

基于人工神经网络模型的黄芩提取物性状-成分与药效相关性研究

马磊¹, 王佳辉², 郝宣润², 苏青^{2*}

1. 四川大学锦城学院 电子信息学院, 四川 成都 611731

2. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500

摘要:目的 探索将性状指标(颜色与味道)引入到黄芩提取物质量评价体系中,建立全面科学的黄芩提取物质量评价方法。方法 参考《中国药典》2015 年版一部方法制备各种黄芩提取物样品,分别测定样品的性状(颜色和味道)、成分(4 种黄酮类成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素)的含量及药效(体外抑菌率),采用人工神经网络(ANN)分别建立以下模型:颜色-抑菌率 ANN 模型、味道-抑菌率 ANN 模型、成分-抑菌率 ANN 模型、颜色/味道-抑菌率 ANN 模型、颜色/成分-抑菌率 ANN 模型、味道/成分-抑菌率 ANN 模型、颜色/味道/成分-抑菌率 ANN 模型,通过比较以上 7 种模型的预测能力,探索黄芩提取物整体质量评价方法。结果 采用颜色、味道与成分含量 3 种指标相结合与体外抑菌率所建立的 ANN 模型训练和预测能力最好,其中 r^2 最高($r^2=0.92$),均方根误差(RMSE)最低(RMSE=3.54),说明颜色、味道与成分含量 3 种指标之间存在信息互补,3 种指标相结合能快速准确地预测体外抑菌率。结论 本研究证实将性状指标引入到现有的黄芩提取物质量评价体系中,性状结合成分含量指标能全面快速评价黄芩提取物的整体质量。

关键词: 人工神经网络模型;黄芩提取物;性状指标;相关性;颜色;味道;质量评价;黄芩苷;汉黄芩苷;黄芩素;汉黄芩素;体外抑菌率;均方根误差

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)08-2151-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.023

Correlation between features-composition and pharmacodynamics of *Scutellaria baicalensis* extracts based on ANN model

MA Lei¹, WANG Jia-hui², HAO Xuan-run², SU Qing²

1. College of Electronic Information, Jincheng College, Sichuan University, Chengdu 611731, China

2. College of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: Objective To establish a comprehensive scientific evaluation method for the quality of *Scutellaria baicalensis* by introducing the feature indicators (color and taste) into the quality evaluation system of *S. baicalensis* extracts (SBE) in this study. **Methods** Various samples of SBE were prepared according to Chinese Pharmacopoeia (2015 version) process, the features (color and taste), components (the content of four flavonoids: baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin), and efficacy (inhibition rate *in vitro*) of the samples were determined. The following models were established by Artificial Neural Network (ANN) model: color-inhibition rate model, taste-inhibition rate model, composition-inhibition rate model, color/taste-inhibition rate model, color/component-inhibition rate model, taste/component-inhibition rate model and color/taste/component-inhibition rate model. The overall quality assessment for SBE was explored by comparing the predictive power of the above seven models. **Results** The color/taste/component-inhibition rate ANN model ($r^2 = 0.92$, RMSE = 3.96) showed the best training and prediction ability. The value of r^2 was the highest and RMSE was the lowest, which indicated there was information complementation among the three indicators and the combination of three indicators can quickly and accurately predict the inhibition rate *in vitro* for SBE. **Conclusion** This study confirmed that feature indicators combined with component indicator can comprehensively and quickly evaluate the overall quality of SBE.

收稿日期: 2019-10-22

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研项目(17PJ568); 四川养老与老年健康协同创新项目(YLZBZ1810); 成都医学院应用开发与成果转化培育项目(14Z068); 2018 年成都医学院大学生创新创业项目(201813705056);

作者简介: 马磊, 硕士, 讲师, 从事计算机在医药领域的研究。Tel: (028)87581920 E-mail: 1774562676@qq.com

*通信作者 苏青, 博士, 副教授, 从事中药提取物及质量研究。Tel: (028)62739516 E-mail: 743591781@qq.com

Key words: ANN model; extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi; features indicators; correlation; color; taste; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; inhibition rate *in vitro*; RMSE

黄芩是传统常用中药材，为唇形科多年生草本植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根，最早记载于《神农本草经》中，味苦、性寒，具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1-2]。黄芩中含有黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类化合物以及挥发油、多糖、苯乙醇糖苷等成分^[3-4]。黄芩提取物有广义和狭义之分，广义是指黄芩药材采用适当的溶剂和方法使其中的有效成分或有效部位浸出并浓集得到的产物，狭义是指《中国药典》收载的黄芩提取物。目前黄芩提取物的质量研究主要集中在成分含量或药效方面，如王小淞等^[5]采用 HPLC-DPPH 检测黄芩提取物中的活性成分，封银曼等^[6]应用近红外光谱技术检测黄芩提取物中黄芩苷的含量；徐珊等^[7]采用解热实验研究黄芩提取物中的活性成分。于蓓蓓等^[8]基于抑菌率和有效成分含量优选黄芩提取物精制工艺。但是中药提取物中的某一种或几种成分含量不能全面反映中药的整体疗效，而药效评价实验繁琐，结果不够稳定，因此，亟需研究新方法科学全面地评价黄芩提取物质量。人工神经网络（ANN）是 20 世纪 80 年代以来人工智能领域兴起的研究热点，其采用并行分布的处理方式，具有高容错性、智能化、自主学习等特点，模拟处理复杂问题具有得天独厚的优势。而中药质量评价研究内容繁杂、影响因素众多，属于非线性复杂模型，ANN 的优势正好可以很好地处理这些复杂问题。

中药的质量评价中有“性状”指标（形、色、气、味）^[7-12]，中药提取物作为中药材重要的用药形式，中药材所特有的、又与质量密切相关的“性状”指标应该引入到中药提取物的质量评价中，才符合中药的特点^[13-16]。黄芩作为典型的苦味药，黄芩提取物也应具有相应的性状特征才符合中药的特点，因此本研究将黄芩提取物的性状指标——颜色和味道引入到现有的黄芩提取物质量评价中，采用人工神经网络建模，为探索全面科学的黄芩提取物质量评价方法提供参考。

本研究首先参考黄芩提取物《中国药典》2015 年版制备工艺，制备各种黄芩提取物样品共计 80 个；其次采用机器视觉、电子舌和 RP-HPLC 法分别测量以上 80 个样品的颜色、味道和成分；然后采用体外抑菌率实验评价以上 80 个样品对大肠杆菌

的体外抑菌活性；最后采用 MATLAB 人工神经网络工具包，分别以颜色、味道和主成分的不同排列组合方式为输入层，80 个样品对大肠杆菌的体外抑菌率为输出层，建立不同的人工神经网络（artificial neural network, ANN）模型^[17]，并对结果进行分析。

