

球面对称设计结合遗传神经网络优选黄芪-红花药对水提工艺

陈光玮, 金伟锋, 许守超, 张 玲, 王 玉, 何 昱*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 采用球面对称设计及遗传神经网络优选黄芪-红花药对的水提工艺。**方法** 将黄芪-红花药对水提液中 8 种有效成分(羟基红花黄色素 A、紫丁香苷、毛蕊异黄酮苷、脱水红花黄色素 B、山柰酚-3-O-芸香糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷)的含量进行赋权,以计算得到的综合得分作为水提工艺的评价指标。在单因素实验基础上,选择液料比、提取时间、提取温度 3 个因素,依据球面对称设计进行实验,并结合遗传神经网络模型进一步优选黄芪-红花药对水提工艺参数。**结果** 球面对称设计得到的最佳提取条件为液料比 20:1、提取时间 30 min、提取温度 87 °C、提取次数 2 次,其综合评分为 4.877;以遗传神经网络得到的最佳提取条件为液料比 22.7:1、提取时间 30 min、提取温度 87 °C、提取次数 2 次,经验证该条件下的综合得分为 5.004。实验结果显示,遗传神经网络能够提高水提工艺条件的综合评分。**结论** 球面对称设计和遗传神经网络能够优化黄芪-红花药对水提工艺参数,可为中药及其制剂中多种有效成分提取的工艺优选提供参考。

关键词: 黄芪-红花药对;球面对称设计;遗传神经网络;工艺优化;羟基红花黄色素 A;紫丁香苷;毛蕊异黄酮苷;脱水红花黄色素 B;山柰酚-3-O-芸香糖苷;芒柄花苷;毛蕊异黄酮;黄芪甲苷

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2257-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.008

Decocting process optimization of *Astragali Radix-Carthami Flos* drug pair based on spherical symmetry design and genetic neural network

CHEN Guang-wei, JIN Wei-feng, XU Shou-chao, ZHANG Ling, WANG Yu, HE Yu

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To determine the appropriate aqueous extract craft for *Astragali Radix-Carthami Flos* via spherical symmetry design and genetic neural network. **Methods** In this study, the contents of eight active components, including hydroxysafflor yellow A, syringin, calycosin-7-glycoside, anhydrosafflor yellow B, kaempferol-3-O-rutinoside, ononin, calycosin, and astragaloside IV, in the aqueous extract of *Astragali Radix-Carthami Flos* were weighted, and the calculated comprehensive score was applied as the evaluation index. According to the single factor experiment, the ratio of material to liquid, extraction duration and extraction temperature were taken as three factors of spherical symmetric design for the experiment. The genetic neural network model was established to further optimize the aqueous extraction process parameters of *Astragali Radix-Carthami Flos*. **Results** The optimal extraction conditions obtained by spherical symmetry design were liquid to solid ratio of 20:1, extracting at 87 °C, decocting twice and 30 min every time, and the comprehensive score was 4.877; The optimum extraction conditions obtained by the genetic neural network were liquid to solid ratio of 22.7:1, extracting at 87 °C, decocting twice and 30 min every time, and the comprehensive score was 5.004. The experimental results showed that the genetic neural network can improve the comprehensive score of water extraction process conditions. **Conclusion** Spherical symmetric design combined with genetic neural network mathematical model has ability to optimize the water extraction process parameters of *Astragali Radix-Carthami Flos*, which provides a reference for optimizing the extraction process of various effective components from traditional Chinese medicine and its preparations.

Key words: *Astragali Radix-Carthami Flos* drug pair; spherical symmetry design; genetic neural network; process optimization; hydroxysafflor yellow A; syringin; calycosin-7-glycoside; anhydrosafflor yellow B; kaempferol-3-O-rutinoside; ononin; calycosin; astragaloside IV

收稿日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(81873226); 国家科技重大专项重大新药创制(2019ZX09301101); 浙江省自然科学基金项目(LZ18H270001); 浙江省“万人计划”科技创新领军人才项目(2019)

作者简介: 陈光玮, 硕士研究生, 主要从事中药有效成分提取分离方向研究。E-mail: 657275426@qq.com

*通信作者: 何 昱, 教授, 博士生导师。Tel: (0571)61768145 E-mail: heyu0923@sina.com

黄芪为补气健脾之要药,具有补气升阳、生津养血、托毒生肌的功效。陶弘景的《本草经集注》认为其兼具活血功效,可“逐五脏间恶血”,而红花活血通经,两者相使配伍可增强补气活血的作用。黄芪-红花药对常出现于补阳还五汤、溶栓通脉汤等经典方剂中,用于心脑血管疾病如中风(卒中)、厥心痛等的治疗^[1]。临床应用中黄芪-红花药对的剂量比例在 1:1~40:1,其中以 3:1 的剂量比例最为常见^[1]。

在不同领域的工艺研究中,研究者为了节约时间和成本、提高提取效率,往往会通过试验设计或数学模型进行参数的优化。球面对称设计(spherical symmetry design, SSD)是一种在多维空间中的球面确定试验点的试验设计,正逐渐被国内不同领域所接受^[2-4]。球面对称的空间维数为所考察的因素个数(n),空间维数平方根为球面半径^[6],试验次数为 $2^n + 2n + 1$ 。其试验次数比析因设计少,试验精密度比均匀设计高^[5],通过球面对称设计得到的多元回归方程式能够预测范围内所有实验点的理论值,而传统的正交设计仅对已有因素水平进行考察。近年来,研究者已开始将集成学习方法应用于中医药研究中,如支持向量机^[6]、人工神经网络^[7-8]、随机森林^[9-12]、决策树^[10]等。由于遗传神经网络拥有优良的容错性和逼近能力^[13],近年来许多学者将其应用于中药提取工艺参数优选领域中,使该领域的研究更加方便快捷、科学有效。由于以往在中药提取分离领域尚无将球面对称设计与遗传神经网络结合运用的报道,本实验拟以黄芪-红花药对的水提工艺为例,为中药多成分提取条件优化提供新的模式。

