

# BP 人工神经网络结合正交试验优化 解毒止血颗粒的提取工艺

刘李梅 彭伟 涂禾 谢松 向猛 郭宏彦

(四川省骨科医院,成都,610041)

**摘要** 目的:优选解毒止血颗粒的提取工艺。方法:以黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚含量以及干膏收率为评价指标,采用正交试验联合 BP 人工神经网络考察加水量、提取时间、提取次数等因素的影响,利用层次分析法(AHP)综合加权评分筛选解毒止血颗粒提取工艺。结果:最佳提取工艺参数为 11 倍水量,加热回流提取 3 次,105 min/次。结论:优选的提取工艺科学合理,稳定可行。正交试验联合 BP 人工神经网络优化方法实用高效,适宜于医疗机构中药制剂研发需求。

**关键词** 解毒止血颗粒;黄芩苷;汉黄芩苷;丹皮酚;层次分析法;正交试验;BP 人工神经网络

## Optimization of Extraction Process of Jiedu Zhixue Granule by BP Artificial Neural Network and Orthogonal Test

Liu Limei, Peng Wei, Tu He, Xie Song, Xiang Meng, Guo Hongyan

(Sichuan Provincial Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China)

**Abstract Objective:** To optimize the extraction process of Jiedu Zhixue Granules. **Methods:** Taking the baicaline, wogonoside, paeonol content and dry extract yield as the evaluation index, the extraction process of Jiedu Zhixue Granule was researched by using the combination methods between orthogonal test and BP artificial neural network to study the influence of water addition, extraction time, extraction times etc., and using the analytic hierarchy process (AHP) to weighted mark comprehensively for screening extraction process of Jiedu Zhixue Granule. **Results:** The optimum extraction process was as following: adding 11 times the amount of water, heating reflux extraction 3 times, and each time for 105 minutes. **Conclusion:** The optimal extraction process is scientific, rational, stable and feasible. The optimization method of orthogonal experiment combined with BP artificial neural network is suitable for R&D needs of TCM preparation in medical institution because of its practical and efficient characteristics.

**Key Words** Jiedu Zhixue Granule; Baicaline; Wogonoside; Paeonol; Analytic hierarchy process; Orthogonal test; BP artificial neural network

中图分类号:R283.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.010

复方解毒止血汤是四川省骨科医院多年的临床工作经验总结出来的,经医院药事委员会批准的协定方。处方含有黄芩 12 g、黄芪 20 g、党参 15 g、陈皮 6 g、牡丹皮 12 g、酒大黄 6 g、酒黄连 10 g、栀子 10 g、紫花地丁 20 g、蒲公英 15 g 等 14 味药物组成,具有清热解毒、消肿止痛、补气血、止血的功效。此协定方在我院临床使用量大,对治疗损伤出血、创面渗血、创面感染症、骨科术后感染<sup>[1]</sup> 有独特优势,因此将其开发为医疗机构制剂具有重要意义。

目前可应用于中药最佳工艺或最佳处方配比筛选的试验设计、优化方法丰富,如正交设计<sup>[2-3]</sup>、均匀设计、混料设计、星点设计、人工神经网络优化法、效应面优化法等,不同方法之间各有优势,但也存在相应的局限性。如正交设计适宜于水平数 < 5 的多因

素多水平试验,均匀设计适宜于水平数较多的试验,混料设计适宜于处方配比的筛选,星点设计所涉及变量应为连续变量,且试验次数相较于正交设计大幅增加<sup>[4]</sup>。

因此,本研究以黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚含量以及干膏收率为评价指标,采用层次分析法、正交试验、BP 人工神经网络优选其最佳提取工艺参数,为后续开发为医疗机构制剂研究奠定基础,同时探讨正交设计-BP 人工神经网络优化联用方法在医疗机构中药制剂提取工艺研究环节的适用性。

## 1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waters,美国,型号: e2695、2489UV/Vis Detector); XS105 型分析天平(十万分之一,METTLER TOLEDO 公司,瑞士,型号:

基金项目:四川省骨科医院科研课题项目(2017-9)

作者简介:刘李梅(1988.10—),女,硕士研究生,中药师,研究方向:中药新制剂、新技术,E-mail:834321452@qq.com

通信作者:涂禾(1965.05—),男,本科,主任中药师,研究方向:中药制剂、医院药事管理及临床药学,E-mail:297983480@qq.com

XS105)、电子天平(METTLER TOLEDO公司,瑞士,型号:PL202-L);超纯水机(重庆艾科浦公司,型号:AYJ1-0501-U)。

1.2 试药 黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201720),汉黄芩苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq18031409),丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110708-201407)。党参(批号:180816)、黄芪(批号:181022)、黄芩(批号:171014)、酒黄连(批号:180820)、白术(批号:180919)、牡丹皮(批号:180920)、酒大黄(批号:180302)、陈皮(批号:181008)、栀子(批号:171130)、甘草(批号:180926)、蒲公英(批号:180920)、紫花地丁(批号:181009)、仙鹤草(批号:180912),以上均购于四川省中药饮片有限责任公司。经四川省骨科医院涂禾主任中药师鉴定,均符合2015年版中华人民共和国药典相关标准。