1 材料与仪器

1.1 药材

20 批黄芩饮片分别来源于不同产地，具体信息见表 1，经成都医学院药学院生药组游元元教授鉴定均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

表 1 黄芩饮片来源地

Table 1 Origins of *S. baicalensis* pieces

编号	来源地	备注
C01~C04	四川	栽培或野生
C05~C07	河北	栽培或野生
C08~C11	山东	栽培或野生
C12~C15	山西	栽培或野生
C16~C17	陕西	栽培
C18~C19	河南	栽培
C20	甘肃	栽培

1.2 试剂与仪器

对照品黄芩苷（批号 16112909，质量分数 99%）、黄芩素（批号 16102010，质量分数 99%）、汉黄芩苷（批号 16052312，质量分数 99%）、汉黄芩素（批号 16062204，质量分数 99%），成都曼思特生物科技有限公司；甲醇，色谱纯，成都思为科学仪器有限公司；大肠埃希菌 *Escherichia coli*，批号 ATCC25922，由四川省疾病预防控制中心提供；牛肉膏（75%），批号 01-020，北京奥博星生物技术有限责任公司；LP0042 蛋白胨，Oxoid 公司；琼脂，Biosharp 公司；其余常规试剂为分析纯。

新药工“中药颜色识别系统 V3-3”，HADQT-310 摄影箱、相机，自主研发； α -Astree 电子舌，模式识别软件 Alpha Mos Version 2012，法国 Alpha MOS 有限公司；DSX-280 型手提式压力蒸汽灭菌锅，上海申安医疗器械厂；SHKA4000-8CE MaxQ Shakers、1389 Biological Safety Cabinets，Thermo Fisher Scientific 公司；PXS2 酶标仪，美国基因有限公司；DHP-9052 电热恒温培养箱，上海优宁维生

物科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取“1.1”项下药材,加水煎煮 2 次,第 1 次 12 倍量水煎煮 1 h,第 2 次 12 倍量水煎煮 1 h,合并滤液,取部分滤液真空浓缩干燥至恒定质量,得黄芩药材水提物,按不同批号对第 1 组样品分别编号为 S1001~S1020;其余滤液浓缩至相对密度为 1.1,用盐酸调节 pH 值至 1.5,80 ℃保温 60 min,室温静置过夜,滤过,取部分沉淀烘干至恒定质量,得酸沉后的黄芩提取物,按不同批号对第 2 组样品分别编号为 S2001~S2020;剩余沉淀物加适量水搅匀,用 40%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0,加等量乙醇,搅拌使溶解,滤过,取部分滤液真空浓缩干燥至恒定质量,得醇沉后的黄芩提取物,按不同批号对第 3 组样品分别编号为 S3001~S3020;剩余滤液用盐酸调节 pH 值至 1.5,60 ℃保温 1 h,静置过夜,滤过,沉淀用适量水及不同浓度乙醇洗至中性,减压干燥至恒定质量,得《中国药典》2015 年版黄芩提取物,按不同批号对第 4 组样品分别编号为 S4001~S4020;以上 4 组样品共计 80 个。

2.2 颜色值测定

2.2.1 样品的准备 称取“2.1”项下定量样品,装入圆形平底玻璃表面皿中,左右摇动,使样品刚好在玻璃表面皿的底部铺满,放置于 HADQT-310 摄影箱中待拍照。

2.2.2 图像软件处理 采用“新药工”中药颜色识别系统 V3-3^[14](吴纯洁教授课题组自主开发)对拍摄的照片进行处理。首先提取图像中每个像素点的 R、G、B 值,然后将 RGB 色空间模型转化为(L 、 a 、 b)色空间模型以进行后续处理,其中 L 为亮度, a 和 b 表示色方向,如图 1 所示。

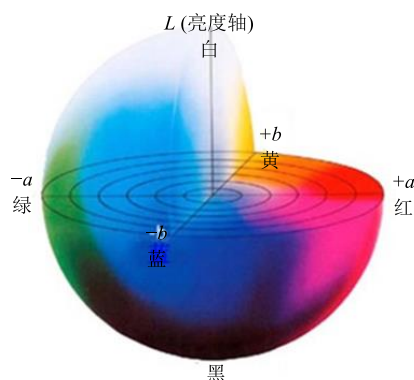


图 1 CIE Lab 颜色空间图

Fig. 1 Color space of CIE Lab

2.2.3 样品颜色的测定和分析 分别测定“2.1”项下 80 个样品的颜色值,采用“新药工”中药颜色识别系统 V3-3(自主开发)按“2.2.2”项下方法进行数据处理,提取 L 、 a 和 b 值,并采用统计软件 SPSS 20.0 和 Alpha Mos Version 2012 软件系统分析颜色数据。80 个样品的颜色值测定结果见表 2。

2.2.4 颜色值测定方法学考察 采用“2.2.3”项下方法,分别在光源打开后 30、45、60、90、120、150 min 测定同一样品的颜色值,结果显示在不同时间点颜色值 L 、 a 、 b 的平均 RSD 分别为 1.14%、1.20%、0.91%,均小于 2.00%,说明仪器光源稳定。

采用“2.2.3”项下方法,重复测定同一样品 6 次,结果显示,颜色值 L 、 a 、 b 的 RSD 分别为 0.82%、1.13%、1.51%,均小于 2.00%,数据结果稳定,仪器精密度良好。

取同一样品装入圆形平底玻璃表面皿中,左右摇动,使样品刚好在玻璃表面皿的底部铺满,平行操作 6 次,分别测定其颜色值。结果显示,颜色值 L 、 a 、 b 的 RSD 分别为 1.13%、1.11%、1.06%,均小于 2.00%,数据结果稳定,表明装样重复性良好。

2.3 味道值测定方法

2.3.1 供试品溶液准备 称取“2.1”项下定量样品,配制成质量浓度为 3 mg/mL(以生药量计)的溶液,超声溶解定容,作为供试品溶液待测。

2.3.2 敏感传感器筛选 取样品 S1001~S1005、S2001~S2005、S3001~S3005、S4001~S4005 共计 20 个,按“2.3.1”项下方法制备供试品,用 Alpha Mos Version 2012 软件进行检测,结果见表 3。从表 3 中可知 ZZ、DA、JE 3 根传感器对不同样品响应敏感,故选择 ZZ、DA、JE 3 根传感器进行后期样品测定。

2.3.3 样品味道值测定 精密量取“2.1”项下样品,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,取 80 mL 于烧杯中并置于自动进样盘上,采集温度 25 ℃,分析时间 120 s,搅动速度 1 r/s,以超纯水为清洗液,每次测量样品前清洗传感器 10 s,取 100~120 s 传感器响应平均值为输出值,每份样品平行测定 10 次,最后 3 次数据平均值作为输出值。80 个样品的味道值测定结果见表 4。

