

遗传神经网络与遗传算法优选黄芪皂苷微波提取工艺条件

黄鹏程, 金伟锋, 万海同, 李 畅, 陈建真, 楼小红, 何 昱*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: 目的 基于中心组合试验设计 (central-composite design, CCD), 采用遗传神经网络 (genetic neural network, GNN) 和遗传算法 (genetic algorithm, GA) 优选黄芪皂苷类成分的微波提取工艺条件。方法 构建黄芪皂苷的 HPLC 指纹图谱, 选择含量较高的 7 种成分 (黄芪皂苷 I~V 和异黄芪皂苷 I、II), 以峰面积代替质量浓度, 将通过熵权法计算得到的综合得分作为评价指标。在单因素实验基础上, 运用 CCD 开展实验, 构建遗传神经网络以建立提取工艺条件与评价指标之间的定量关系, 并通过遗传算法优选微波提取黄芪皂苷成分的最佳工艺参数, 并与响应面法优化结果进行比较。结果 通过 GNN 与 GA 获得的最佳提取工艺条件为提取时间 260 s、提取功率 695 W、乙醇体积分数 50%、液料比 21.5, 7 个皂苷成分的综合得分为 1 432.584; 响应面分析法获得最佳提取工艺条件为提取时间 190 s、提取功率 880 W、乙醇体积分数 70%、料液比 18.5, 7 个皂苷成分的综合得分为 1 066.236; GNN 与 GA 所获提取工艺条件可有效增加综合得分。结论 通过熵权法以及遗传神经网络构建黄芪皂苷成分与微波提取工艺条件之间的数学模型是可行的, 可为实现中药有效部位多成分提取、分离纯化的工艺优选提供一种新的模式。

关键词: 黄芪皂苷; 微波提取工艺; 多目标优选; 遗传神经网络; 遗传算法; 黄芪皂苷 V; 黄芪皂苷 IV; 黄芪皂苷 III; 黄芪皂苷 II; 黄芪皂苷 I; 异黄芪皂苷 I; 异黄芪皂苷 II

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3815-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.012

Optimization of microwave extraction conditions of astragalus saponins by genetic neural network and genetic algorithm

HUANG Peng-cheng, JIN Wei-feng, WAN Hai-tong, LI Chang, CHEN Jian-zhen, LOU Xiao-hong, HE Yu

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective Based on the central-composite design (CCD), the genetic neural network (GNN) and genetic algorithm (GA) were applied to optimize the microwave extraction conditions of astragalus saponins. **Methods** The HPLC fingerprint of astragaloside was constructed, and seven components (astragaloside I—V, isoastragaloside I, II) were selected to calculate the comprehensive score by the entropy weight method. On the basis of single factor experiment, CCD was used to designed the experimental condition. The quantitative relationship between extraction conditions and comprehensive score was established by GNN, and the optimal microwave extraction parameters of astragalus saponins were optimized by GA. **Results** The optimal extraction conditions were obtained by GA-GNN. The extraction time was 260 s, the extraction power was 695 W, the ethanol content was 50%, the ratio of material to liquid was 21.5, and the comprehensive score of seven astragalosides was 1 432.584. Meanwhile, the optimal extraction conditions and comprehensive evaluation scores obtained were by response surface methodology (RSM). The extraction time was 190 s, the extraction power was 880 W, the ethanol content was 70%, the ratio of material to liquid was 18.5, and the comprehensive scores of seven astragaloside were 1 066.236. The experimental results showed that the extraction conditions obtained by GA-GNN can effectively increase the comprehensive score. **Conclusion** It is feasible to construct a mathematical model between astragaloside components and microwave extraction conditions by using entropy weight method combined with GNN, which can provide a new scientific method for optimizing the extraction, separation, and purification of effective components of traditional Chinese medicine.

收稿日期: 2019-05-10

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LZ18H270001); 国家自然科学基金项目 (81630105); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目 (2014-108-24)

作者简介: 黄鹏程 (1995—), 男, 福建泉州人, 主要从事中药有效成分分离、药理及药动学研究。E-mail: huang_pengcheng@126.com

*通信作者 何 昱 Tel: (0571)61768145 E-mail: heyu0923@hotmail.com

Key words: astragalus saponin; microwave extraction technique; multiple-objective optimization; genetic neural network; genetic algorithm; astragaloside V; astragaloside IV; astragaloside III; astragaloside II; astragaloside I; isoastragaloside I; isoastragaloside II

中药黄芪又名绵芪，为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根及根茎^[1]。黄芪在医药、食品、保健品等领域具有十分广泛的应用，其化学成分主要包括多糖、黄酮及三萜皂苷等^[2-4]。现代药理研究表明，黄芪皂苷类成分具有改善心血管、抗肿瘤等作用，是黄芪发挥药效的有效成分，具有良好的开发利用前景^[5-10]。