1.3 试剂 乙腈、甲醇为色谱纯(Fisher公司,批号174491、批号154449),其他试剂为分析纯,水为自制超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Waters SymmetryShield™ RP18(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min:A 19%,B 81%;8~35 min:A 19%→50%,B 81%→50%;35~36 min:A 50%→100%,B 50%→0%;36~40 min:A 100%→19%,B 0%→81%),流速为1.0 mL/min,柱温30℃,检测波长为274 nm,进样体积10 μL。在上述色谱条件下,样品中黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚的保留时间与对照品一致,成分色谱峰能达到较好的分离。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚对照品适量,分别置于25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,分别制得每1 mL含黄芩苷478 μg,汉黄芩苷51.85 μg,丹皮酚48.84 μg的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取0.5倍处方量饮片共9份,按照正交设计表加水回流提取,趁热滤过,合并滤液,定容。精密吸取提取液1 mL,加70%乙醇定容至10 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得9批供试品溶液,依次记为S1-S9。

2.4 阴性样品溶液的制备 分别称取缺黄芩阴性、缺牡丹皮阴性0.5倍处方量饮片2份,加10倍量水,回流提取1次,每次1 h,滤过,合并滤液,加水定

容至1 000 mL。精密吸取提取液1 mL,加70%乙醇定容至10 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.5 专属性试验 分别精密量取2.1.2项下3种对照品溶液、2.1.3项下供试品溶液、2.1.4项下2种阴性对照溶液各10 μL,按2.1.1项下色谱条件分别注入液相色谱仪,记录色谱图,结果可见,阴性对照溶液在黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚峰保留时间处无干扰,专属性良好。见图1。

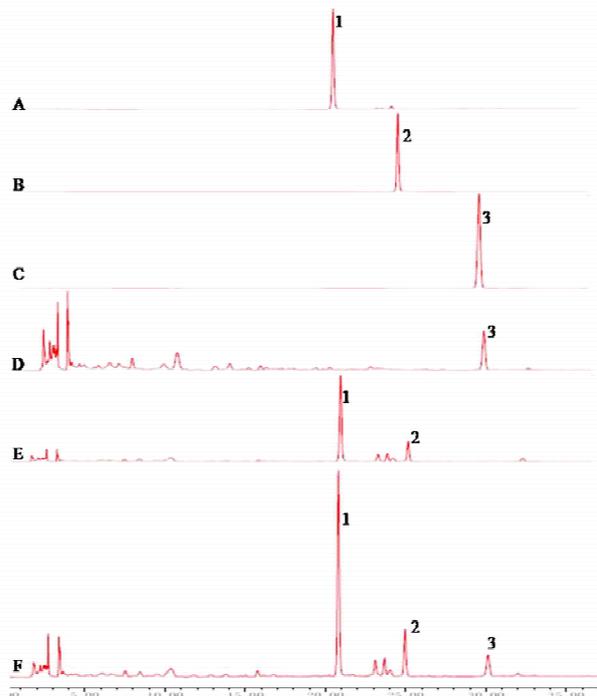


图1 对照品、阴性对照及提取液色谱图

注:A. 黄芩苷对照品;B. 汉黄芩苷对照品;C. 丹皮酚对照品;D. 黄芩阴性;E. 牡丹皮阴性;F. 解毒止血汤提取液。1. 黄芩苷;2. 汉黄芩苷;3. 丹皮酚

2.6 线性关系考察 将2.1.2项下所得对照品溶液分别稀释,每个对照品溶液共6个浓度,得到一系列不同质量浓度的对照品溶液。取各个浓度的对照品溶液各10 μL注入高效液相色谱仪,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到回归方程与相关系数。见表1。

表1 对照品标准曲线方程和线性范围

对照品	回归方程	线性关系(r)	线性范围(μg/mL)
黄芩苷	$Y = 32\,450X - 61\,888$	0.999	19.120 ~ 114.720
汉黄芩苷	$Y = 44\,359X - 54\,893$	0.999	4.148 ~ 20.740
丹皮酚	$Y = 48\,029X + 14\,711$	0.999	1.954 ~ 15.629