2.3.4 方法学考察 按“2.3.3”项下方法,对同一样品重复测量 6 次,进行精密度考察。结果显示,各传感器输出值的 RSD 分别为 1.16%、1.35%、1.89%、1.09%、1.94%、1.25%、1.57%,均小于 2.00%。

表 2 所有样品颜色值 ($n=3$)Table 2 Color values of samples ($n=3$)

编号	L	a	b	编号	L	a	b	编号	L	a	b	编号	L	a	b
S1001	46.21	48.51	-18.04	S2001	41.92	34.06	-15.20	S3001	41.03	31.41	-15.28	S4001	74.25	33.99	20.62
S1002	46.23	48.83	-18.24	S2002	45.75	35.36	-15.33	S3002	41.26	31.61	-15.25	S4002	73.61	35.65	18.19
S1003	46.15	48.06	-17.80	S2003	45.93	35.43	-15.29	S3003	41.06	31.37	-15.24	S4003	67.63	40.49	10.69
S1004	46.36	48.11	-18.21	S2004	45.98	35.48	-15.29	S3004	42.31	32.03	-14.78	S4004	72.59	38.38	14.03
S1005	46.19	48.42	-18.44	S2005	48.39	54.29	-21.83	S3005	42.05	31.97	-14.86	S4005	73.67	35.22	18.79
S1006	46.11	48.07	-18.29	S2006	48.36	54.03	-21.72	S3006	42.19	32.02	-14.80	S4006	66.69	39.96	12.36
S1007	47.23	54.38	-22.12	S2007	48.33	53.90	-21.61	S3007	44.42	40.07	-15.53	S4007	67.03	41.73	8.31
S1008	47.50	55.18	-22.48	S2008	48.40	62.80	-28.11	S3008	44.49	40.37	-15.59	S4008	74.03	34.64	20.03
S1009	47.51	55.27	-22.55	S2009	49.01	63.07	-27.23	S3009	44.50	40.33	-15.55	S4009	66.98	41.95	8.23
S1010	44.03	40.66	-15.04	S2010	50.24	65.17	-30.37	S3010	35.01	30.07	-14.69	S4010	68.51	38.38	14.97
S1011	44.06	40.68	-15.06	S2011	48.43	62.94	-28.20	S3011	34.89	30.00	-14.71	S4011	72.71	38.44	14.17
S1012	43.97	40.28	-14.95	S2012	49.95	64.89	-30.03	S3012	35.20	30.21	-14.67	S4012	73.62	35.58	18.42
S1013	49.06	55.60	-23.22	S2013	48.67	63.66	-28.83	S3013	39.28	33.40	-14.02	S4013	70.02	38.07	14.76
S1014	49.01	55.26	-22.94	S2014	48.06	61.83	-26.35	S3014	39.25	33.37	-14.01	S4014	48.07	56.50	-23.40
S1015	48.78	55.49	-23.15	S2015	49.27	63.61	-27.91	S3015	37.64	32.73	-14.34	S4015	47.87	56.27	-23.35
S1016	46.65	46.74	-17.94	S2016	49.82	64.94	-30.16	S3016	46.38	48.64	-18.91	S4016	47.75	55.31	-22.72
S1017	46.44	46.87	-18.11	S2017	50.80	65.73	-30.88	S3017	46.41	48.82	-18.98	S4017	54.72	66.97	-31.51
S1018	46.38	46.44	-17.87	S2018	49.76	62.51	-28.73	S3018	46.39	48.63	-18.87	S4018	54.17	64.98	-29.59
S1019	45.62	38.73	-15.07	S2019	49.18	60.02	-24.12	S3019	44.62	44.38	-14.87	S4019	53.71	60.35	-23.63
S1020	46.10	39.48	-15.07	S2020	49.25	59.32	-22.86	S3020	44.71	44.81	-14.98	S4020	67.39	40.21	13.36

表 3 不同传感器识别指数结果

Table 3 Different sensor identification index results

传感器	识别指数	传感器	识别指数	传感器	识别指数
ZZ	0.931	AB	0.381	CA	0.436
DA	0.736	GA	0.124		
JE	0.675	BB	0.357		

结果说明仪器精密度高。

取同一样品,按“2.3.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3.3”项下方法分别测量,计算各传感器输出值的 RSD 分别为 0.98%、1.25%、1.78%、1.55%、1.48%、1.61%、1.88%,均小于 2.00%,说明重复性良好。

2.4 样品主要化学成分含量测定

2.4.1 供试品溶液准备 精密称取“2.1”项下样品,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇,超声溶解定容,配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 溶液,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,待测。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 554.00、17.68、44.81、29.73、4.72

μ g/mL 的对照品溶液。

2.4.3 色谱条件 Chromplus™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~9 min, 45%甲醇;9~10 min, 45%~55%甲醇;10~21 min, 55%甲醇;21~22 min, 55%~65%甲醇;22~33 min, 65%甲醇;33~34 min, 65%~45%甲醇;检测波长 280 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μ L,理论塔板数 6 000 以上。色谱图见图 2。

2.4.4 线性关系考察 精密量取“2.4.2”项下对照品溶液。按“2.4.3”项下色谱条件进样,以质量浓度为横坐标 (X),以峰面积为纵坐标 (Y),回归处理,得 4 种黄酮类成分的标准曲线和线性范围,分别为黄芩苷 $Y=72.77 X-464.52$, $r^2=0.999 7$,线性范围 8.66~554.00 μ g/mL;汉黄芩苷 $Y=67.13 X-75.22$, $r^2=0.999 4$,线性范围 3.70~44.81 μ g/mL;黄芩素 $Y=50.20 X-10.68$, $r^2=0.999 9$,线性范围 0.93~29.73 μ g/mL;汉黄芩素 $Y=133.28 X+2.20$, $r^2=0.999 5$,线性范围 0.29~4.72 μ g/mL。

2.4.5 方法学考察 精密量取“2.4.1”项下供试品

表 4 所有样品味道值 ($n=3$)

Table 4 Taste values of samples ($n=3$)