微波提取技术相比较于常规的加热回流、超声提取等技术，具有快速、溶剂用量少、提取率高等优点，广泛应用于中药有效成分的提取^[11]。中药提取工艺优选指的是单味中药采用不同的提取因素和水平，或者多味中药依据不同配方比例采用不同的提取因素和水平，按照已有的实验设计方法和提取技术进行中药化学成分的提取，并依据目标产物的得率，最终得到最佳工艺条件和最佳处方配比。因此，研究者们往往合理选择一部分实验，以较少的实验数据，通过数据分析，推断出整体的最佳试验方案。其中，Box-Behnken 试验设计 (BBD)、中心组合试验设计 (central-composite design, CCD)、均匀试验设计等是较为常用的试验设计方法^[12-14]。由于提取条件之间及其与目标产物之间的关系错综复杂，有些甚至是随机的、模糊的，因此必须求助于能够解决非线性的、复杂系统问题的高新技术。通过采用具有网络结构的机器学习模型和具有自适应能力的全局优化算法，可分析两者的内在关系和规律，最终形成一个复杂的非线性系统函数来揭示数据之间的关系。已有文献报道以黄芪甲苷或总皂苷的含量作为指标，优选黄芪皂苷成分的微波提取工艺条件^[15]。但以单一成分为指标无法体现中药有效部位的复杂性、多成分及其之间相互作用的特点，而通过可见分光光度法进行总皂苷含量测定，容易因为显色方法的特异性较差导致实验结果的偏差。本实验以黄芪皂苷 HPLC 指纹图谱中含量较高的 7 个成分含量作为检测指标，通过熵权法赋予 7 个成分相应的权重。根据计算出的综合得分，在单因素的基础上采用中心组合试验设计开展实验，通过遗传算法 (genetic algorithm, GA) 对遗传神经网络 (genetic neural network, GNN) 进行改进，基于优

化后的遗传算法-遗传神经网络模型优选黄芪皂苷类成分的微波提取工艺条件，为其今后进一步开展药理学研究提供物质基础。

1 仪器与材料

RW1.5S-5E 型微波动态萃取设备，南京澳润微波科技有限公司；Agilent1260 Infinity 型高效液相色谱仪，美国安捷伦科技有限公司；ABSCIEX 4500 QTRAP 质谱仪，美国 AB SCIEX 公司；Mettler Toledo XP105 电子天平，瑞士梅特勒-托利多仪器公司；Synergy® UV System Milipore 纯水制备仪，美国 Millipore 公司。

黄芪，购于浙江中医药大学名中医馆，经浙江中医药大学黄绳武教授鉴定为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根 (批号 190111~190120，分别编号为 S1~S10)，药材粉碎后过 20 目筛，得黄芪药材粉末；乙腈为色谱纯，美国 Tedia 公司；乙醇试剂为分析纯，杭州汇普化工仪器有限公司；正丁醇，成都市科隆化学有限公司；纯化水由 Millipore 纯水制备仪制备；黄芪甲苷对照品，批号 SZ20180506HQJG，质量分数≥98%，南京世洲生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 黄芪提取液的制备 参照《中国药典》2015 年版方法进行。精密称定黄芪药材粉末 4 g，用滤纸包裹后置索氏提取器中，加甲醇 40 mL，冷浸过夜，再加甲醇适量，加热回流 4 h。提取液溶剂回收并浓缩至干，残渣加水 10 mL，微热使溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次，每次 40 mL，合并正丁醇液，蒸干正丁醇后加甲醇复溶并定容至 10 mL，即得^[1]。

2.1.2 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，制成含黄芪甲苷 0.92 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水，线性梯度洗脱：0~5 min, 35%~38%乙腈；5~8 min, 38%~50%乙腈；8~10 min, 50%~60%乙腈；10~15 min, 60%~70%乙腈；15~23 min, 70%~80%乙腈；23~29 min, 80%~95%乙腈；29~32

min, 95%乙腈; 检测波长 203 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。以黄芪甲苷对照品计算理论塔板数不低于 64 000。

2.1.4 质谱条件 电离源: 电喷雾离子源 (ESI); 检测方式: 在正离子模式下对样品进行二级质谱数据采集。ESI 源参数如下: 扫描速度 10 000 amu/s; 扫描质量数范围 m/z 300~2 000; 气帘气 206.85 kPa (30 psi); 喷雾电压 4 500 V; 离子源温度 500 ℃; 雾化器 344.75 kPa (50 psi); 加热气 344.75 kPa (50 psi); 碰撞气为高纯氮气; 样品数据处理使用 Analyst V1.6.2 软件。

2.1.5 药材指纹图谱的建立 分别精密吸取 10 批黄芪提取液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.1.3”

项下色谱条件记录色谱图, 将所得到的 10 批样品图谱代入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)”中, 设定第 S1 批样品图谱为参照图谱, 自动匹配色谱峰, 生成黄芪提取液的对照指纹图谱 (图 1)。HPLC-ESI-MS 获取质谱信息, 通过与文献中报道黄芪皂苷类化合物的相对分子质量比对、质谱规律^[16-17]及结合部分对照品分析, 推测出 7 个皂苷成分色谱峰的化合物归属, 具体保留时间和质谱信息见表 1, 其中相对分子质量相近的成分依据其在色谱图上的出峰顺序不同进行判断。

