprehensive evaluation value of the results was obtained by using the entropy method. Based on this, the best extraction process and the predictive comprehensive evaluation value of extraction rate were firstly obtained by using response surface analysis method. In order to find another best extraction process and comprehensive evaluation predictive value of the main active ingredients in BHD, the optimization of the network model and the discovery of the optimal target were conducted through the BP neural network combined with genetic algorithm under R language environment, respectively. **Results** The optimum extraction technology in response surface analysis were as follows: Extraction time was 1.8 h; Ethanol concentration was 51%; Extraction temperature was 91 ℃; Liquid material ratio was 14 : 1. Under the condition, the comprehensive predicted value was 908.45; The average of the verification test was 897.58; The relative error was 1.20%. The best extraction process by BP neural network combined with genetic algorithm under R language environment was as follows: extraction time was 2 h; Ethanol concentration was 40%; Extraction temperature was 100 ℃; Liquid material ratio was 14 : 1. Under the condition, the predicted value was 907.71; The average of the verification test was 905.33; And the

收稿日期: 2017-09-28

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81630105); 国家自然科学基金面上项目 (81374053); 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ17H270001)

作者简介: 尹 斐 (1992—), 男, 山西朔州人, 主要从事中药有效成分分离、药理及药动学研究。E-mail: Yin_fei_mail@126.com

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

relative error was 0.26%. **Conclusion** Through the comparison of the two analytical methods, it was found that the relative error of neural network combined with genetic algorithm is smaller and the fitting degree with the verification test is higher. That was to say, BP neural network model combined with genetic algorithm in R language environment was more suitable than response surface analysis to optimize the extraction process of the main active ingredients in BHD, which provided a new idea and reference for the discovery of active ingredients and modernization of Traditional Chinese Medicine.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; extraction process; response surface methodology; R language; neural network; genetic algorithm; HPLC; hydroxyl-safflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; calycosin; formononetin

补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BHD)是经典中药复方制剂,其组方由黄芪、当归、川芎、地龙、赤芍、红花、桃仁按比例 6:2:2:2:2:1:1 组成,是治疗恢复期脑梗死最常见的气虚血瘀证型的代表性方剂。具有抗炎、清除自由基、加快神经干细胞分化与生长、调节血液流变学、降低脑组织缺血再灌注损伤等作用^[1-2]。

大量研究表明,红花中的羟基红花黄色素 A(hydroxyl-safflor yellow A, HSYA)、当归和川芎中的阿魏酸、赤芍中的芍药苷、以及黄芪中的毛蕊异黄酮、芒柄花素是这些中药的代表活性成分。这些成分都具有保护心脑血管,提高免疫力,抗氧化、神经保护等药理作用^[3-8]。因此本实验选取这 5 种成分进行提取与分析方法的研究。

响应面法(response surface methodology, RSM)是一种综合数学方法和统计方法的分析方法^[9],响应多个变量的影响,对问题进行建模和分析,从而优化响应值,得到最优预测结果。R 语言是一种基于统计、运算和绘图的数据处理语言^[10],由于其开源性、可移植性、灵活性而在统计、生物等学科领域有着广泛的应用;BP 神经网络即误差反向传播,是一种以误差的反向传播为基础的训练算法^[11],目前被公认为模拟输入和输出近似关系的最佳网络;遗传算法模拟了自然进化过程,在此基础上搜寻最优解,是一种简单、高效、易于操作的寻优算法^[12]。大多数研究者通常在提取研究中采用正交、SPSS 等软件分析数据,而响应面分析和 R 语言环境下的 BP 神经网络模型及遗传算法(以下简称 R 语言模型方法)可以更有效地对中药有效成分的提取进行分析和寻优,使结果更加可靠。然而大多报道^[9,13]只采用一种分析方法对提取结果进行预测优化,多种分析预测方法比较的寻优鲜有报道。

本实验首先建立同时检测 HSYA、阿魏酸、芍药苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 5 种有效成分的 HPLC 法,在定量检测方法学的基础上对 BHD 中 5 种有效成分进行测定,再运用响应面分析和 R 语言模型

方法对数据结果进行处理和分析,对 2 种分析方法进行预测寻优,从而得到最佳优化提取工艺及分析方法。

1 仪器与材料

Mettler Toledo XP105 电子天平,梅特勒-托利多国际有限公司;Millipore(SH3DA00008)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;SHZ-D(III)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;Agilent 1200 高效液相色谱系统,包括 G1311A 四元梯度泵、G1322A 在线脱气机、G1316A 柱温箱、G1315D DAD 检测器和化学工作站。