据文献报道,羟基红花黄色素 A^[14]、紫丁香苷^[15]、毛蕊异黄酮苷^[16]、脱水红花黄色素 B^[17]、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷^[18-19]、芒柄花苷^[20]、毛蕊异黄酮^[21]、黄芪甲苷^[22]对于心脑血管疾病均有不同的治疗效果。本课题组在前期研究过程中发现黄芪-红花药对水提液中的这 8 种主要成分均能够被检出且峰形良好;不同的提取条件对黄芪-红花药对水提液中这些有效成分的提取效果存在较大影响。为最大程度地提取黄芪-红花药对中多种的有效成分,发挥其最佳药效,本实验将这 8 种成分的含量作为评价提取工艺优劣的指标,首先利用熵权法对 8 种成分含量进行赋权,得到的综合得分作为评价指标,通过单因素试验筛选影响较大的提取因素,并确定相应水平;然后以 CRITIC(criteria importance through

inter-criteria correlation)赋权法进行赋权,利用球面对称设计结合遗传神经网络对水提工艺条件进行优选,以有效提取黄芪-红花药对的化学组分,为后续药理研究的开展奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 infinity 型高效液相色谱仪,配备 G1315D 型 DAD 检测器,美国安捷伦科技有限公司; RE-2000A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂; TG16-WS 台式离心机,湖南湘仪实验室仪器有限公司; FA1104N 十万分之一电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;超纯水仪,美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

黄芪(批号 190702)、红花(批号 200313),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黄绳武教授鉴定,黄芪为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。饮片经粉碎后得黄芪、红花粉末。对照品毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷,批号分别为 SZ20180608MRYHTG、SZ20180324MBHG、SZ20180425MRYHT、SZ20180506HQJG,南京世洲生物科技有限公司;对照品羟基红花黄色素 A、紫丁香苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷,批号分别为 19100931、19111241、19110643,上海同田生物技术股份有限公司;对照品脱水红花黄色素 B,实验室自制;以上对照品质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈,色谱级,美国天地公司;三氟乙酸,上海麦克林生化科技有限公司,批号 C11196166。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

黄芪-红花药对水提液的成分含量通过 HPLC-DAD 法进行测定,色谱条件为 Alltech Alltima C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及 Alltech Alltima C₁₈ 保护柱(12.5 mm×4.6 mm);流动相为 0.01% 三氟乙酸-乙腈,梯度洗脱:0~7 min, 12%乙腈;7~8 min, 12%~18%乙腈;8~22 min, 18%~20%乙腈;22~27 min, 20%~21%乙腈;27~29 min, 21%~26%乙腈;29~35 min, 26%~32%乙腈;35~58 min, 32%乙腈;柱温 30 ℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长:210 nm(毛蕊异黄酮苷、黄芪

甲苷)、260 nm (紫丁香苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮)、403 nm (羟基红花黄色素 A、脱水红花黄色素 B); 进样量 20 μ L。

按出峰时间先后顺序各成分的含量分别表示为羟基红花黄色素 A ($t_R=6.90$ min)、紫丁香苷 ($t_R=9.47$ min)、毛蕊异黄酮苷 ($t_R=19.66$ min)、脱水红花黄色素 B ($t_R=22.16$ min)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 ($t_R=26.90$ min)、芒柄花苷 ($t_R=35.29$ min)、毛蕊异黄酮 ($t_R=40.48$ min)、黄芪甲苷 ($t_R=57.52$ min), 经前期方法学考察, 8 种待测成分的质量浓度与峰面积均呈现良好的线性关系 ($r \geq 0.9997$), 精密度、稳定性和重复性均良好, RSD 值均小于 3%, 平均加样回收率在 96.26%~101.31%, RSD 为 0.74%~2.79%。

2.2 单因素考察

2.2.1 指标权重及综合得分的计算 在单因素考察过程中发现, 黄芪-红花药对水提液中 8 种有效成分的含量随着因素水平变化趋势并不一致, 给后续试验选取合适的因素水平造成一定困难。因此本实验通过熵权法确定黄芪-红花药对水提液中的 8 种成分在 5 个提取影响因素下含量的权重系数 (w_j), 计算最终的综合评分 (S_i), 以此直观衡量黄芪-红花药对水提液中不同成分受各因素变化的影响^[8]。具体计算过程如下。

(1) 指标的标准化处理: 由于黄芪-红花药对水提液中的 8 种成分均对治疗心脑血管疾病有一定疗效, 但各成分含量差异较大, 不宜直接计算指标权重, 故均进行标准化处理。其中 x_{ij} 为第 i 个样品中第 j 个指标成分的含量 ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, 8$); 而 x_{ij}' 为正向化处理后数据, 为方便表达, 仍将其记为 x_{ij} 。

$$x_{ij}' = \{x_{ij} - \min\{x_{1j}, \dots, x_{nj}\}\} / \{\max\{x_{1j}, \dots, x_{nj}\} - \min\{x_{1j}, \dots, x_{nj}\}\}$$