2.1.6 精密度试验 取同一批药材提取液, 连续进样 6 次, 以黄芪甲苷的保留时间和峰面积为参照, 计算图谱中 7 个成分峰的相对保留时间 RSD 均小于

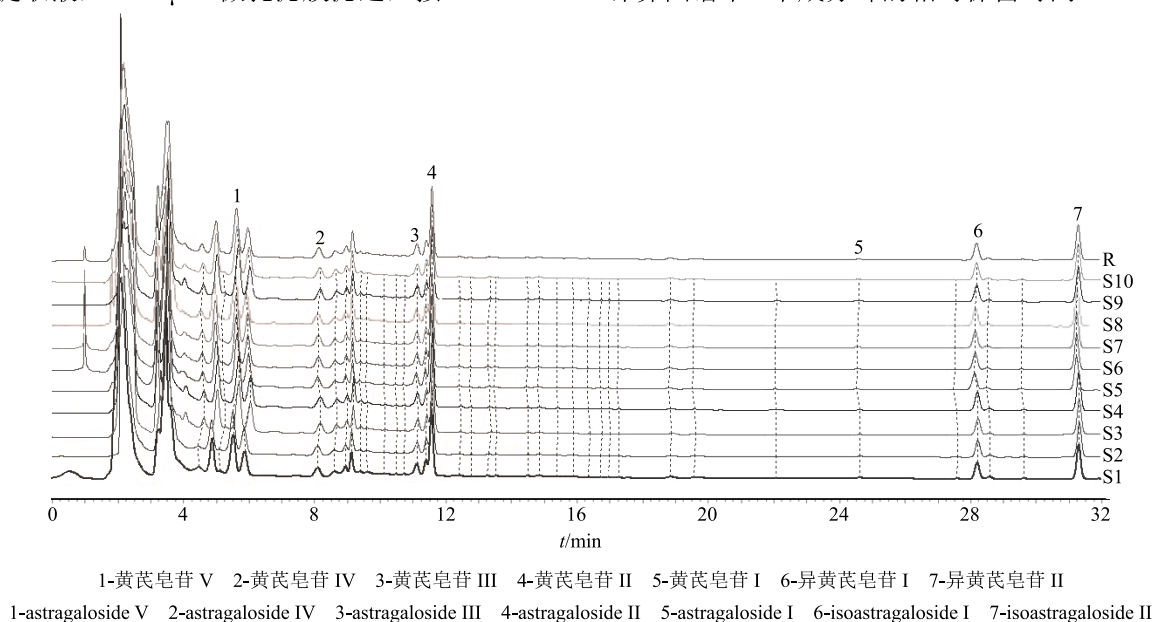


图 1 10 批黄芪提取物样品中皂苷成分指纹图谱 (S1~S10) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint for 10 batches of saponins in *Astragalus membranaceus* extract (S1—S10) and its reference fingerprint (R)

表 1 黄芪皂苷成分保留时间及质谱数据分析

Table 1 Retention times and MS data for identification of astragalus saponin

化合物	t_R /min	相对分子质量	离子模式	分子式	鉴定结果
1	5.528	947.1	$[M+H]^+$	$C_{47}H_{78}O_{19}$	黄芪皂苷 V
2	7.608	807.1	$[M+Na]^+$	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪皂苷 IV
3	11.277	807.0	$[M+Na]^+$	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪皂苷 III
4	11.742	849.5	$[M+Na]^+$	$C_{43}H_{70}O_{15}$	黄芪皂苷 II
5	23.393	891.6	$[M+Na]^+$	$C_{45}H_{72}O_{16}$	黄芪皂苷 I
6	27.951	869.8	$[M+H]^+$	$C_{45}H_{72}O_{16}$	异黄芪皂苷 I
7	30.893	827.7	$[M+H]^+$	$C_{43}H_{70}O_{15}$	异黄芪皂苷 II

2.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 说明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一批药材提取液, 分别在 0、2、4、6、10、12 h 进样, 以黄芪甲苷的保留时间和峰面积为参照, 计算图谱中 7 个成分峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 说明样品在 12 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 取同一批次药材粉末 6 份, 平行操作制备黄芪提取液, 以黄芪甲苷的保留时间和峰面积为参照, 计算图谱中 7 个成分峰的相对保留时间 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 证明方法重复性良好。

2.2 单因素实验

2.2.1 指标确定 由于黄芪中皂苷类成分的 HPLC 色谱峰峰面积与其质量浓度呈正比, 故本实验以峰面积代替质量浓度, 以其为指标优化提取工艺。

2.2.2 指标权重及综合得分计算 运用熵权法对 7 种黄芪皂苷类成分赋予相应的权重系数 (w_j), 其中 $j=1, 2, \dots, 7$ 。熵权法计算公式步骤如下:

(1) 指标的归一化处理: x_{ij} 为第 i 个提取样品的第 j 个指标成分的峰面积值 ($i=1, 2, \dots, n$; $j=1, 2, \dots, m$)。为了方便起见, 归一化后的数据仍记为 x_{ij} 。

(2) 计算第 i 个提取样品下第 j 个成分峰面积值占该指标的比重 (p_{ij})。

$$p_{ij} = x_{ij} / \sum_{i=1}^n x_{ij}, \quad i=1, \dots, n; \quad j=1, \dots, m$$

(3) 计算第 j 个成分峰面积的熵值 (e_j)。

$$e_j = -k \sum_{i=1}^n p_{ij} \ln p_{ij}, \quad \text{其中 } k=1/\ln n$$

(4) 计算信息熵冗余度 (d_j)。

$$d_j = 1 - e_j$$

(5) 计算各指标成分峰面积的权重 (w_j)。

$$w_j = d_j / \sum_{j=1}^m d_j$$

通过 Matlab 软件编写上述熵权法计算过程对应的程序, 为 7 种皂苷成分的峰面积赋予相应的权重 w_j , 由此得到样品的综合得分 (Q_i)。

$$Q_i = \sum_{j=1}^m S_{ij} w_j$$

S_{ij} 为第 i 个提取样品的第 j 个指标成分, 即峰面积

2.2.3 提取次数的考察 称取黄芪粗粉约 20 g, 置于微波提取设备中, 用 10 倍量 95%乙醇分别提取 1、2、3 次, 每次 120 s, 功率为 800 W, 提取转速为 90 r/min, 每间隔 30 min 再次提取, 提取液滤过后合并, 浓缩近干后加水 10 mL 复溶, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇液, 蒸干正丁醇后加甲醇复溶并定容至 10 mL, 测定各皂苷成分的峰面积, 由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i , 结果见表 2。当提取次数为 2 时, Q_i 值最大, 故选择提取次数 2 次 (黄芪皂苷成分峰面积分别用以下符号表示: S₁-黄芪皂苷 I、S₂-黄芪皂苷 II、S₃-黄芪皂苷 III、S₄-黄芪皂苷 IV、S₅-黄芪皂苷 V、S₆-异黄芪皂苷 I、S₇-异黄芪皂苷 II)。