HSYA 对照品(批号 SZ201702005QA,质量分数 $\geq 98\%$)、阿魏酸对照品(批号 SZ201604019AWS,质量分数 $\geq 98\%$),南京世洲生物科技有限公司;芍药苷对照品(批号 X27F8C30162,质量分数 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司;毛蕊异黄酮对照品(批号 20130408,质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花素对照品(批号 20130408,质量分数 $\geq 98\%$),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。

黄芪[豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao 的干燥根,甘肃,批号 160701]、川芎[伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根,四川,批号 160201]、当归[伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,甘肃,批号 161001]、地龙[钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体,广东,批号 170302]、赤芍(毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,内蒙古,批号 170301)、桃仁[蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子,陕西,批号 170201]均购于浙江中医药大学中药饮片有限公司,红花(菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥根,杭州方回春堂国药馆有限公司,新疆,批号 140206),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，均符合《中国药典》2015 年版相关规范要求。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，响应面软件 Design-Expert.V8.0.6。

2 方法与结果

2.1 HPLC 同时测定 5 种有效成分

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液，采用梯度洗脱程序：0~30 min, 5%~20% 乙腈；30~60 min, 20%~60%乙腈；60~70 min, 60%~90%乙腈；70~80 min, 90%乙腈；体积流量 1.00 mL/min；为了能够同时检测 5 种有效成分，选择检测波长 230 nm；柱温为 30 ℃；进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 HSYA、芍药苷、阿魏酸对照品适量，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度线，充分摇匀，制成 2 mg/mL 的单一成分储备液。精密称取毛蕊异黄酮 5 mg 和芒柄花素 2 mg 分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度线，充分摇匀，制成含毛蕊异黄酮 0.50 mg/mL 和芒柄花素 0.20 mg/mL 的对照品储备液。分别精密吸取上述 5 种储备液各 2 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度线，摇匀，即得混合对照品溶液 (HSYA 0.20 mg/mL、芍药苷 0.20 mg/mL、阿魏酸 0.20 mg/mL、毛蕊异黄酮 0.05 mg/mL、芒柄花素 0.02 mg/mL)。

2.1.3 BHD 组方溶液的提取与供试品溶液的制备 按照 BHD 组方中药材的比例称取药材 8 g，精密称定，置于圆底烧瓶中，精密加入 60%乙醇 120 mL，称定质量，在 80 ℃下加热回流提取 2 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，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

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 10 μL，注入液相色谱仪，按“2.1.1”项下方法测定。5 种成分可达基线分离，各吸收峰的理论塔板数均不低于 5 000，分离度大于 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，对混合对照品溶液进行倍比稀释，制成一系列质量浓度溶液，即 2~6 号混合对照品溶液。按照

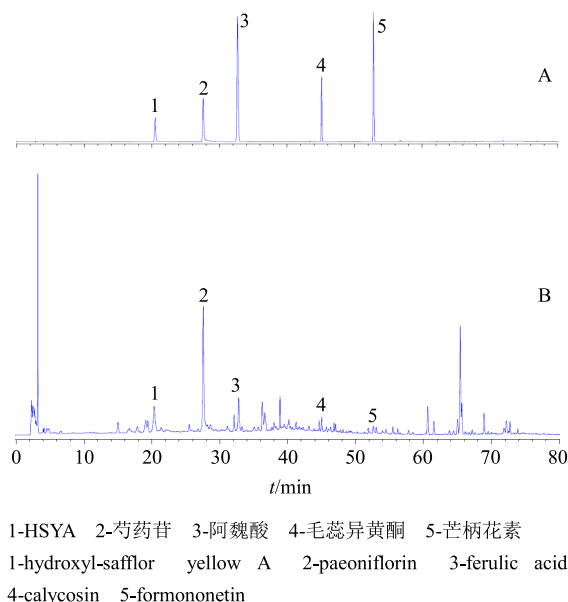


图 1 混合对照品 (A) 和 BHD 样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference (A) and BHD samples (B)