(2) 计算各样品下的第 j 个指标在该指标下的比重 (p_{ij})。

$$p_{ij} = x_{ij} / \sum_{i=1}^n x_{ij}$$

(3) 计算各项指标的熵值 (e_j)。

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

(4) 计算第 j 项指标的信息熵冗余度 (d_j)。

$$d_j = 1 - e_j$$

(5) 计算第 j 项指标的权重 (w_j)。

$$w_j = d_j / \sum_{j=1}^8 d_j$$

(6) 计算各单因素实验中的 S_i 。

$$S_j = \sum_{j=1}^m w_j x_{ij}$$

2.2.2 提取次数考察 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 按 30:1 的液料比加水, 提取前不浸泡, 分别提取 1、2、3、4、5 次, 每次提取 30 min, 提取温度为 100 $^{\circ}$ C, 提取液抽滤后合并, 减压浓缩近干后以 10% 甲醇复溶, 定容至 25 mL 量瓶中, 以 10% 甲醇定容, 摇匀, 得供试品溶液 A。精密吸取 2 mL 供试品溶液 A 至 50 mL 量瓶中, 以 10% 甲醇定容, 摇匀, 得供试品溶液 B, 按“2.1”项下色谱条件测定样品中各成分含量, 其中供试品溶液 A 用于测定毛蕊异黄酮和黄芪甲苷, 供试品溶液 B 用于测定其余 6 种成分。每组单因素试验重复 3 次, 由“2.2.1”项下公式计算各样品 S_i , 结果见表 1。当提取次数为 3 次时, S_i 值最大, 但由于提取 2 次和 3 次的 S_i 值相近, 为节省提取时间, 故在球面对称设计中提取次数选择综合评分相对较低的 2 次。

2.2.3 浸泡时间考察 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 按 30:1 的液料比加水, 提取前分别浸泡 0、10、20、30、40、50 min, 提取 2 次, 每次提取 30 min, 提取温度为 100 $^{\circ}$ C, 每组单因素试验重复 3 次。测定各成分含量并计算各样品 S_i , 结果见表 2。由结果可知浸泡时间对 S_i 值影响较小, 综合考虑时间成本, 将该因素剔除。

2.2.4 提取温度考察 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 按 30:1 的液料比加水, 提取前不浸泡, 提取 2 次, 每次提取 30 min, 提取温度分别为 50、60、70、80、90、100 $^{\circ}$ C, 每组单因素试验重复 3 次, 试验过程中以温度计严格控温。测定各成分含量并计算各样品 S_i , 结果见表 3。当提取温度为 70 $^{\circ}$ C 时, S_i 值最大, 故选择提取温度 70 $^{\circ}$ C 作为球面对称设计的因素水平中心点。

2.2.5 提取时间考察 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 按 30:1 的液料比加水, 提取前不浸泡, 提取 2 次, 每次分别提取 10、20、30、40、50、60 min, 提取温度为 70 $^{\circ}$ C, 每组单因素试验重复 3 次, 试验过程中以温度计严格控温。测定各成分含量并计算各样品 S_i , 结果见表 4。当提取时间为 30 min 时 S_i 值最大, 故选择提取时间 30 min 作为球面对称设计的因素水平中心点。

表 1 提取次数对各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Effect of extraction times on component content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取次数	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷
1	29.469 1±0.439 9	0.518 4±0.004 2	0.217 3±0.004 6	2.511 7±0.022 3	0.549 8±0.012 8
2	36.112 7±0.152 0	0.718 7±0.017 9	0.439 5±0.010 4	3.212 2±0.031 1	0.818 5±0.012 0
3	38.722 1±0.280 1	0.753 0±0.012 2	0.619 1±0.007 9	3.030 2±0.035 3	1.072 3±0.016 5
4	33.858 2±0.385 2	0.675 7±0.010 3	0.776 2±0.019 9	2.457 7±0.067 6	0.848 6±0.011 4
5	37.516 4±0.234 9	0.686 2±0.002 9	0.713 8±0.010 6	2.175 6±0.013 0	0.631 9±0.012 8
w_j	0.108	0.099	0.114	0.152	0.158

提取次数	质量分数/(mg·g ⁻¹)			S_i
	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
1	0.081 8±0.000 9	0.034 5±0.000 5	0.190 3±0.001 1	3.764±0.049
2	0.168 2±0.002 9	0.052 3±0.001 2	0.442 5±0.003 8	4.718±0.012
3	0.237 5±0.001 9	0.079 1±0.000 8	0.473 7±0.005 5	5.051±0.034
4	0.253 0±0.004 5	0.115 4±0.000 4	0.684 2±0.012 6	4.446±0.055
5	0.259 9±0.004 7	0.082 3±0.001 2	0.798 6±0.011 8	4.768±0.025
w_j	0.107	0.142	0.121	

表 2 浸泡时间对各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effect of immersion time on component content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浸泡时间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷
0	36.112 7±0.246 3	0.718 7±0.005 0	0.439 5±0.005 9	3.212 2±0.049 3	0.818 5±0.004 5
10	39.609 8±0.264 3	0.738 7±0.011 4	0.412 1±0.002 3	3.497 0±0.050 0	0.842 5±0.017 9
20	37.567 9±0.032 3	0.666 2±0.014 2	0.457 2±0.004 9	3.399 9±0.049 2	0.843 1±0.018 0
30	39.123 1±0.078 7	0.715 8±0.015 7	0.447 7±0.005 5	3.865 4±0.073 9	0.952 0±0.019 0
40	36.618 5±0.123 1	0.678 6±0.018 6	0.464 1±0.004 6	3.189 8±0.043 3	0.999 0±0.003 3
50	40.383 2±0.329 3	0.739 6±0.022 0	0.452 3±0.005 7	3.227 8±0.019 8	0.845 8±0.005 8
w_j	0.120	0.100	0.070	0.217	0.182

浸泡时间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)			S_i
	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
0	0.168 2±0.002 8	0.052 3±0.000 9	0.442 5±0.010 9	5.345±0.029
10	0.142 0±0.000 7	0.052 7±0.001 3	0.301 4±0.004 3	5.816±0.042
20	0.183 2±0.002 9	0.065 7±0.001 3	0.627 4±0.014 6	5.582±0.010
30	0.157 1±0.003 4	0.074 3±0.001 4	0.869 1±0.014 1	5.916±0.022
40	0.177 3±0.003 7	0.067 2±0.001 5	0.531 6±0.015 7	5.443±0.012
50	0.183 0±0.002 2	0.068 1±0.000 4	0.602 7±0.006 7	5.888±0.032
w_j	0.081	0.134	0.096	