2.2.4 提取转速的考察 称取黄芪粗粉约 20 g, 加入 10 倍量的 95%乙醇提取 2 次, 每次提取时间为 120 s, 提取功率为 800 W, 提取转速设为 90、180、270、360、450 r/min, 每隔 30 min 再次提取, 提取液滤过后合并, 按“2.2.3”项下方法处理, 测定各皂苷成分的峰面积, 由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i , 结果见表 3。当提取转速为 270 r/min 时, Q_i 值最大, 故选择提取转速 270 r/min。

2.2.5 液料比的考察 称取黄芪粗粉约 20 g, 分别加入 12、14、16、18、20、22、24、26、28、30

表 2 提取次数对黄芪皂苷含量的影响

Table 2 Effect of extraction frequency on astragaloside content

提取次数	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
1	64.11	1 276.71	596.74	52.09	28.99	830.67	1 609.36	291.55
2	41.72	1 155.22	981.98	93.56	41.34	1 095.54	2 065.65	415.51
3	36.44	1 219.68	975.23	99.28	36.54	953.32	1 840.59	396.24
权重	0.273	0.007	0.210	0.316	0.092	0.056	0.046	

表 3 提取转速对黄芪皂苷含量的影响

Table 3 Effect of rotation rate on astragaloside content

转速/(r·min ⁻¹)	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
90	165.89	3 518.02	814.31	133.98	153.95	2 050.37	3 152.63	654.56
180	166.61	3 809.26	633.06	65.20	314.63	1 155.97	2 836.77	515.12
270	182.42	3 870.08	642.11	188.86	287.60	1 802.10	3 773.22	706.64
360	160.93	3 950.77	549.21	153.34	313.19	1 716.04	2 911.66	626.74
450	216.10	3 739.23	639.67	161.34	327.67	1 721.05	2 711.83	630.22
权重	0.052	0.006	0.071	0.420	0.253	0.135	0.061	

倍量 95%乙醇提取 2 次,每次 120 s,功率为 800 W,提取转速为 90 r/min,每间隔 30 min 再次提取,提取液滤过后合并后按“2.2.3”项下处理,测定各皂苷成分的峰面积,由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i ,结果见表 4。当液料比为 18、20 时二者 Q_i 值相近,但当液料比超过 20 时 Q_i 值迅速下降,因此选择液料比为 18。

2.2.6 提取时间的考察 称取黄芪粗粉约 20 g,加入 10 倍量 95%乙醇提取 2 次,提取时间分别为 60、120、180、240、300 s,功率为 800 W,提取转速为 90 r/min,每间隔 30 min 再次提取,提取液滤过

后合并后按“2.2.3”项下处理,测定各皂苷成分的峰面积,由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i ,结果见表 5。当提取时间为 180 s 时, Q_i 值最大,故选择提取时间为 180 s。

2.2.7 提取功率的考察 称取黄芪粗粉约 20 g,加入 10 倍量 95%乙醇提取 2 次,每次 120 s,功率分别为 600、800、1 000、1 200、1 400 W,提取转速为 90 r/min,每间隔 30 min 再次提取,提取液滤过后合并,按“2.2.3”项下方法处理,测定各皂苷成分的峰面积,由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i ,结果见表 6。功率过高时溶剂蒸发太快,可

表 4 液料比对黄芪皂苷含量的影响

Table 4 Effect of material-liquid ratio on astragaloside content

液料比	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
12	165.89	3 518.02	814.31	133.98	153.95	2 050.37	3 152.63	486.20
14	231.18	3 586.77	1 532.26	113.23	80.99	2 031.55	3 385.50	760.20
16	235.26	3 700.04	1 496.62	124.57	109.16	1 818.28	3 150.38	751.79
18	238.01	3 680.94	1 545.71	141.57	150.35	2 094.05	3 494.31	789.19
20	226.48	3 550.74	1 589.26	152.29	154.07	2 035.33	3 342.23	803.49
22	321.87	3 290.36	886.55	127.79	116.86	1 922.70	2 993.25	529.06
24	315.86	3 571.27	872.52	152.25	93.97	2 036.98	3 150.57	527.48
26	195.82	3 504.67	951.47	114.47	128.76	2 036.14	3 126.49	535.32
28	273.02	3 205.09	774.19	78.31	91.89	1 887.33	2 989.88	460.80
30	306.07	3 586.94	936.37	84.91	120.64	2 049.50	3 280.53	544.88
权重	0.183	0.009	0.388	0.191	0.210	0.008	0.011	