编号	ZZ	DA	JE	编号	ZZ	DA	JE	编号	ZZ	DA	JE	编号	ZZ	DA	JE
S1001	1 680	1 078	1 366	S2001	1 460	863	1 374	S3001	1 881	1 157	1 353	S4001	1 797	991	1 406
S1002	1 633	1 044	1 409	S2002	1 435	901	1 407	S3002	1 941	1 180	1 397	S4002	1 696	924	1 443
S1003	1 626	1 088	1 438	S2003	1 437	966	1 434	S3003	1 860	984	1 408	S4003	1 732	923	1 452
S1004	1 612	1 049	1 447	S2004	1 454	893	1 429	S3004	1 689	1 030	1 416	S4004	1 641	845	1 469
S1005	1 606	1 100	1 441	S2005	1 443	938	1 414	S3005	1 604	1 126	1 373	S4005	1 691	814	1 441
S1006	1 678	1 065	1 369	S2006	1 066	867	1 378	S3006	1 861	1 034	1 418	S4006	1 743	895	1 425
S1007	1 664	1 034	1 413	S2007	1 139	915	1 413	S3007	1 888	1 153	1 359	S4007	1 791	997	1 403
S1008	1 633	1 076	1 450	S2008	1 133	968	1 439	S3008	1 947	1 183	1 392	S4008	1 705	934	1 433
S1009	1 622	1 051	1 449	S2009	1 143	899	1 423	S3009	1 864	988	1 413	S4009	1 737	945	1 448
S1010	1 612	1 104	1 446	S2010	1 046	945	1 424	S3010	1 687	1 037	1 411	S4010	1 681	885	1 474
S1011	1 623	1 090	1 441	S2011	1 134	961	1 432	S3011	1 614	1 136	1 381	S4011	1 691	894	1 448
S1012	1 625	1 051	1 449	S2012	1 156	899	1 435	S3012	1 866	989	1 418	S4012	1 722	899	1 455
S1013	1 609	1 105	1 437	S2013	1 051	933	1 415	S3013	1 684	1 037	1 421	S4013	1 657	867	1 470
S1014	1 673	1 063	1 373	S2014	1 068	862	1 372	S3014	1 614	1 121	1 371	S4014	1 681	824	1 451
S1015	1 667	1 044	1 403	S2015	1 134	911	1 417	S3015	1 866	1 037	1 419	S4015	1 713	885	1 435
S1016	1 636	1 072	1 456	S2016	1 139	962	1 433	S3016	1 889	1 159	1 356	S4016	1 771	987	1 443
S1017	1 637	1 075	1 457	S2017	1 148	895	1 426	S3017	1 917	1 177	1 341	S4017	1 765	954	1 453
S1018	1 629	1 055	1 443	S2018	1 157	898	1 425	S3018	1 868	1 045	1 376	S4018	1 747	925	1 458
S1019	1 619	1 108	1 443	S2019	1 047	931	1 416	S3019	1 611	1 128	1 379	S4019	1 689	895	1 464
S1020	1 627	1 094	1 446	S2020	1 068	861	1 375	S3020	1 865	1 034	1 367	S4020	1 742	912	1 451

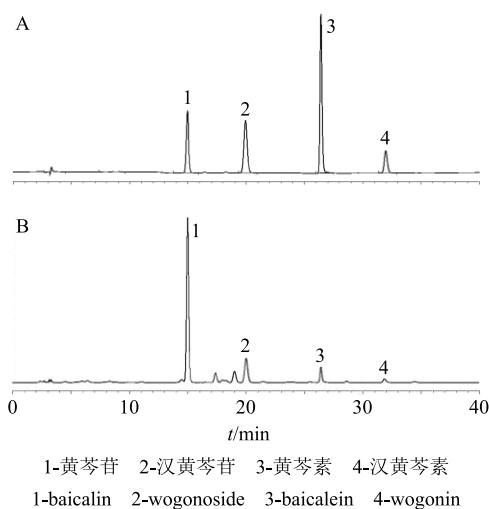


图 2 混合对照品 (A) 和代表性样品 (S1001, B) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of reference substances (A) and typical sample (S1001, B)

适量,按“2.4.3”项下色谱条件连续进样 6 次,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素各成分峰面积 RSD 分别为 0.77%、0.86%、0.88%、0.97%,RSD 均 $<2.00\%$,表示精密度良好。

精密称取“2.4.1”项下供试品溶液适量,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.4.3”项下色谱条件检测,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素各成分峰面积 RSD 分别为 1.23%、0.89%、1.66%、1.54%,RSD 均 $<2.00\%$,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

精密称取同一供试品 6 份,按“2.4.3”项下方法测定,计算供试品溶液中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的平均质量分数,其 RSD 分别为 1.69%、1.09%、1.76%、1.62%,RSD 均 $<2.00\%$,表明该方法重复性良好。

精密称取同一份提取物样品 6 份,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,分别加入样品中等量的各对照品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件测定,计算得黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素平均加样回收率依次为 101.90%、98.91%、98.83%、99.35%,RSD 分别为 1.31%、0.92%、1.73%、1.54%

2.4.5 样品测定 按照“2.4.3”项下色谱条件,对 80 个样品进行含量测定,并计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素 4 个成分在样品中的质量分数。结果见表 5。