“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)，相应的峰面积积分值为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程。结果 HSYA $Y=7\,447.1X+6.762\,5$, $R^2=0.999\,3$ ；芍药苷 $Y=10\,900X-42.442$, $R^2=0.999\,8$ ；阿魏酸 $Y=37\,882X-106.68$, $R^2=0.999\,8$ ；毛蕊异黄酮 $Y=64\,077X-8.119\,2$, $R^2=0.999\,8$ ；芒柄花素 $Y=44\,998X+0.984\,3$, $R^2=0.999\,5$ 。HSYA 在 0.01~0.40 mg/mL 呈良好线性关系；芍药苷在 0.01~0.40 mg/mL 呈良好线性关系；阿魏酸在 0.01~0.40 mg/mL 呈良好线性关系；毛蕊异黄酮在 2.5~100.0 μg/mL 呈良好线性关系；芒柄花素在 0.001~0.040 mg/mL 呈良好线性关系。当信噪比 (S/N) 为 3 时，HSYA、芍药苷、阿魏酸的最低检测限均为 0.005 mg/mL，毛蕊异黄酮的最低检测限为 0.001 mg/mL，芒柄花素的最低检测限为 0.5 μg/mL。

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”项下色谱条件重复进样 6 次，记录混合对照品溶液中 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮、芒柄花素的色谱峰面积，并计算 RSD 值分别为 0.69%、0.52%、0.68%、0.58%、0.68%，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 HSYA、芍药苷、阿魏酸、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 1.70%、1.52%、1.43%、1.58%、1.93%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 选取同一批药材，按 BHD 组方中药材的比例称取药材 8 g，精密称取 6 份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，记录 HSYA、芍药苷、阿魏酸、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 1.14%、1.29%、1.76%、2.88%、2.75%，表明该方法重复性良好。

2.1.9 回收率试验 取已测定的同一批药材，按 BHD 组方中药材的比例精密称取药材 4 g，共 6 份，按照“2.1.3”项下方法制备提取样品溶液，每份各精密加入 HSYA 对照品 2 mg、芍药苷对照品 2.50 mg、阿魏酸对照品 0.30 mg、毛蕊异黄酮对照品 0.08 mg 和芒柄花素对照品 0.05 mg，制备供试品溶液，按照色谱条件进行测定，HSYA 的平均回收率为 106.03%，RSD 为 1.44%；芍药苷的平均回收率为 102.26%，RSD 为 2.75%；阿魏酸的平均回收率为 97.90%，RSD 为 1.96%；毛蕊异黄酮的平均回收率为 96.62%，RSD 为 2.79%；芒柄花素的平均回收率为 92.91%，RSD 为 1.67%，说明该方法回收率良好。

2.2 响应面试验设计

2.2.1 因素水平设计 在单因素实验的基础上确定影响 BHD 组方中 5 种有效成分提取率的 4 个因素：提取时间 (A)、乙醇体积分数 (B)、提取温度 (C)、液料比 (D)，进行响应面设计，筛选最佳提取工艺。见表 1。

2.2.2 试验方法 按 BHD 组方中药材的比例称取药材 8 g，共 30 份，按照响应面设计条件进行提取，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，即得 30 个样品溶液，密封放置冰箱内备用。最后按照“2.1”项下方法测定 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率，结果见表 1。

提取率 = 各指标成分含量 / 生药材量

2.2.3 5 种成分提取结果综合评价值的计算 本实验对 BHD 中的 5 种有效成分进行了测定，为了能够综合评价提取结果，利用熵权法给每种成分赋予权重^[14]，通过 R 语言编程之后，得到 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素的权重系数分别为 0.312、0.229、0.230、0.120 和 0.109。即综合评价值 = HSYA 提取率 × 0.312 + 芍药苷提取率 ×

0.229 + 阿魏酸提取率 × 0.230 + 毛蕊异黄酮提取率 × 0.120 + 芒柄花素提取率 × 0.109。综合评价值见表 1。

2.2.4 响应面分析结果 采用 Design-Expert.V8.0.6 响应面软件对上述响应面提取后得到的综合评价值进行分析：模型的 P 值为 0.016 1，提取时间的 P_A 为 0.185 1，乙醇体积分数的 P_B 为 0.018 8，提取温度的 P_C 为 0.093 1，液料比的 P_D 为 0.036 1。模型方程为综合评价值 = $899.45 + 6.36 A - 12.05 B + 8.21 C + 10.53 D + 0.56 AB - 5.21 AC + 5.02 AD + 1.84 BC - 0.75 BD + 1.19 CD - 7.26 A^2 - 18.21 B^2 - 12.68 C^2 - 8.90 D^2$ 。同时得到模型的预测结果为提取时间 1.8 h，乙醇体积分数 51%，提取温度 91 °C，液料比 14 : 1，该条件下预测得到的响应面结果为 908.45。