表 5 提取时间对黄芪皂苷含量的影响

Table 5 Effect of extraction time on astragaloside content

时间/s	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
60	94.45	2 514.55	794.27	69.66	119.13	1 810.66	1 807.45	876.77
120	165.89	3 518.02	814.31	133.98	153.95	2 050.37	3 152.63	1 270.33
180	123.02	3 188.18	1 181.18	321.82	190.88	1 437.43	3 613.70	1 413.91
240	145.05	3 745.02	645.10	158.78	161.87	2 043.23	3 396.51	1 314.28
300	177.85	1 740.72	391.46	156.21	138.07	1 216.77	1 599.48	688.03
权重	0.073	0.103	0.181	0.362	0.038	0.061	0.179	

表 6 提取功率对黄芪皂苷含量的影响

Table 6 Effect of extraction power on astragaloside content

功率/W	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
1 400	189.88	3 467.10	565.90	73.12	61.88	1 418.01	2 214.34	536.06
1 200	265.50	2 945.19	738.94	75.23	75.10	1 882.48	3 711.19	761.60
1 000	262.81	3 251.97	844.79	99.75	103.08	1 836.83	2 964.89	699.21
800	165.89	3 518.02	814.31	133.98	153.95	2 050.37	3 152.63	754.14
600	230.99	2 976.01	743.29	90.43	93.97	1 571.97	2 578.19	612.89
权重	0.126	0.022	0.070	0.204	0.392	0.067	0.119	

能会影响料液比和乙醇体积分数, 因此后续实验选择提取功率 800 W。

2.2.8 乙醇体积分数的考察 称取黄芪粗粉约 20 g, 加入 10 倍量的 95%、85%、75%、65%、55%、45% 的乙醇提取 2 次, 每次 120 s, 功率为 800 W,

提取转速为 90 r/min, 每间隔 30 min 再次提取, 提取液滤过后合并, 按“2.2.3”项下方法处理, 测定各皂苷成分的峰面积, 由“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算综合得分 Q_i , 结果见表 7。当乙醇体积分数为 65% 时 Q_i 值最大, 故选择乙醇体积分数为 65%。

表 7 乙醇体积分数对黄芪皂苷含量的影响

Table 7 Effect of ethanol content on astragaloside content

乙醇体积分数/%	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q_i
95	165.89	3 518.02	814.31	133.98	153.95	2 050.37	3 152.63	1 056.22
85	211.89	3 419.69	1 369.19	132.64	132.68	1 901.90	3 223.91	1 140.84
75	222.42	3 292.12	1 385.01	111.68	94.90	2 076.48	3 374.21	1 162.54
65	251.72	3 616.18	1 549.53	163.14	164.93	2 047.52	3 394.55	1 233.60
55	198.97	2 937.78	1 193.83	110.34	132.09	1 720.94	2 176.60	866.35
45	188.92	2 870.36	1 195.73	78.11	69.04	1 608.38	1 799.74	754.10
权重	0.069	0.031	0.147	0.195	0.309	0.037	0.212	

2.3 CCD 试验设计及结果

根据单因素实验结果, 选取提取时间 (A)、微波功率 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 4 个因素作为自变量。根据“2.2.2”项计算赋予黄芪各成分峰面积值相应的权重, 黄芪皂苷 I 为 0.114, 黄芪皂苷 II 为 0.064, 黄芪皂苷 III 为 0.213, 黄芪皂苷 IV 为 0.255, 黄芪皂苷 V 为 0.200, 异黄芪皂苷 I 为 0.132, 异黄芪皂苷 II 为 0.022, 代入“2.2.2”项下 Q_i 值公式计算 Q_i 值。以黄芪 7 个皂苷成分综合得分 (Q_i 值) 为因变量, 根据 CCD 原理, 并在模型选择中设置参数上下限水平 (α) 为 1.718 85 (即正交二次型, orthogonal quadratic), 中心点选择为 6, 实验结果见表 8。

采用响应面分析法, 运用 Design-Expert 8.0 软件对各因素水平进行建模与优化, 结果见表 9。各因素经回归拟合所得的方程为 $Q_i = -7 185.398 + 10.179 A + 122.256 C - 0.017 A^2 - 0.701 C^2$ (剔除 $P > 0.05$ 项后), 并且得到最佳的提取工艺为提取时间 192.12 s, 提取功率 879.93 W, 乙醇体积分数 70%, 料液比 18.62, 最大预测 Q_i 值为 1 134.25。考虑到操作的可行性, 将提取工艺修正为提取时间 190 s, 提取功率 880 W, 乙醇体积分数 70%, 液料比 18.5。

由表 9 可知, 非线性方程模型 $P < 0.05$, 表明该模型显著, 其校正决定系数 r^2 为 0.973 6, 表明 97.36% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释, 可靠度较高。但是该模型失拟项 $P < 0.000 1$, 表明该模型可能无法有效预测最终的 Q_i 值。因此,

响应面分析法不能很好建立提取工艺条件与目标产物之间的关系。

2.4 遗传神经网络与遗传算法优选

2.4.1 遗传神经网络建模 将响应面中的 30 组数据作为神经网络中的样本, 以 4 个提取工艺条件为输入变量, 以黄芪 7 种皂苷成分经赋权后计算得到的综合得分 Q_i 值的作为输出变量。采用 10 折交叉验证方法将数据分为 2 组: 90% 的样本作为训练数据, 10% 的样本作为验证数据, 并将神经网络模型的最大迭代次数设定为 2 000。