2.2.6 液料比考察 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 分别按 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 的液料比加入水, 提取前不浸泡, 提取 2 次, 每次提取 30 min, 提取温度为 100 ℃, 每组单因素

试验重复 3 次。测定各成分含量并计算各样品 S_i , 结果见表 5。可见当液料比为 25:1 时 S_i 值最大, 但由于黄芪-红花药对水提液中部分成分在浓缩过程中可能易受热分解, 溶剂体积越大, 浓缩时间越

表 3 提取温度对各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of extraction temperature on component content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取温度/°C	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3-O-芸香糖苷
50	33.825 9±0.228 0	0.565 6±0.008 9	0.064 0±0.001 6	3.272 7±0.054 8	0.549 8±0.009 3
60	36.054 6±0.138 0	0.704 8±0.011 5	0.061 6±0.000 3	4.894 8±0.092 1	1.157 1±0.012 6
70	37.287 2±0.366 1	0.664 3±0.013 3	0.131 8±0.002 0	5.239 5±0.084 0	1.435 6±0.019 5
80	35.025 5±0.315 2	0.682 4±0.019 4	0.168 9±0.002 1	3.835 2±0.022 2	1.051 5±0.019 4
90	36.778 9±0.115 9	0.672 4±0.003 8	0.289 4±0.004 3	3.387 4±0.012 4	0.720 5±0.011 4
100	36.112 7±0.204 1	0.718 7±0.016 3	0.439 5±0.010 1	3.212 2±0.041 5	0.818 5±0.010 1
w_j	0.076	0.063	0.185	0.196	0.104

提取温度/°C	质量分数/(mg·g ⁻¹)			S_i
	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
50	0.029 3±0.000 4	0.058 8±0.000 8	0.116 5±0.001 9	3.339±0.028
60	0.020 7±0.000 4	0.068 7±0.001 6	0.326 5±0.005 7	3.914±0.007
70	0.044 7±0.000 5	0.059 1±0.001 1	0.394 4±0.007 8	4.123±0.023
80	0.060 8±0.000 7	0.051 6±0.001 2	0.302 5±0.008 4	3.638±0.024
90	0.104 6±0.001 2	0.061 7±0.000 9	0.613 1±0.007 4	3.704±0.010
100	0.168 2±0.002 7	0.052 3±0.000 7	0.442 5±0.012 7	3.656±0.017
w_j	0.166	0.132	0.079	

表 4 提取时间对各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effect of extraction duration on component content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取时间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3-O-芸香糖苷
10	32.775 9±0.058 6	0.636 6±0.012 1	0.079 9±0.001 9	3.850 7±0.046 6	1.065 2±0.018 7
20	35.542 8±0.263 0	0.692 9±0.009 5	0.078 1±0.002 3	4.743 0±0.077 6	1.181 2±0.027 1
30	37.287 2±0.131 4	0.664 3±0.008 1	0.131 8±0.002 9	5.239 5±0.070 8	1.435 6±0.014 3
40	36.747 2±0.210 3	0.726 3±0.009 6	0.164 2±0.004 7	5.245 9±0.003 4	1.296 6±0.035 4
50	37.503 3±0.175 2	0.695 3±0.019 5	0.140 0±0.002 6	4.768 4±0.045 5	1.288 4±0.017 3
60	36.112 7±0.804 9	0.670 5±0.006 3	0.141 4±0.002 4	4.385 8±0.105 8	1.176 8±0.020 1
w_j	0.083	0.110	0.162	0.098	0.117

提取时间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)			S_i
	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
10	0.036 9±0.000 2	0.050 5±0.001 3	0.163 0±0.002 9	3.337±0.010
20	0.037 5±0.000 9	0.063 8±0.001 4	0.291 5±0.004 7	3.689±0.022
30	0.044 7±0.000 7	0.059 1±0.001 5	0.394 4±0.009 9	3.930±0.018
40	0.055 5±0.001 3	0.088 4±0.002 6	0.385 6±0.008 6	3.886±0.017
50	0.050 3±0.001 3	0.072 4±0.001 2	0.387 2±0.003 9	3.891±0.016
60	0.062 1±0.001 5	0.091 9±0.002 0	0.234 1±0.005 4	3.711±0.068
w_j	0.185	0.137	0.108	

长, 故选择液料比 20 : 1 作为球面对称设计的因素水平中心点。

2.3 球面对称设计及结果

依据单因素考察结果, 选取液料比 (A)、提取

表 5 液料比对各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Effect of liquid to solid ratio on component content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

液料比	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3-O-芸香糖苷
10 : 1	32.953 7±0.422 6	0.652 4±0.014 6	0.390 5±0.003 3	2.752 9±0.066 6	0.589 2±0.014 9
15 : 1	33.944 4±0.080 8	0.636 6±0.016 2	0.410 3±0.005 7	3.623 5±0.048 3	0.707 4±0.012 9
20 : 1	37.068 7±0.040 3	0.737 2±0.011 0	0.396 0±0.005 3	3.745 9±0.053 0	0.905 5±0.018 2
25 : 1	39.486 5±0.196 3	0.738 7±0.022 1	0.534 8±0.010 6	3.500 5±0.067 2	0.903 8±0.011 9
30 : 1	36.112 7±0.048 7	0.718 7±0.007 5	0.439 5±0.009 8	3.212 2±0.048 0	0.818 5±0.005 2
w_j	0.102	0.098	0.184	0.069	0.076