2.3 R 语言环境下 BP 神经网络建模

本实验建立 3 层结构的 BP 神经网络模型，输入 4 个节点，即提取时间、乙醇体积分数、提取温度、液料比；输出 1 个节点，即综合评价值。30 组响应面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，30 组数据经留一法交叉验证，其平均拟合误差为 2.85%，平均预测误差为 3.39%，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 语言编程中运用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 11 代，运行时间为 6 s，运行到第 2 代时得出网络预测综合评价值为 907.71。得到该结果的条件分别为提取时间 2 h，乙醇体积分数 40%，提取温度 100 °C，液料比 14 : 1。

2.5 验证试验

按上述 2 种方法优化后的提取工艺条件，称取 80 g 药材，共 8 份，分别按照响应面分析和 R 语言模型方法得到的最优提取工艺进行乙醇热回流提取实验，测定 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素的提取率，结果见表 2。

可见响应面实验平均综合评价值为 897.58，预

表 1 响应面试验设计方案及结果 ($n = 3$)Table 1 Design and results of RSM ($n = 3$)

序号	A/h	B/%	C/℃	D/倍	提取率/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					综合评价值
					HSYA	芍药苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮	芒柄花素	
1	2.0	40	85	14	1 401.75	1 817.24	178.00	58.75	30.00	904.78
2	2.0	70	85	14	1 175.00	1 757.40	235.00	68.75	43.75	836.20
3	2.0	40	95	10	1 320.30	1 681.85	181.25	52.50	26.25	847.95
4	1.0	40	95	14	1 246.30	1 867.00	206.23	62.50	33.75	875.08
5	1.5	55	90	12	1 431.00	1 659.85	248.55	63.75	36.25	895.36
6	1.0	70	85	10	851.40	2 081.85	190.00	63.75	40.00	798.31
7	1.5	55	90	12	1 502.07	1 592.80	237.50	65.00	37.50	899.88
8	1.5	55	90	16	1 272.10	1 901.31	248.75	72.50	38.75	902.53
9	1.0	40	95	10	1 137.20	1 906.24	193.75	52.50	27.50	845.31
10	1.5	55	90	12	1 323.67	1 851.85	243.75	65.00	36.25	904.95
11	2.0	40	95	14	1 308.65	1 730.00	228.75	60.00	32.50	867.87
12	1.5	85	90	12	1 103.46	1 884.41	181.25	53.75	33.75	827.74
13	2.5	55	90	12	1 168.30	2 041.65	241.25	45.00	36.25	897.04
14	1.0	40	85	14	1 480.50	1 390.00	170.00	56.25	27.50	828.99
15	1.5	55	90	12	1 446.35	1 629.60	246.25	68.75	38.75	893.55
16	1.5	55	90	8	1 308.75	1 718.55	201.25	58.75	33.75	858.93
17	1.0	70	85	14	947.10	2 092.40	196.25	60.00	36.25	831.15
18	1.0	70	95	10	1 142.80	1 791.46	210.00	56.25	33.75	825.63
19	1.5	55	80	12	1 428.23	1 480.00	152.50	45.00	25.00	827.67
20	2.0	70	85	10	933.10	2 108.75	213.75	63.75	35.00	834.87
21	1.0	40	85	10	1 284.40	1 766.75	182.50	53.75	27.50	856.79
22	2.0	40	85	10	1 371.20	1 590.50	165.00	45.00	22.50	837.83
23	1.5	25	90	12	1 321.25	1 746.20	181.25	32.50	13.75	859.24
24	2.0	70	95	14	1 259.95	1 754.15	221.25	58.75	36.25	856.76
25	1.5	55	90	12	1 411.20	1 720.00	242.50	63.75	36.25	901.58
26	2.0	70	95	10	1 052.00	1 902.32	207.50	55.00	33.75	822.00
27	0.5	55	90	12	1 360.90	1 720.00	210.00	58.75	33.75	877.54
28	1.5	55	90	12	1 416.70	1 703.40	248.75	66.25	37.50	901.36
29	1.5	55	100	12	1 181.25	2 059.00	225.00	65.00	35.00	903.57
30	1.0	70	95	14	1 054.55	1 942.50	212.50	57.50	33.75	833.46