不同神经元数目下训练数据和验证数据的最大决定误差 (MAE_{train} 和 MAE_{test})、数据的整体误差 (MAE) 以及决定系数 (R^2) 见表 10。由表 10 可知, 当神经元数目越高, R^2 值越高。但过多的神经元会增加神经网络模型学习时间, 并会使训练掉入局部极小点的陷阱, 从而导致“过拟合”的情况出现。因此, 本实验选择神经网络的隐藏层神经元数目为 4 进行进一步的预测。最终确定为 4 个输入层, 1 个隐藏层, 4 个隐藏层节点的遗传神经网络模型。

2.4.2 遗传算法进行优选 选用训练好的遗传神经网络模型, 采用遗传算法搜寻中药提取工艺的最佳参数组合。采用实数编码方式, 种群大小为 1 000, 最大迭代次数为 200, 其他参数均设为默认值, 得到的最佳提取工艺参数为提取时间 264.03 s、提取功率 695.44 W、乙醇体积分数 51.13%、液料比 21.46, 综合得分为 1 432.584。同时, 对响应面分析法、遗传神经网络与遗传算法优选法得到结果进行试验验证, 结果见表 11。

表 8 CCD 实验结果
Table 8 Results of CCD

序号	A/s	B/W	C/%	D	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	Q _i 值
1	120	1 000	75	16	154.99	3 142.27	1 107.27	154.57	193.98	3 235.89	3 350.75	1 033.98
2	120	1 000	55	16	163.16	3 037.10	630.44	200.28	140.31	2 711.72	3 371.58	858.61
3	120	1 000	75	20	132.89	2 744.12	1 221.74	107.89	169.83	3 370.41	3 104.65	1 026.10
4	120	1 000	55	20	186.87	3 355.21	765.97	164.31	116.67	1 940.61	3 178.42	790.51
5	240	600	75	20	204.04	3 745.88	709.74	206.13	345.31	2 361.10	3 523.83	924.88
6	120	600	75	20	122.89	2 944.32	1 321.05	113.83	172.65	3 259.31	3 982.54	1 065.93
7	180	800	65	18	179.84	3 722.96	1 257.32	236.93	210.07	3 149.12	3 516.43	1 122.18
8	240	600	75	16	178.44	3 576.31	1 273.65	188.95	198.34	3 146.04	3 036.20	1 090.48
9	180	800	65	18	177.83	3 752.63	1 241.30	234.37	209.17	3 158.81	3 504.31	1 120.60
10	180	800	65	18	178.08	3 785.13	1 244.89	234.61	209.00	3 117.96	3 491.54	1 117.81
11	240	1 000	55	16	102.08	2 427.01	639.14	179.88	252.42	2 344.70	3 761.20	792.21
12	180	800	65	18	178.59	3 796.47	1 248.60	235.29	209.31	3 127.29	3 498.99	1 121.01
13	240	600	55	20	140.92	2 922.00	759.45	187.67	201.46	3 231.79	3 070.18	947.21
14	120	600	55	20	133.17	2 581.12	718.33	122.00	161.36	2 573.06	3 636.40	816.87
15	180	800	47.81	18	180.50	2 913.72	499.25	118.44	114.01	1 773.78	3 207.13	671.19
16	180	456.23	65	18	81.39	2 675.34	875.34	138.95	158.54	2 356.43	3 936.40	832.34
17	240	1 000	55	20	175.33	3 252.23	1 315.19	150.95	141.36	2 534.76	3 500.73	987.04
18	240	1 000	75	20	181.39	3 229.45	875.34	138.95	158.54	3 534.65	3 936.40	1 034.48
19	240	1 000	75	16	153.16	3 340.81	1 008.71	340.47	201.54	1 936.94	3 671.77	909.92
20	120	600	75	16	188.21	3 286.53	1 345.17	292.11	136.29	2 277.18	3 136.59	989.87
21	180	1 143.77	65	18	157.47	3 181.54	1 145.45	139.50	164.67	3 840.56	3 706.60	1 122.96
22	180	800	65	21.44	187.73	2 018.87	1 192.56	352.72	163.83	3 066.54	2 938.54	997.32
23	240	600	55	16	154.26	2 361.16	1 132.71	143.51	151.25	2 766.47	2 757.88	903.08
24	283.13	800	65	18	139.23	3 152.21	1 267.21	225.17	187.63	3 244.48	3 238.57	1 082.27
25	180	800	65	14.56	206.48	3 369.55	900.55	151.57	367.05	2 217.20	3 444.95	911.66
26	180	800	65	18	176.74	3 735.90	1 228.69	231.54	207.56	3 177.41	3 559.13	1 119.36
27	76.87	800	65	18	143.52	2 564.85	452.94	194.59	166.06	1 700.59	3 064.77	651.85
28	180	800	82.19	18	268.50	3 912.47	1 123.95	133.22	176.50	2 594.37	3 699.20	1 013.65
29	120	600	55	16	135.90	2 858.93	807.98	252.60	265.30	1 602.45	3 017.65	766.07
30	180	800	65	18	178.27	3 684.83	1 304.47	235.55	210.11	3 105.09	3 566.35	1 124.61
权重					0.114	0.064	0.213	0.255	0.200	0.132	0.022	