表 5 样品主要成分质量分数

Table 5 Percentage of main components for samples

编号	质量分数/%					编号	质量分数/%				
	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	总黄酮		黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	总黄酮
S1001	21.00	4.31	1.19	0.27	26.77	S2001	54.88	10.20	2.80	0.78	68.66
S1002	21.04	4.61	1.09	0.24	26.98	S2002	52.49	11.76	3.30	0.82	68.37
S1003	22.02	4.79	1.19	0.28	28.28	S2003	52.83	9.58	2.84	1.11	66.36
S1004	21.82	4.97	1.57	0.41	28.77	S2004	56.42	9.52	2.96	1.19	70.09
S1005	21.52	4.54	1.34	0.30	27.70	S2005	52.70	9.96	2.84	1.12	66.62
S1006	23.50	4.15	1.55	0.35	29.55	S2006	53.30	9.35	2.77	1.67	67.09
S1007	23.60	5.08	1.40	0.33	30.41	S2007	48.37	9.71	2.61	1.59	62.28
S1008	24.33	5.50	1.61	0.36	31.80	S2008	42.23	9.90	2.44	1.53	56.10
S1009	24.85	5.49	1.64	0.42	32.40	S2009	46.82	8.81	2.73	1.05	59.41
S1010	22.97	4.84	1.27	0.39	29.47	S2010	44.74	9.97	2.72	1.14	58.57
S1011	18.53	4.95	1.06	0.38	24.92	S2011	45.03	11.01	2.48	1.25	59.77
S1012	23.45	4.93	1.57	0.36	30.31	S2012	50.01	9.92	2.50	1.29	63.72
S1013	21.15	4.46	1.23	0.37	27.21	S2013	57.66	10.68	2.58	1.22	72.14
S1014	20.49	4.44	1.23	0.31	26.47	S2014	49.25	10.35	2.50	1.31	63.41
S1015	26.79	5.81	1.80	0.43	34.83	S2015	49.99	10.25	2.51	1.27	64.02
S1016	25.82	5.19	1.44	0.35	32.80	S2016	56.02	10.22	2.78	0.79	69.81
S1017	20.58	4.54	1.57	0.29	26.98	S2017	54.82	10.43	2.46	0.73	68.44
S1018	23.64	4.85	1.16	0.27	29.92	S2018	48.38	10.93	2.29	0.84	62.44
S1019	21.93	4.83	1.37	0.43	28.56	S2019	55.28	10.64	2.60	0.81	69.33
S1020	25.02	5.15	1.53	0.40	32.10	S2020	47.16	10.55	2.21	0.93	60.85
编号	质量分数/%					编号	质量分数/%				
	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	总黄酮		黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	总黄酮
S3001	47.02	10.25	2.63	0.75	60.65	S4001	80.23	1.16	3.08	0.06	84.53
S3002	58.06	11.43	2.8	0.82	73.11	S4002	86.43	0.53	3.83	0.11	90.90
S3003	56.06	10.08	2.66	0.65	69.45	S4003	78.95	1.04	3.43	0.15	83.57
S3004	52.97	10.98	2.55	0.73	67.23	S4004	84.63	2.11	3.27	0.13	90.14
S3005	52.64	9.33	2.34	0.68	64.99	S4005	79.58	0.68	3.32	0.05	83.63
S3006	55.55	9.70	2.37	0.58	68.20	S4006	88.95	0.92	3.89	0.11	93.87
S3007	54.52	10.24	2.74	0.88	68.38	S4007	86.98	0.88	3.09	0.09	91.04
S3008	44.36	9.39	2.53	0.81	57.09	S4008	80.69	2.15	3.64	0.15	86.63
S3009	53.54	9.37	2.57	0.78	66.26	S4009	80.24	1.34	3.88	0.14	85.60
S3010	57.91	9.98	2.60	0.77	71.26	S4010	89.88	1.64	3.96	0.13	95.61
S3011	51.58	11.45	2.83	1.25	67.11	S4011	87.59	2.66	3.93	0.08	94.26
S3012	56.47	10.63	2.88	1.21	71.19	S4012	83.23	1.48	3.77	0.10	88.58
S3013	58.13	10.68	2.96	0.85	72.62	S4013	89.22	1.82	4.32	0.14	95.50
S3014	52.22	10.32	2.95	0.73	66.22	S4014	87.64	0.93	3.85	0.15	92.57
S3015	53.72	10.33	2.84	0.77	67.66	S4015	83.34	1.16	4.09	0.18	88.77
S3016	55.82	10.07	2.77	0.85	69.51	S4016	85.11	1.53	3.68	0.06	90.38
S3017	57.47	10.77	2.71	0.81	71.76	S4017	78.81	1.84	4.32	0.19	85.16
S3018	58.33	10.39	2.85	0.88	72.45	S4018	82.12	2.06	3.98	0.21	88.37
S3019	51.42	10.79	2.96	1.12	66.29	S4019	85.59	1.76	3.69	0.13	91.17
S3020	50.73	11.18	2.67	0.68	65.26	S4020	80.23	1.09	4.02	0.12	85.46

2.5 体外抑菌率测定

2.5.1 供试品制备 称取“2.1”项下样品适量，加入蒸馏水超声溶解，制成质量浓度为 5 mg/mL（生药量）的样品溶液，121 ℃ 高温灭菌 20 min 后取出，作为供试品溶液待测。

2.5.2 菌液配制 用接种环挑选所选菌种斜面培养物一环置装有 10 mL 液体培养基的试管中，置摇床中震荡培养 24 h（37 ℃、170 r/min）后取出。采用营养肉汤培养基将菌悬液稀释至相当于 1 号麦氏比浊溶液，再将该菌稀释 3 000 倍，使其浓度为 10⁵~10⁶ cfu/mL，即实验用菌浓度，调配好的菌液 15 min 内接种。

2.5.3 样品质量浓度筛选 取“2.5.1”项下供试品（S1001、S2001、S3001、S4001），分别稀释成 50、40、30、20、10、5、2.5 mg/mL（生药量）不同质量浓度，分别向 96 孔板中加入 200 μL 上述溶液，并向实验组每孔加入 5 μL 液，另设不加菌液的空白药液组和仅含空白培养基的空白对照组^[11]。将 96 孔板置于培养箱中 37 ℃ 培养 24 h，观察空白药液组及空白对照组是否有细菌生长，若无菌，则观察实验组是否发生浑浊，实验重复 3 次，结果见表 6。

表 6 样品质量浓度的确定 (n = 3)

Table 6 Determination of sample concentration (n = 3)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	大肠埃希菌生长情况			
	S1001	S2001	S3001	S4001
50	—	—	—	—
40	—	—	—	—
30	—	—	—	—
20	—	—	+	+
10	+	+	+	+
5	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+

“—”表示无菌生长，“+”表示有菌生长

“—” show no bacterial growth, “+” show bacterial growth

根据不同质量浓度条件下细菌的生长情况判断不同样品对大肠杆菌有意义的浓度范围^[12]，当样品质量浓度为 20 mg/mL 时，不同样品的抑菌效果出现了差异，因此选择样品质量浓度为 10 mg/mL（生药量质量浓度）。

2.5.4 抑菌率计算 用酶标仪测定实验组与菌液对照组溶液在 600 nm 下的吸光度 (A) 值，采用公式 抑菌率 = 1 - (样品培养后 A 值 - 样品培养前 A 值) / (菌液培养后 A 值 - 菌液培养前 A 值) 计算抑菌

率^[13]。

2.5.5 样品体外抑菌率测定结果 分别测定 80 个样品对大肠杆菌的体外抑菌率，结果见表 7。

表 7 所有样品体外抑菌率 (n = 3)

Table 7 In vitro antibacterial rate results of samples (n = 3)

编号	抑菌率/ %	编号	抑菌率/ %	编号	抑菌率/ %	编号	抑菌率/ %
S1001	89	S2001	88	S3001	76	S4001	66
S1002	90	S2002	83	S3002	78	S4002	71
S1003	85	S2003	96	S3003	65	S4003	56
S1004	83	S2004	94	S3004	64	S4004	54
S1005	86	S2005	97	S3005	63	S4005	62
S1006	92	S2006	87	S3006	81	S4006	61
S1007	76	S2007	89	S3007	60	S4007	58
S1008	81	S2008	82	S3008	72	S4008	63
S1009	89	S2009	87	S3009	71	S4009	68
S1010	82	S2010	85	S3010	69	S4010	64
S1011	87	S2011	88	S3011	55	S4011	56
S1012	79	S2012	95	S3012	58	S4012	59
S1013	88	S2013	94	S3013	68	S4013	63
S1014	77	S2014	90	S3014	77	S4014	67
S1015	78	S2015	90	S3015	75	S4015	55
S1016	88	S2016	87	S3016	69	S4016	63
S1017	79	S2017	89	S3017	58	S4017	52
S1018	91	S2018	99	S3018	62	S4018	54
S1019	88	S2019	87	S3019	69	S4019	59
S1020	82	S2020	91	S3020	75	S4020	61