液料比	质量分数/(mg·g ⁻¹)			S_i
	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
10 : 1	0.158 3±0.004 1	0.033 8±0.000 7	0.498 3±0.010 0	3.833±0.038
15 : 1	0.157 9±0.003 1	0.039 1±0.000 6	0.364 3±0.009 3	3.990±0.005
20 : 1	0.160 7±0.004 4	0.046 0±0.000 7	0.526 7±0.011 8	4.360±0.007
25 : 1	0.203 1±0.004 5	0.067 5±0.000 7	0.818 8±0.022 9	4.662±0.020
30 : 1	0.168 2±0.003 0	0.052 3±0.000 9	0.442 5±0.005 2	4.218±0.004
w_j	0.245	0.108	0.118	

时间 (B)、提取温度 (C) 3 个影响较为显著的因素, 运用球面对称设计进行试验, 其中以液料比 20 : 1、提取时间 30 min、提取温度 70 °C 作为球面对称设计的中心点, 参考文献方法^[5]将各因素设置 $-\sqrt{3}$ 、-1、0、+1、 $\sqrt{3}$ 共 5 个水平。

在诸多赋权法中, CRITIC 赋权法是集熵权法和标准离差法优势于一体的客观赋权法, CRITIC 赋权法不仅吸取熵权法中考察因素对指标影响的思想, 还兼顾了指标间的影响。在多因素试验设计法中, 其可兼顾评价指标的对比强度及指标间冲突性来衡量各指标客观权重, 能够提高其在球面对称设计中权重分配的合理性, 因此, 本实验采用 CRITIC 赋权法对球面对称设计的各实验组进行评分, 将所得分数作为评价指标, 进行统计学分析。球面对称设计试验分组及结果见表 6。CRITIC 赋权法具体计算步骤如下。

(1) 数据标准化处理: 参照“2.2.1”项下方法处理。

(2) 考察指标变异性: CRITIC 法以标准差表示各指标内差异波动情况, 其中 S_j 为第 j 个指标的标准差。 S_j 越大表示该指标变异性越大, 评价强度越强。

$$\bar{x} = 1/n \sum_{i=1}^n x_{ij}$$

$$S_i = [\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_{ij})^2 / (n-1)]^{1/2}$$

(3) 考察指标冲突性: CRITIC 法以相关系数表示指标间冲突性 (R_j), 其中 r_{ij} 为第 i 个指标与第 j 个指标间的相关系数。

$$R_j = \sum_{i=1}^n (1 - r_{ij})$$

(4) 计算各指标信息量 (C_j)、客观权重 (W_j) 及综合得分 (Q_i)。

$$C_j = S_j R_j$$

$$W_j = C_j / \sum_{j=1}^m C_j$$

$$Q_i = \sum_{j=1}^m x_{ij} W_j$$

将上述实验结果经多项式回归处理, 所得的回归方程为 $y = 4.331 + 3.001 A + 1.751 B - 4.944 C - 2.223 A^2 - 0.123 B^2 + 2.738 C^2 - 1.815 AB + 1.635 AC + 0.390 BC$, 该方程回归系数 $R^2 = 0.660 4$, 且各项系数的显著性均大于 0.05, 说明本研究以多项式回归不适合预测黄芪-红花药对水提工艺的最佳参数。

2.4 遗传神经网络模型的建立与预测

2.4.1 遗传神经网络模型的建立 以球面对称设计中的液料比、提取时间、提取温度作为遗传神经网络

表 6 球面对称设计实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 Results of spherical symmetry design ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

序号	A	B/min	C/°C	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
				羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷
1	15 : 1	20	60	33.065 7±0.223 9	0.586 6±0.011 7	0.034 3±0.000 2
2	25 : 1	20	60	33.130 9±0.050 8	0.606 1±0.007 6	0.034 5±0.001 0
3	15 : 1	40	60	32.853 1±0.089 2	0.592 8±0.016 2	0.050 4±0.001 0
4	25 : 1	40	60	33.894 1±0.107 9	0.625 2±0.012 9	0.043 3±0.000 7
5	15 : 1	20	80	32.131 8±0.201 3	0.558 9±0.016 2	0.105 7±0.003 1
6	25 : 1	20	80	36.960 3±0.095 5	0.676 2±0.020 2	0.138 2±0.001 2
7	15 : 1	40	80	36.626 9±0.083 1	0.693 4±0.014 7	0.122 4±0.001 7
8	25 : 1	40	80	35.336 8±0.223 8	0.640 4±0.013 4	0.134 2±0.001 8
9	11.35 : 1	30	70	34.784 9±0.127 8	0.663 3±0.007 5	0.044 6±0.000 9
10	28.65 : 1	30	70	32.877 7±0.215 2	0.599 4±0.006 2	0.067 6±0.001 1
11	20 : 1	13	70	34.167 1±0.242 3	0.672 9±0.013 1	0.042 4±0.000 7
12	20 : 1	47	70	35.669 7±0.336 1	0.666 7±0.013 6	0.090 8±0.001 6
13	20 : 1	30	53	33.900 7±0.328 6	0.603 2±0.010 5	0.029 5±0.000 7
14	20 : 1	30	87	37.721 2±0.216 6	0.758 7±0.015 8	0.179 6±0.002 2
15	20 : 1	30	70	35.296 7±0.362 2	0.626 1±0.015 5	0.043 8±0.000 8
W_j				0.101	0.096	0.102