表 9 响应面分析的结果

Table 9 Results of response surface methodology

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	418 181.95	14	29 870.13	2.854 653	0.026 4	CD	2 364.69	1	2 364.69	0.225 991	0.641 4
A	43 940.51	1	43 940.51	4.199 343	0.058 4	A ²	66 639.87	1	66 639.87	6.368 694	0.023 4
B	8 360.81	1	8 360.81	0.799 033	0.385 5	B ²	10 353.69	1	10 353.69	0.989 489	0.335 6
C	148 323.37	1	148 323.37	14.175 091	0.001 9	C ²	85 844.82	1	85 844.82	8.204 088	0.011 8
D	7 158.71	1	7 158.71	0.684 149	0.421 1	D ²	18 089.31	1	18 089.31	1.728 774	0.208 3
AB	2 821.03	1	2 821.03	0.269 602	0.611 2	残差	156 954.94	15	10 463.66		
AC	19 154.42	1	19 154.42	1.830 566	0.196 1	失拟项	156 927.50	10	15 692.75	2 860.065	<0.000 1
AD	1 351.23	1	1 351.23	0.129 135	0.724 3	净误差	27.43	5	5.49		
BC	239.01	1	239.01	0.022 842	0.881 9	总离差	575 136.79	29			
BD	3 540.36	1	3 540.46	0.338 348	0.569 4						

表 10 神经元数目对 MAE_{train} 、 MAE_{test} 、 MAE 、 R^2 的影响
Table 10 Effect of number of hidden neurons of genetic neural network on MAE_{train} , MAE_{test} , MAE , R^2

神经元数目	MAE_{train}	MAE_{test}	MAE	R^2
1	0.202 155	0.053 377	0.202 155	0.700 985
2	0.112 226	0.118 602	0.118 602	0.871 897
3	0.069 657	0.069 640	0.069 657	0.974 097
4	0.045 482	0.020 995	0.045 482	0.989 808
5	0.002 132	0.014 602	0.014 602	0.999 981

表 11 响应面分析法、遗传神经网络与遗传算法优选法的结果对比 ($n = 3$)

Table 11 Comparison of simulation and experimental results of response surface methodology, genetic neural network, and genetic algorithm ($n = 3$)

方法	提取时间/s	提取功率/W	乙醇体积分数/%	料液比	拟合值	实际值
响应面分析法	190	880	70	18.5	1 134.25	1 066.236
遗传算法-遗传神经网络	260	695	50	21.5	1 540.17	1 432.584

物质时能够取得较理想的结果,但是其作为一种通用型质量检测器,在含量测定过程中往往能够检测出所有的物质,缺少一定的专属性,对于低浓度样品灵敏度偏低,对于结果的重现性无法取得满意的效果^[21]。并且 ELSD 的响应值与被测物浓度的关系曲线较为复杂,在较高浓度时呈线性,而在较低浓度范围时呈指数关系。而紫外检测器相比较于 ELSD 具有更高的灵敏度和检测限,相关文献也表明,通过 HPLC 结合紫外检测器进行皂苷类成分的含量测定时能够取得良好的精密度和稳定性、重现性^[22-24]。此外,通过 HPLC 结合紫外检测器与质谱仪器相串联,可以快速、有效地推测已知化合物及隐性成分的归属^[25]。

由于中药中的有效部位往往不仅仅含有一种成分,因此要对其进行多目标优选。而在多目标优选过程中,各个成分占总成分中的百分比(即权重)的分配往往十分关键。部分学者采用主观赋权法,但是这种方法容易有一定的主观随意性,无法体现评价指标之间的内在联系,从而影响到了权重分配的合理性。而当采用客观赋权法时,能够避免这种情况的出现,从而使得赋予的权重更加的合理、可靠^[26]。目前,响应面分析法作为一种常用的多变量问题分析统计方法,可通过考察各个工艺条件对目标产物指标影响的显著程度,挑选出关键性工艺条件。但是响应面法的方程拟合限制在二次多项式的基础上,拟合相关系数较低,往往容易使预测结果与实际结果有较大的误差。

3 讨论

大量研究表明,皂苷类成分是黄芪中重要的生理活性物质,在调节心脑血管系统功能、保护大脑损伤、改善血液流变学等方面具有十分广泛的药理作用^[18]。因此,将皂苷类成分作为测定目标,可以为黄芪中有效部位的质量评价和质量控制提供参考。皂苷类成分往往通过 HPLC 结合紫外检测或蒸发光散射检测(ELSD)来对其进行含量测定^[19-20]。虽然 ELSD 在测定没有紫外吸收或紫外吸收较弱的

随着人工智能的迅猛发展,研究者们不断寻找新的中药提取工艺模型及其优选算法^[27]。作为一种网络结构的数学模型,神经网络具有优良的逼近能力,在众多领域中都有着广泛应用,近年来在中药提取、纯化工艺优化等方面也有所应用^[28]。遗传神经网络可通过分析预先提供的一批相互对应的输入、输出数据,建立一个复杂的非线性模型来揭示数据之间的定量关系^[29],可用于函数拟合与模式识别。但是,传统遗传神经网络存在着学习速度慢、容易陷入局部极小值等缺点,因此往往需要对其进行适当改进。考虑到遗传算法是模拟生物进化过程的优化算法,可对神经网络权值采取“适者生存,优胜劣汰”的进化规律进行选择,使其成为一种全局优选的算法,应用于提取工艺条件优选^[30]。通过遗传算法优化后的神经网络进行工艺寻优,可以得到更准确可信的结果。应当注意的是,在对遗传算法进行编码前,需给每个基因设定约束条件,即各工艺参数都有着各自取值的上下限,超出此范围就会造成寻优不符实际条件。