2.6 ANN 建模

本研究采用基于 MATLAB 神经网络工具箱中的 BP 改进算法（动量-自适应学习率调整算法）进行建模。对于非线性问题，输入层和隐含层多采用非线性传输函数，输出层采用线性函数，以保持输出的范围，本实验输入层与隐含层之间采用 S 型传递函数（tan-sigmoid），输出层采用线性传递函数（purelin）。

2.6.1 数据预处理 为消除不同数据数量级之间的差别，需要对数据进行归一化处理后进行建模。采用软件“MATLAB R2014a”对颜色、味道、成分和抑菌率数据进行归一化处理。

2.6.2 隐含层节点数确定 在隐含层的节点数足够的情况下，含 1 个隐含层的 BP 神经网络可以逼近 1 个非线性连续函数，因此本实验选择含 1 个隐含层的 ANN。隐含层节点的数量对网络的性能影响

很大, 隐含层的节点数太多, 容易造成网络过度拟合, 预测能力下降, 隐含层节点数太少, 网络拟合效果不好, 因此需要根据建模对象对隐含层节点数进行筛选。隐含层节点数的经典计算公式为 $L = (m+n)^{1/2} + a$, 其中 L 为隐含层节点数, n 为输入层节点数, m 为输出层节点数, a 为 0~10 之间的自然数。本实验以训练集的真实值与预测值的均方根误差 (RMSE) 为指标, 通过训练不同隐含节点的神经网络, 寻找最小训练误差和预测误差, 进而确定隐含层节点的个数。

2.6.3 ANN 建模 将 80 个样品的颜色、味道、成分数据进行归一化, 然后以其中某单一指标、两两指标相结合或 3 个指标相结合的方式作为网络输入层, 对大肠杆菌的体外抑菌率作为网络输出层, 采用建立 ANN 模型 (MATLAB R2014a), 以模型训练集和预测集的相关系数 (r^2) 和 RMSE 为指标比较不同模型的效果。

2.6.4 颜色-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以各样品的颜色值归一化数据 (x) 作为输入参数, 以抑菌率归一化数据 (y) 作为输出参数, 根据“2.6.2”项下方法筛选网络隐含层的节点数, 以训练集和预测集 RMSE 最小值作为指标确定隐含层的节点数, 建立了含一个隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 3-4-1 型, 其中 3 为输入层节点数, 4 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。学习率 (LR) 为 0.02, 网络中止条件是目标误差 (GOAL) 为 0.001, 最大循环次数 (EPOCHS) 为 2 000 次。分别以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 3。

2.6.5 味道-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以各样品的味道值 (x) 作为输入参数, 建立了含 1 个隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 3-5-1 型, 其中 3 为输入层节点数, 5 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 2 000 次。分别以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 4。

2.6.6 成分-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以成分的含量 (x) 作为输入参数, 以抑菌率作为输出参数, 建立了含 1 个

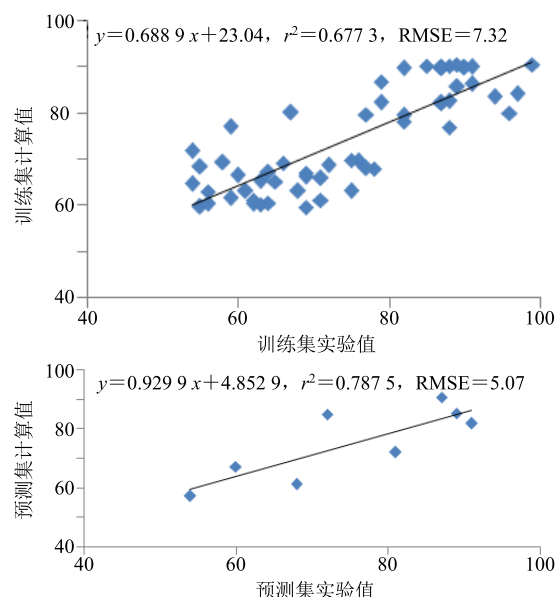


图 3 颜色-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 3 Training and forecast results of ANN model with color and antibacterial rate

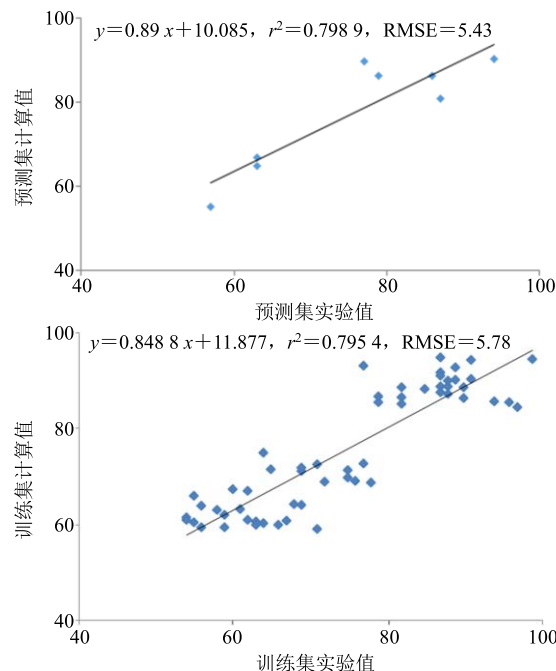


图 4 味道-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 4 Training and forecast results of ANN model with taste and antibacterial rate

隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 4-6-1 型, 其中 4 为输入层节点数, 6 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 1 000 次。以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 5。

2.6.7 颜色/味道-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本

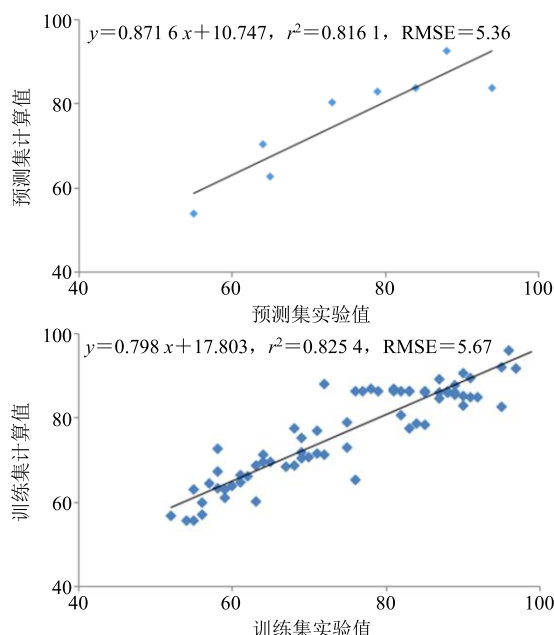


图 5 成分-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 5 Training and forecast results of ANN model with component and antibacterial rate