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					Q_i
	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3-O-芸香糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
1	4.321 8±0.011 9	0.910 4±0.007 6	0.012 6±0.000 3	0.030 2±0.000 7	0.200 7±0.002 0	4.289±0.026
2	3.997 8±0.011 8	0.814 1±0.013 3	0.011 4±0.000 2	0.033 3±0.001 0	0.135 6±0.002 0	4.222±0.002
3	4.370 2±0.052 7	0.919 7±0.023 5	0.017 0±0.000 4	0.028 3±0.000 2	0.206 7±0.004 3	4.280±0.019
4	4.375 9±0.039 2	0.973 3±0.024 4	0.015 8±0.000 1	0.041 1±0.000 8	0.231 4±0.002 5	4.401±0.013
5	4.102 3±0.029 0	1.054 3±0.010 6	0.036 4±0.000 6	0.035 9±0.000 3	0.328 2±0.009 8	4.200±0.021
6	4.867 6±0.023 2	1.089 8±0.026 1	0.047 0±0.000 6	0.033 6±0.000 4	0.293 2±0.006 8	4.834±0.004
7	4.701 5±0.047 2	0.911 5±0.019 4	0.050 5±0.000 3	0.014 6±0.000 3	0.266 9±0.004 3	4.742±0.005
8	4.047 0±0.045 8	1.008 3±0.009 0	0.049 1±0.000 6	0.036 0±0.000 7	0.227 0±0.001 4	4.508±0.018
9	4.819 7±0.051 7	0.774 7±0.016 4	0.022 7±0.000 4	0.024 8±0.000 6	0.255 4±0.002 7	4.545±0.020
10	4.084 2±0.087 9	0.709 1±0.014 3	0.028 0±0.000 2	0.014 4±0.000 3	0.299 2±0.006 2	4.218±0.037
11	4.670 0±0.041 6	0.779 1±0.018 7	0.015 7±0.000 3	0.028 9±0.000 4	0.169 6±0.003 3	4.448±0.031
12	4.674 2±0.096 2	1.033 5±0.019 4	0.036 9±0.000 6	0.057 1±0.000 6	0.367 6±0.005 3	4.669±0.017
13	4.522 9±0.047 1	0.896 2±0.017 7	0.009 2±0.000 1	0.010 3±0.000 2	0.130 2±0.002 0	4.395±0.039
14	4.669 2±0.085 9	0.995 2±0.006 6	0.064 7±0.001 1	0.010 0±0.000 2	0.323 3±0.005 2	4.877±0.030
15	4.672 1±0.134 3	0.748 4±0.012 4	0.018 9±0.000 4	0.019 2±0.000 4	0.166 8±0.002 4	4.552±0.061
W_j	0.171	0.132	0.098	0.181	0.119	

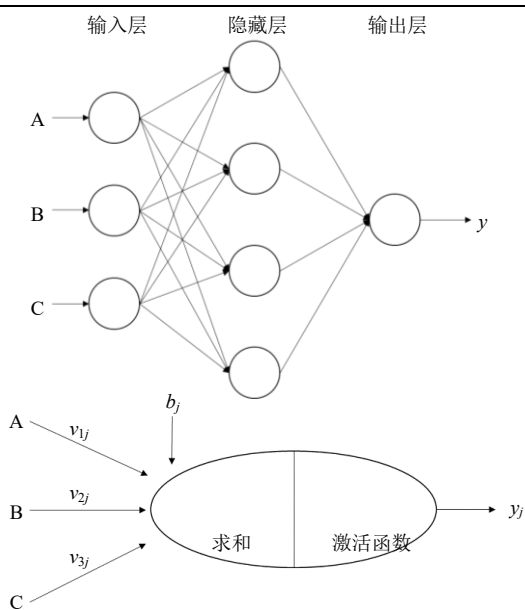
络的输入变量, 黄芪-红花药对水提液中的 8 种成分含量经 CRITIC 赋权法计算得到的综合得分 Q_i 值作为输出变量。根据留一法, 将其中球面对称设计中的 13 组数据作为神经网络模型的训练集, 2 组数据作为测试集。根据不同隐含神经元数目下训练集最

大决定误差 (the maximum absolute error of training data, MAE_{train})、验证集最大决定误差 (the maximum absolute error of testing data, MAE_{test})、训练集决定系数 (the determination coefficient of training data, R^2_{train})、训练集相关系数 (the correlation coefficient

of training data, r_{train}) 作为确定隐含神经元合适数量的指标。其中 R^2_{train} 和 r_{train} 趋近于 1, $\text{MAE}_{\text{train}}$ 和 MAE_{test} 较小时的隐含神经元数目为较合适的, 具体结果见表 7。为保证神经网络模型预测的准确性, 尽可能减少模型学习时间和避免过拟合现象发生, 本实验选择输入层×隐藏层×输出层为 $3 \times 4 \times 1$ 的遗传神经网络模型, 如图 1 所示; 该遗传神经网络

表 7 隐含神经元数目对训练数据和测试数据的 $\text{MAE}_{\text{train}}$ 、 MAE_{test} 、 R^2_{train} 、 r_{train} 的影响
Table 7 Effect of number of hidden neurons on maximum absolute error, determination coefficient, and correlation coefficient for training data and testing data

隐藏层神经元数目	$\text{MAE}_{\text{train}}$	MAE_{test}	R^2_{train}	r_{train}
1	0.111 3	0.119 9	0.676 6	0.822 6
2	0.079 2	0.074 2	0.792 2	0.890 4
3	0.036 8	0.061 6	0.942 1	0.984 8
4	0.019 4	0.015 7	0.987 1	0.995 5
5	0.015 1	0.036 5	0.991 0	0.996 0
6	0.033 2	0.045 6	0.970 6	0.987 0



当 $j=1$ 时, v_{1j} 和 b_j 为输入层与隐藏层间权重和截距, y_j 为隐藏层神经元输出函数; 当 $j=2$ 时, v_{1j} 和 b_j 为隐藏层与输出层间权重和截距, y_j 为输出层神经元输出函数

when $j=1$, v_{1j} and b_j are weights and intercepts between the input layer and the hidden layer, and y_j is the output function of neurons in the hidden layer; when $j=2$, v_{1j} and b_j are weights and intercepts between the hidden layer and the output layer, and y_j is the output function of neurons in the output layer