测值为 908.45, 实验测量值和预测值的相对误差 1.20%; R 语言模型方法下的实验平均综合评价值为 905.33, 预测值为 907.71, 实验测量值和预测值的相对误差为 0.26%。从上述验证试验可以得到, 响应面的预测结果虽然比 R 语言模型方法的大, 但其试验平均验证值却小于 R 语言模型方法, 且相对误差大于 R 语言模型方法。即认为 R 语言模型方法优化后, 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和目标寻优, 故该模型优于响应面方法。

3 讨论

3.1 实验因素的确定

参照相关文献和资料^[9,15], 提取时间、乙醇体积分数、提取次数、提取温度和液料比对 HSYA、芍药苷、阿魏酸、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 0、20%、40%、60%、80%、100%, 提取次数 1、2、3、4 次, 提取时间 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h, 提取温度 60、70、80、90、100 ℃, 液料比 10、15、20、25 倍, 发现乙醇体积分数、提取时间、提取温

表 2 2 种方法最佳工艺的验证试验
Table 2 Verification of two methods under optimal process

分析方法	验证试验	提取率/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					综合评价值	平均值
		HSYA	芍药苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮	芒柄花素		
响应面分析	样品 1	1 406.70	1 713.40	248.75	66.25	37.50	900.54	897.58
	样品 2	1 393.67	1 751.85	243.75	65.00	36.25	903.85	
	样品 3	1 462.07	1 602.80	237.50	65.00	37.50	889.71	
	样品 4	1 462.35	1 619.60	246.25	68.75	38.75	896.25	
R 语言分析	样品 5	1 375.50	1 786.90	235.50	66.50	38.50	908.89	905.33
	样品 6	1 335.60	1 789.50	246.70	67.00	37.25	895.40	
	样品 7	1 375.80	1 793.80	248.20	68.50	38.25	909.55	
	样品 8	1 418.50	1 726.50	248.60	68.25	38.00	907.48	

度和乙醇用量对 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素提取率影响最大。提取过程中发现提取 3 次后, 5 种成分提取率没有明显增加, 考虑到环保、经济等因素, 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^[3]和《中国药典》2015 年版^[16], HSYA 是红花的水溶性成分, 也是红花的主要活性化学成分, 具有抑制血小板聚集、抗氧化、抗炎等多种药理学活性, 在体内和体外都表现出神经保护作用; 赤芍中以芍药苷的药理活性最为明显, 具有抗痉挛、抗炎、抗溃疡、抗氧化、抗凝血以及调节胆固醇的特性, 据报道, 芍药苷有神经保护作用, 能够改善认知功能障碍^[4]。当归和川芎中的阿魏酸的药理作用近年来也愈发被研究者重视, 有研究表明^[5-6], 阿魏酸通过减少损伤诱导的神经元细胞损伤过氧化物酶-2 和调节硫氧蛋白的水平而发挥神经保护作用, 对局灶性脑缺血有神经保护作用。黄芪中的毛蕊异黄酮是典型的植物雌激素, 据报道, 雌激素可以提供神经保护作用, 并且植物雌激素的饮食摄入可以减少脑缺血再灌注动物模型的中风损伤^[7]。同样也是黄芪中的黄酮类化合物, 芒柄花素在研究中也体现出了很有效的神经保护作用^[8]。因此本研究选取上述 5 种成分作为考察指标, 为 BHD 中有效成分的质量评价和质量控制提供参考。

3.3 液相测定方法的选择

在相关文献报道和《中国药典》2015 年版^[16]记载 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素的 HPLC 条件的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, 本实验就以这 2 种系统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, 成分较

复杂, 流动相中需要加入少量酸来调整出峰时间以及调节峰形, 实验中发现乙腈-0.05%磷酸水溶液进行梯度洗脱能把 HSYA、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮和芒柄花素峰分离, 达到分离要求, 且整体出峰良好, 故最终确定流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液。由于有 5 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充分洗脱。采用液相紫外全波长扫描, 发现 5 种指标成分都在 230 nm 处都有较大吸收, 故选取此波长进行同时定量测定。