随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以样品的颜色值和味道值 6 个参数 (x) 作为输入参数, 以抑菌率 (y) 作为输出参数, 建立了含 1 个隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 6-8-1 型, 其中 6 为输入层节点数, 8 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 2 000 次。以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 6。

2.6.8 颜色-成分-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以样品的颜色值和成分值 7 个参数 (x) 作为输入参数, 以抑菌率 (y) 作为输出参数, 建立了含 1 个隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 7-9-1 型, 其中 7 为输入层节点数, 9 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 2 000 次。以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 7。

2.6.9 味道/成分-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以样品的味道值和成分值 7 个参数 (x) 作为输入参数, 以抑菌率 (y) 作为输出参数, 建立了含 1 个隐含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 7-9-1 型, 其中 7 为输入层节点

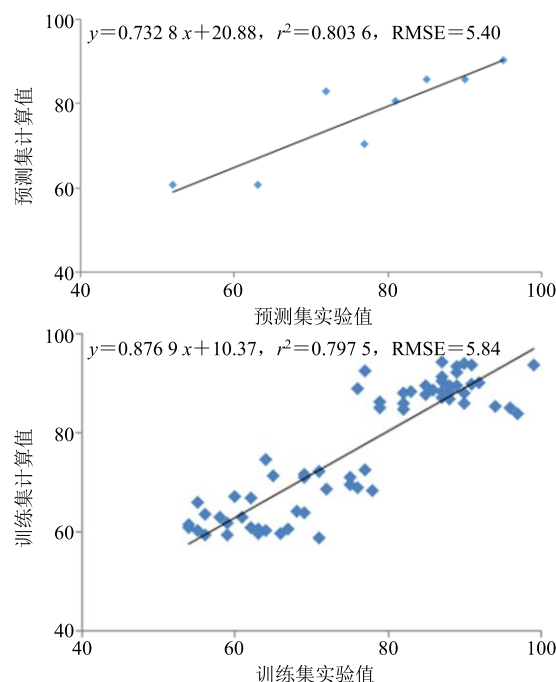


图 6 颜色/味道-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 6 Training and forecast results of ANN model with color & taste and antibacterial rate

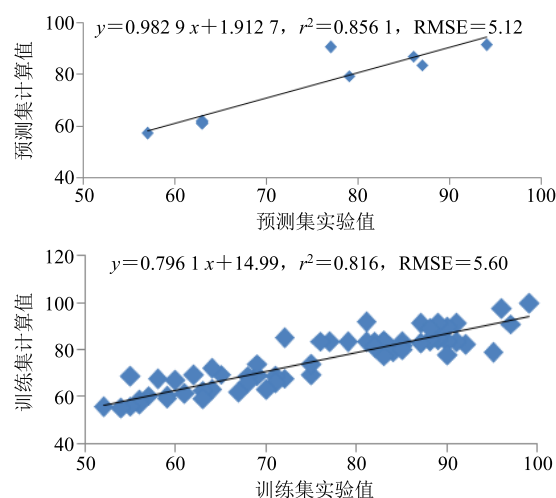


图 7 颜色/成分-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 7 Training and forecast results of ANN model with color & component and antibacterial rate

数, 9 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 2 000 次。以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 8。

2.6.10 颜色/味道/成分-抑菌率 ANN 模型 从 80 个样本随机抽取 8 个样本作为预测集, 8 个样本作为验证集, 剩余 64 个样本作为训练集, 以样品的味道值、颜色值和成分值 10 个参数 (x) 作为输入参数, 以抑菌率 (y) 作为输出参数, 建立了含 1 个隐

含层的 BP 网络, 整个网络结构采用 10-12-1 型, 其中 10 为输入层节点数, 12 为隐含层节点数, 1 为输出层节点数。LR 为 0.02, 网络中止条件是 GOAL 为 0.001, EPOCHS 为 2 000 次。以训练集和预测集的实验值与计算值做图, 计算 r^2 和 RMSE, 结果见图 9。

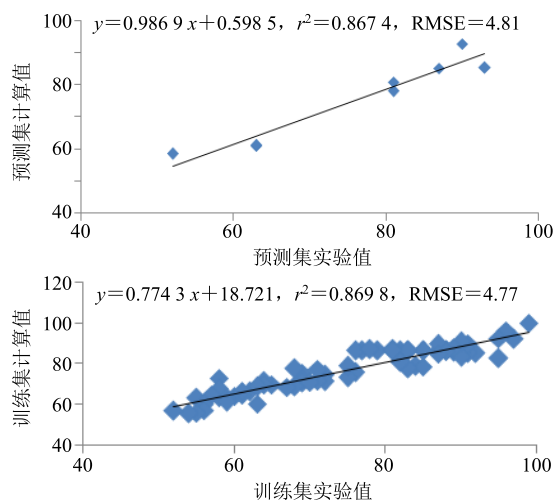


图 8 味道/成分-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 8 Training and forecast results of ANN model with taste & component and antibacterial rate

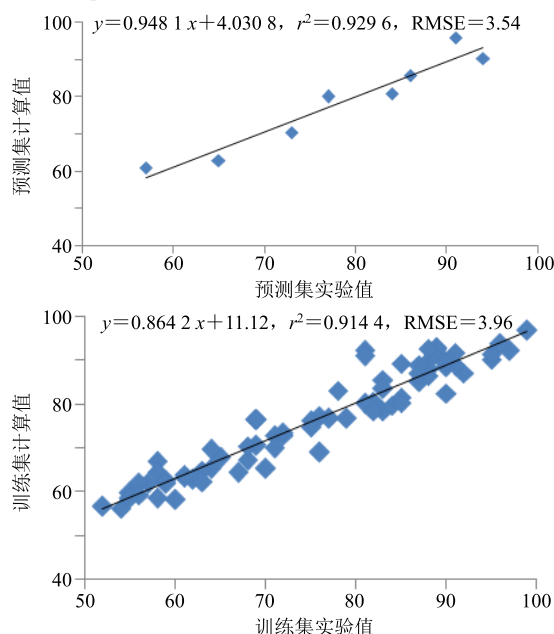


图 9 颜色/味道/成分-抑菌率 ANN 模型训练与预测结果

Fig. 9 Training and forecast results of ANN model with color & taste & component and antibacterial rate