图 1 黄芪-红花药对水提液的遗传神经网络模型结构示意图
Fig. 1 Schematic diagram of genetic neural network model for water extraction of *Astragali Radix-Carthami Flos* drug pair

模型的相应权重如表 8 所示。图 2 为模型预测值与试验实测值之间的关系, 表明含有 4 个隐藏层神经元的遗传神经网络模型与实验数据是基本一致的。

2.4.2 基于遗传神经网络模型的目标寻优 利用

表 8 用于预测黄芪-红花药对水提液水提工艺综合评分的 4 个隐藏层神经元的权重和截距
Table 8 Weights and intercepts of four hidden layer neurons for predicting comprehensive score of water extraction of *Astragali Radix-Carthami Flos* drug pair

	v_1	v_2	b_1	b_2
1.990 2	-1.229 4	1.057 0	-1.958 0	0.599 0
4.534 3	1.342 4	-0.273 9	3.064 3	1.352 9
-3.446 4	-2.632 6	3.510 2	2.445 0	-0.071 3
-0.076 7	1.936 1	1.345 5	0.704 9	-1.695 0

v_1 和 b_1 分别为输入层与隐藏层间权重和截距; v_2 和 b_2 分别为隐藏层与输出层间权重和截距

v_1 and b_1 are the weights and intercepts between the input and hidden layers; v_2 and b_2 are the weights and intercepts between the hidden and output layers

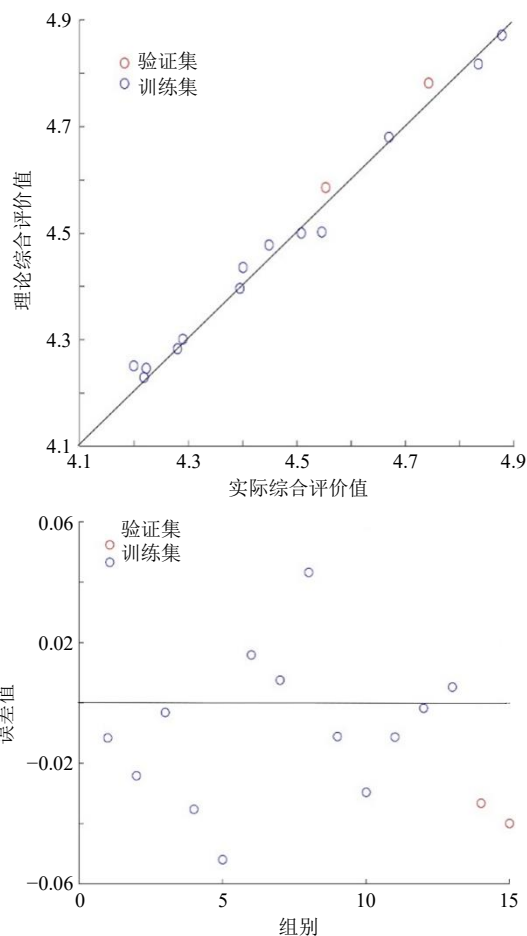


图 2 实验数据与模型预测数据误差分析结果
Fig. 2 Error analysis results of experimental data and model prediction data

MATLAB 2015a 软件, 设定种群大小为 1000, 最大迭代次数为 200, 最终预测得到最佳提取工艺参数为液料比 22.7:1, 提取时间 30 min, 提取温度 87 °C, 综合得分为 4.960。

2.5 最优工艺条件的验证性实验

以遗传神经网络模型预测得到的最优提取工艺

条件, 精密称取黄芪粉末 15 g 和红花粉末 5 g, 共 3 份, 按上述得到的最优工艺条件进行操作, 测定各成分含量, 计算得到综合评分, 结果见表 9。通过遗传神经网络模型预测的最佳提取工艺条件得到的平均综合评分为 5.004, RSD 为 0.46%, 高于球面对称设计试验中的最高综合评分。

表 9 遗传神经网络模型预测最优工艺参数的验证性实验

Table 9 Verification test of optimal process parameters for genetic neural network model prediction

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								Q _i
	羟基红花黄色素 A	紫丁香苷	毛蕊异黄酮苷	脱水红花黄色素 B	山柰酚-3-O-芸香糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	黄芪甲苷	
1	39.074 8	0.741 5	0.192 6	4.803 5	0.691 5	0.036 7	0.065 7	0.358 3	5.021
2	38.999 8	0.750 6	0.187 8	4.807 8	0.690 4	0.035 4	0.064 5	0.355 0	5.013
3	38.782 6	0.729 6	0.195 3	4.778 9	0.671 8	0.037 2	0.061 7	0.311 8	4.977

3 讨论

本实验依据传统汤剂制备方法用水提取黄芪-红花药对组分, 通过 HPLC-DAD 法测定其中羟基红花黄色素 A、紫丁香苷、毛蕊异黄酮苷、脱水红花黄色素 B、山柰酚-3-O-芸香糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷 8 种有效成分的含量, 并将多指标通过客观赋权法整合为单一的综合得分以评价不同条件提取工艺的优劣。

熵权法是一种仅以指标离散程度确定权重的赋权法。指标的离散程度越大, 其权重也越大。与之相对应的, 单因素试验是假设各因素之间不存在相互作用且仅存在因素对指标影响为前提而设计的。因此, 单因素试验与熵权法结合应用具有一定合理性。以熵权法计算各单因素实验中的综合评分, 通过比较综合评分及联系实际确定球面对称设计各因素水平中心点。