本实验通过结合 HPLC 指纹图谱和熵权法对黄芪中含量较高的几种皂苷成分进行确定并赋予权重,从而对其提取工艺进行优化,与以单一成分或将总皂苷成分含量作为指标相比,能够体现中药成分的多样性及其相互影响作用。通过编写熵权法程序对 HPLC 图谱中的黄芪各皂苷成分进行赋权,综合评价黄芪中 7 个皂苷成分,将多目标转化为单目标,通过 CCD 试验设计得到 30 组试验条件及其相

应的综合得分, 将这些数据作为遗传神经网络的训练样本进行拟合, 再通过响应面法及遗传算法分别对其进行预测, 从而得到多目标优选工艺条件参数, 能够为中药有效成分多目标工艺寻优提供参考。通过遗传算法优化的遗传神经网络模型预测后得到的最佳微波提取工艺为提取时间 260 s, 提取功率 695 W, 乙醇体积分数 50%, 料液比 21.5。本实验通过遗传算法优化后的遗传神经网络模型相关系数达到 98.98%, 预测结果与实验结果相接近, 表明通过该模型优选出的工艺具有可信度, 联用熵权法、响应面分析法、遗传神经网络模型筛选黄芪皂苷类成分微波提取工艺是合理、可行的。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, *et al.* Influence of different extraction and purification methods on *Astragalus* polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 54-61.
- [3] Chu C, Qi L W, Liu E H, *et al.* *Radix Astragali* (*Astragalus*): Latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Curr Org Chem*, 2010, 14(16): 1792-1807.
- [4] 吕君, 朱鹏飞, 刘艳民, 等. 黄芪多糖通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(21): 5155-5160.
- [5] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 954-960.
- [6] 刘德丽, 包华音, 刘杨. 近 5 年黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. *食品与药品*, 2014, 16(1): 68-70.
- [7] 唐冕, 许晓芬. 药用黄芪皂苷类化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药导报*, 2018, 24(20): 117-122.
- [8] 张乐裕, 刘晨阳, 于顾然. 黄芪甲苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的体外血脑屏障模型损伤的影响及机制探究 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4099-4105.
- [9] Sun Y, Liu J, Wan L, *et al.* Improving effects of *Astragalus* polysaccharides on cardiac function via Keap1/Nrf2-ARE signal pathway in adjuvant arthritis rats [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 143-153.
- [10] 张莹, 王蕾, 杜梦楠. 注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(6): 1092-1094.
- [11] 龚盛昭, 杨卓如. 微波提取黄芩苷的协同效应研究 [J]. *精细化工*, 2003, 20(7): 435-437.
- [12] 陈桢, 李冰韶, 王永洁, 等. 设计空间法优化红花温浸提取工艺 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4544-4551.
- [13] Torbjorn L, Seifert E, Abramo L, *et al.* Experimental design and optimization [J]. *Chemometr Intell Lab*, 1998, 42(1/2): 3-40.
- [14] 卢秀霞, 潘婷婷, 杨杏, 等. 茶树油凝胶的制备及其药效学与刺激性评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(21): 5082-5092.
- [15] 杜学勤, 赵正保. 黄芪中黄芪皂苷的提取分离工艺研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(7): 1066-1068.
- [16] 芮雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(4): 607-611.
- [17] 宋慧婷, 李长印, 万瑶瑶, 等. 应用基于 LC-TOF-MS 分析的质量亏损过滤方法筛选黄芪注射液中的皂苷类成分 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 686-695.
- [18] 郭宪清, 张丽香, 姜秉荣. 黄芪皂苷类组分的现代药理研究进展 [J]. *中国药业*, 2006, 15(12): 66-67.
- [19] 唐卿雁, 陈庚, 卢迎春, 等. HPLC 同时测定三七不同部位 4 种皂苷含量 [J]. *热带农业科学*, 2018, 38(9): 91-95.
- [20] 崔雪莹, 刘阿娜, 陈述东. HPLC-ELSD 法测定黄芪中四种皂苷类成分的含量 [J]. *山东中医杂志*, 2017, 36(5): 411-413.
- [21] 罗艳, 杨柳, 涂晓琴, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法同时测定山银花提取物中 5 种皂苷的含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(7): 1914-1919.
- [22] 李文龙. 紫外-可见 (UV-Vis) 光谱法在中药质量控制中的应用 [J]. *中国民族民间医药*, 2018, 27(22): 47-50.
- [23] 王敏, 赵振霞, 雷蓉. UPLC 法同时测定人参叶和人参花中 6 种皂苷类成分的含量 [J]. *中药材*, 2018, 41(11): 2372-2375.
- [24] 刘玉梅, 周安, 俞年军, 等. HPLC-DAD 双波长法同时测定柴胡中 5 种皂苷的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(2): 363-368.
- [25] 于锋, 国明, 贾科玲, 等. 建立 HPLC-DAD-MS/MS 指纹图谱快速分析农药隐性成分的方法 [J]. *农药*, 2018, 57(1): 39-41.
- [26] 谢学铭, 郑健. 基于云模型主观赋权法的多目标决策研究 [J]. *中国西部科技*, 2009, 8(25): 7-8.
- [27] 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.
- [28] 杜雪岭, 袁其朋. 神经网络优化中药提取工艺的研究 [J]. *数理医药学杂志*, 2006, 19(3): 290-294.
- [29] 吴思佳, 金伟锋, 王航, 等. 基于遗传神经网络的双目标甘草提取工艺优化 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(4): 1719-1721.
- [30] 刘红梅, 李可意. 基于 BP 神经网络和遗传算法优化莪术超临界萃取工艺 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(5): 371-374.