3.4 熵权法赋予权重

目前在相关研究中, 实验者大多对指标赋予权重, 这样对结果的可靠性影响较大, 在需要进行综合指标的指标体系中, 由于每个指标的影响力不尽相同, 必须分析每个指标的重要程度从而赋予不同的权重。权重直接关系到这一指标对总体的贡献性大小, 即各个指标在整个体系中的重要程度。因此, 对整体中的每个指标合理的赋予权重是综合分析的基础。熵权法能够综合考虑各个指标的影响, 通过他们在整个体系中提供的信息量来计算综合指标。本研究中各有效成分的量本身就不同, 因此对综合评价的影响也不尽相同, 熵权法作为一种客观的综合定权法, 根据各成分所提供的信息量大小来确定其权重, 是一种理想的方法。由于信息论的概念逐步被人们所认知, 熵的概念也逐渐在各种领域得到应用。在评价研究中, 研究者经常要综合考虑到每个指标的相对重要程度。为了能够合理地进行综合评价, 给每个指标赋予权重是一种简便、快捷、高效的方法。

3.5 响应面法与 R 语言模型方法比较

本实验采用比正交分析更加全面的响应面分析

及神经网络等现代优化法 2 种分析方法对 BHD 提取工艺进行优化。经过数据的处理与分析,发现尽管响应面法的综合评价预测值大于 R 语言模型方法,但其最终验证试验的结果却劣于 R 语言模型方法,说明在实际试验中,R 语言模型方法更能对试验起到优化、验证的结果。分析其原因,响应面法运用具有明确表达形式的多项式来表达隐式功能函数,将复杂的位置函数关系在小区域内用简单的一次或二次多项式模型来拟合,计算简便,但若变量个数比较多时,构造一个多项式就有失确定性和准确性,本研究恰好体现了这一点。R 语言模型方法很好的解决了这一问题。R 语言结合具有学习规则、自身优化训练的 BP 神经网络以及模拟自然进化过程的遗传算法,不仅能在给定的区域进行寻优,还能预测网络下的最优值。这样就能使分析结果更加符合实际情况。

中药本身就是多靶点治疗,目前国内外对中药的研究尚存疑惑,而本实验所涉及的多目标提取工艺吻合了中药的多成分、多靶点的特点。本实验所建立的以 R 语言为基础结合 BP 神经网络和遗传算法的数学模型,在多目标寻优如中药提取条件寻优中效果显著,简便快捷,为中药有效成分多目标寻优和实现中药现代化提供了新的思路 and 参考。

参考文献

- [1] 任西珍. 对气虚血瘀型恢复期脑梗死患者应用补阳还五汤治疗的效果探析 [J]. 当代医药论丛, 2017, 15(15): 185-186.
- [2] 吴常青, 汪春彦, 邵旭, 等. 补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 114-117.
- [3] Zhu H B, Wang Z H, Ma C J, *et al.* Neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow A: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(5): 429-433.
- [4] Gu X, Cai Z, Cai M, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on inflammation and apoptosis in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2247-2252.
- [5] Sung J H, Gim S A, Koh P O. Ferulic acid attenuates the cerebral ischemic injury-induced decrease in peroxiredoxin-2 and thioredoxin expression [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 566(18): 88-92.
- [6] Koh P O. Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 555(1): 7-11.
- [7] Guo C, Tong L, Xi M, *et al.* Neuroprotective effect of calycosin on cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 768-774.
- [8] Liang K, Ye Y, Wang Y, *et al.* Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Neuro Sci*, 2014, 344(1/2): 100-104.
- [9] 侯学敏, 李林霞, 张直峰, 等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2013, 34(6): 124-128.
- [10] Torgo L. *Data Mining with R: Learning with Case Studies* [M]. London: Chapman and Hall/CRC Press, 2011.
- [11] 虞立, 何昱, 金伟锋, 等. 数学模型在中药研究方面的应用进展 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2106-2110.
- [12] Bagchi T P. *Multiobjective Scheduling by Genetic Algorithms Contents* [M]. New York: Springer US, 1999.
- [13] 张宇燕, 盖玉权, 李鹏, 等. 非支配排序遗传算法多目标优化补阳还五汤总苷提取的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013(4): 1059-1062.
- [14] Zamri N, Abdullah L. A new linguistic variable in interval type-2 fuzzy entropy weight of a decision making method [J]. *Procedia Computer Sci*, 2013, 24(10): 42-53.
- [15] 樊如强, 傅宏征, 金学英, 等. 刺五加有效成分提取工艺考察及不同产地刺五加中有效成分量的比较 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 260-264.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2015.