与单因素试验不同, 球面设计等多因素试验设计承认不同因素之间的相互作用, 在数据分析方面也应考虑指标间的影响, 而 CRITIC 赋权法兼顾评价指标的对比强度及指标间冲突性, 可提高多因素试验设计中权重分配合理性, 因此本研究选用 CRITIC 赋权法计算球面对称设计中的各指标权重及综合评分, 考察“工艺参数-指标”和“指标-指标”的影响, 能够提高其在球面对称设计中权重分配的合理性。

球面对称设计由于其相比于正交设计、析因设计、均匀设计等具有提取次数少、试验精度高等优势, 正逐渐应用于中药提取分离领域当中。因为提取次数只能为整数, 故在球面对称设计试验中不能

将其作为考察因素。为完善黄芪-红花药对水提工艺条件, 本研究在单因素试验过程中筛选合适的提取次数, 结合其他单因素试验结果确定球面对称设计的因素与水平。

遗传神经网络是一种模拟生物进化过程、适合处理非线性数据的优选算法^[23], 现已被成功应用于中药质量评价^[24]、中药制剂建模研究^[25]等领域当中。大量研究证明遗传神经网络具有较好的全局寻优能力和抗过拟合能力, 可大大减少研究时间和精力, 适用于中药提取多因素试验设计。

因此, 本实验最后利用建立的遗传神经网络数学模型, 以红花黄芪水提液中的 8 种成分的 CRITIC 赋权法综合评分为指标进行工艺模拟优化。通过验证确定黄芪-红花药对水提工艺的最佳条件为液料比 22.7:1, 提取温度 87 °C, 提取次数 2 次, 每次 30 min, 其综合评分为 5.004, RSD 为 0.46%, 高于任何一组球面对称设计实验的综合评分, 表明在球面对称设计实验的基础上, 通过遗传神经网络模型的预测能够有效优化黄芪-红花药对水提工艺参数。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周国赢, 杨锋. 脑血管病妙方特技精粹 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 152-234.
- [2] 彭霞, 饶秋华, 李卓, 等. 基于球面对称设计的离散元细观参数定量确定方法 [J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2019, 50(11): 2801-2812.
- [3] 刘喜舞, 郑礼胜, 谢霞, 等. 细柱五加叶多糖提取分离纯化及保湿性能研究 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1167-1173.
- [4] 刘岩雪. 荧光原位杂交技术检测乳腺癌 Her-2/neu 基因

- 扩增的方法学研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2005.
- [5] 刘娟, 谭红玲. 球面对称设计优化毛蕊老鹳草总黄酮的提取工艺 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(17): 5398-5399.
- [6] 杨岩, 肖佳妹, 周晋, 等. 支持向量机法及其在中药研究中的应用 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2258-2266.
- [7] 黄鹏程, 金伟锋, 万海同, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3815-3823.
- [8] 杨岩, 肖佳妹, 王韧, 等. 人工神经网络在中药相关研究领域的应用 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3230-3236.
- [9] 万浩宇, 张洋洋, 虞立, 等. 基于随机森林模型的超声提取优化红花中两种有效成分工艺研究 [J]. 中药材, 2020, 43(3): 673-677.
- [10] 张佳颖. 以含三七皂苷成分中药注射液为例建立 ADR 前置预测系统 [D]. 成都: 电子科技大学, 2020.
- [11] 夏伯候, 胡玉珍, 熊苏慧, 等. 随机森林算法在中药指纹图谱中的应用: 以不同品牌夏桑菊颗粒指纹图谱分析为例 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1324-1330.
- [12] 苑婕, 李晓杰, 陈超, 等. 基于随机森林算法的川芎成分-靶点-疾病网络的预测研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2336-2340.
- [13] 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]. 中国药理学杂志, 2006, 41(5): 371-374.
- [14] Bai X, Wang W X, Fu R J, *et al.* Therapeutic potential of hydroxysafflor yellow A on cardio-cerebrovascular diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 01265.
- [15] Tan J Y, Luo J, Meng C C, *et al.* Syringin exerts neuroprotective effects in a rat model of cerebral ischemia through the FOXO3a/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107268.
- [16] 王圣鑫, 闫向丽, 郑昊圳, 等. 毛蕊异黄酮苷和芍药苷联用对氧糖剥夺再灌注 HT22 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 138-142.
- [17] Yue S, Wu L, Qu C, *et al.* Development and validation of a UFLC-MS/MS method for the determination of anhydrosafflor yellow B in rat plasma and its application to pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1003: 54-59.
- [18] Yu L, Chen C, Wang L F, *et al.* Neuroprotective effect of kaempferol glycosides against brain injury and neuroinflammation by inhibiting the activation of NF- κ B and STAT3 in transient focal stroke [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55839.
- [19] Gaowa S, Bao N, Da M, *et al.* Traditional Mongolian medicine Eerdun Wurile improves stroke recovery through regulation of gene expression in rat brain [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 222: 249-260.
- [20] Zhang W W, Xu F, Wang D, *et al.* Buyang Huanwu Decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: *In vitro* evidences [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(3): 194-202.
- [21] 张弅宁, 高维娟, 周晓红, 等. 毛蕊异黄酮对脑缺血/再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(12): 1775-1776.
- [22] Sun L, Han R L, Guo F, *et al.* Antagonistic effects of IL-17 and Astragaloside IV on cortical neurogenesis and cognitive behavior after stroke in adult mice through Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 74.
- [23] 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.
- [24] 王泽, 顾勤兰, 王志祥. 基于遗传神经网络的中药葛根及同属植物的质量评价研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1580-1582.
- [25] 刘瑞新, 刘南岑, 史新元, 等. 基于遗传算法和 BP 网络的清开灵注射液增溶工艺优化研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2469-2472.

[责任编辑 郑礼胜]