2.6.11 ANN 模型结果比较分析 将以上不同 ANN 模型的训练集与预测集的 r^2 和 RMSE 做图, 结果发现单独采用颜色、味道与成分中的某一个指标与体外抑菌率建立 ANN 模型, 训练集和预测集

的 r^2 均较低, RMSE 较高, 说明网络的效果不佳。当采用颜色、味道与成分中的任意 2 种指标相结合与体外抑菌率建立 ANN 模型, 模型的 r^2 值有所升高, RMSE 有所下降, 说明 ANN 模型的训练和预测能力有所提高。但采用颜色、味道与成分 3 种指标相结合与体外抑菌率建立 ANN 模型时, 模型的 r^2 值最高 ($r^2=0.92$), RMSE 则明显下降, 说明所建立的 ANN 模型的训练和预测能力最好。该结果充分说明多种指标相结合能大大提高模型的预测能力, 提示颜色、味道与成分 3 种指标之间存在信息互补, 3 种指标相结合能快速准确地预测体外抑菌率, 见图 10。

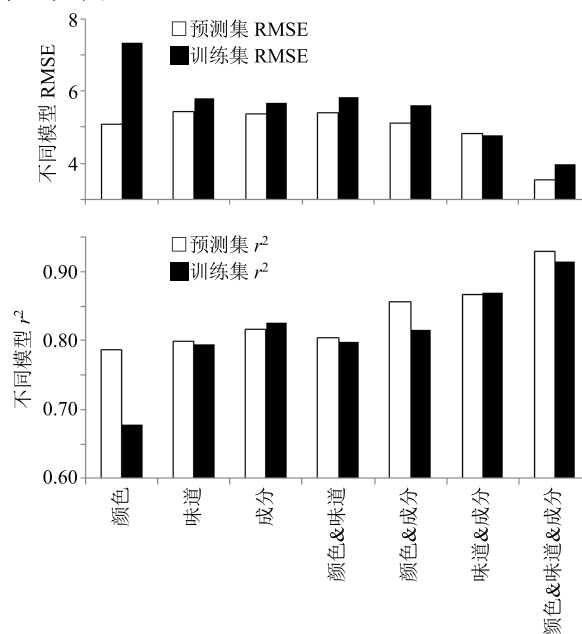


图 10 不同 ANN 模型 r^2 和 RMSE 比较

Fig. 10 Comparison of r^2 and RMSE for different ANN models

3 讨论

本研究中 4 组产物分别是黄芩水提取物, 第 1 次纯化后的产物, 第 2 次纯化后的产物和第 3 次纯化后的产物, 体现出黄芩提取物一步步精制纯化的过程。4 组样品的含量测定结果显示, 随着黄芩提取物被不断精制纯化, 黄芩苷的质量分数逐渐提高, 但其他黄酮成分的质量分数逐渐降低; 抑菌率测定结果显示前 2 组提取物的抑菌率明显高于后 2 组。综合分析以上实验结果, 发现黄芩提取物的抑菌效果并没有随着黄芩苷质量分数的提高而提高, 说明黄芩提取物的抑菌作用是多种成分综合协同起效, 并不是其中某种成分的含量越高效果越好。因此黄芩提取物质量评价不能单纯以某一成分含量作为评

价标准,需要将提取物的整体性状指标引入到提取物的质量评价中。

本研究分别建立了7个ANN模型并进行比较,分别是颜色-抑菌率ANN模型、味道-抑菌率ANN模型、成分-抑菌率ANN模型、颜色&味道-抑菌率ANN模型、颜色&成分-抑菌率ANN模型、味道&成分-抑菌率ANN模型和颜色&味道&成分-抑菌率ANN模型。采用训练集和预测集的 r^2 和RMSE比较7种模型的效果,结果发现采用某单一指标与药效建模,模型的训练和预测结果都较差,采用2种指标结合与药效建模,模型的训练和预测结果有所提高,采用颜色、味道和成分3种指标相结合与药效建立的模型效果最好(预测集 $r^2=0.929\ 6$,RMSE=3.54),说明颜色、味道与成分3种指标之间存在信息互补,3种指标相结合能快速准确地预测体外抑菌率。

本研究将黄芩提取物的性状指标——颜色和味道引入到现有的黄芩提取物质量评价中,结果发现性状指标与成分指标相结合用于黄芩提取物质量评价优于单一的性状指标或单一的成分指标,性状与成分相结合能全面科学地评价黄芩提取物质量。

参考文献

- [1] 马玲玲,孙燕.中药黄芩药理作用的研究进展[J].沈阳医学院学报,2016,18(2):115-117.
- [2] 狄艳琴,关晓清.中药黄芩药理的临床作用分析[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(A3):238-240.
- [3] 王雅芳,李婷,唐正海,等.中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J].中华中医药学刊,2015,33(1):206-211.
- [4] 郭京华.浅析黄芩有效化学成分及抑菌作用[J].中国实用医药,2012,7(16):195-196.
- [5] 王小淞,陈波,姚守拙.HPLC-DPPH在线法筛选黄芩提取物中抗氧化活性成分[J].中草药,2009,40(增刊):224-227.
- [6] 封银曼,张威,白杨.黄芩提取物有效成分的近红外光谱定量分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):84-87.
- [7] 徐珊,孟庆刚.黄芩提取物解热作用及机制研究进展[J].中华中医药学刊,2008,26(6):1179-1181.
- [8] 于蓓蓓,吕凌,于宗渊,等.基于抑菌药效的黄芩提取物精制工艺优选[J].中草药,2014,45(3):362-366.
- [9] 薛倩倩,李爱平,李科,等.黄芪的质量评价研究概述及质量标志物研究策略初探[J].药物评价研究,2019,42(12):2459-2463.
- [10] 刘晓娜,车晓青,李德芳,等.基于多源信息融合的中药质量标志物与质量评价研究模式[J].中草药,2019,50(19):4576-4581.
- [11] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [12] 黄永亮,吴纯洁,何晓燕.中药提取工艺评价指标的研究进展[J].中药与临床,2012,3(5):49-52.
- [13] 梁晓光,吴飞,王俊杰,等.基于现代电子舌技术的传统苦味中药黄连的苦味物质基础研究[J].中国中药杂志,2014,39(17):3326-3329.
- [14] 钟恋,汪云伟,杨诗龙.地黄酒炖过程化学成分及“味”的关系[J].中成药,2015,37(5):1041-1044.
- [15] 吴娜,杨诗龙,严丹,等.粉末中药鉴别方法的研究进展与思考实践[J].中草药,2015,46(10):1413-1419.
- [16] 黎量,杨诗龙,胥敏,等.基于颜色及成分动态变化的山楂炮制机理初探[J].中成药,2015,37(7):1530-1533.
- [17] 江华娟,何瑶,陈意,等.BP神经网络结合熵权法多指标优化四物汤水提工艺[J].中草药,2019,50(18):4313-4319.