2.7 中间精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液(23.90 μg/mL)、汉黄芩苷对照品溶液

(51.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、丹皮酚对照品溶液(24.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )10  $\mu\text{L}$ ,按2.1.1项下色谱条件连续进样6次,测定各成分色谱峰峰面积。结果黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为0.30%、0.29%、0.17%,表明仪器精密度良好。

2.8 供试品溶液稳定性试验 取供试品溶液S1,分别于制备后0、2、4、6、20、24 h,精密吸取10  $\mu\text{L}$ 进样分析,测定各成分色谱峰峰面积。结果黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为0.28%、0.96%、0.15%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 重复性试验 平行制备S1供试品溶液6份,精密吸取10  $\mu\text{L}$ 进样分析,测定各成分色谱峰峰面积。结果黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为0.56%、0.01%、0.47%,表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密吸取已测定的供试品溶液S1 0.5 mL共6份,分别置于10 mL容量瓶中,精密加入黄芩苷对照品溶液(478  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.1 mL,汉黄芩苷对照品溶液(51.85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.1 mL,丹皮酚对照品溶液(48.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )0.1 mL,精密吸取10  $\mu\text{L}$ 进样分析,测定各成分色谱峰峰面积。结果黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚的平均回收率分别为101.72%、100.50%、98.53%,RSD分别为1.71%、1.25%、1.17%,表明该方法回收率良好。

2.11 干膏收率测定 精密吸取提取液适量,置于已恒重蒸发皿中,水浴蒸干,再置于烘箱105  $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重,精密称定重量,计算干膏收率(%)。

## 2.12 正交试验优选提取工艺

2.12.1 浸泡时间及吸水率的考察 称取0.5倍处方量饮片共3份,分别加入1 000 mL水,每隔30 min滤过,收集滤液,记录剩余水量(mL);直至药材全部浸透心,剩余水量不再减少为止,计算药材的吸水率(%)。结果:处方饮片的平均吸水率为228.40%,因此确定在首次提取时应多加2倍量的溶剂,浸泡时间为30 min后开始提取。

### 2.12.2 单因素考察

2.12.2.1 提取时间考察 称取0.5倍处方量饮片共3份,各加10倍量水,分别回流提取60、90、120 min,滤过,定容至1 000 mL容量瓶中。精密吸取提取液1 mL,加70%乙醇定容至10 mL,摇匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。见表2。结果:提取90 min时,黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚含量最高。

2.12.2.2 加水量考察 称取0.5倍处方量饮片共4份,分别加入8、10、12、14倍量水,各回流提取

60 min,滤过,定容至1 000 mL容量瓶中。精密吸取提取液1 mL,加70%乙醇定容至10 mL,摇匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。溶剂为12倍量水提取时,黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚含量最高;再增加溶剂用量,黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚含量差异无统计学意义。见表3。

表2 提取时间考察( $n=3$ )

提取时间 (min)	黄芩苷含量 (%)	汉黄芩苷含量 (%)	丹皮酚含量 (%)
60	4.02	0.80	0.48
90	4.32	0.83	0.56
120	4.26	0.83	0.57

表3 溶剂用量考察

溶剂用量 (倍)	黄芩苷含量 (%)	汉黄芩苷含量 (%)	丹皮酚含量 (%)
8	3.99	0.79	0.47
10	4.43	0.89	0.60
12	4.92	0.98	0.69
14	4.96	1.01	0.71

2.13 正交试验设计 根据单因素考察结果、临床应用形式并结合生产实际,以加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,安排L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,因素水平见表4。

表4 正交因素水平表

水平	因素		
	A 加水量(倍)	B 提取时间(h)	C 提取次数(次)
1	10	1	1
2	12	1.5	2
3	14	2	3

2.14 指标权重的确立 基于处方药味君臣佐使的配伍关系,确定各评价指标优先顺序依次为黄芩苷>汉黄芩苷>丹皮酚>干膏收率,构建指标成对比较判断优先矩阵<sup>[5]</sup>。见表5。根据表5评分结果,AHP法计算结果可得到黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚、干膏收率4项指标的权重系数分别为48.72%、27.40%、13.30%、10.58%。一致性比率(CR)=0.012,CR<0.1,即判断矩阵具有满意的一致性,表明权重系数合理有效,可用在解毒止血颗粒提取工艺优选的综合评分中。

表5 指标成对比较判断优先矩阵

权重指标	黄芩苷	汉黄芩苷	丹皮酚	干膏收率
黄芩苷	1	2	3	5
汉黄芩苷	1/2	1	2	3
丹皮酚	1/3	1/2	1	1
干膏收率	1/5	1/3	1	1

表6 正交试验结果(n=3)

编号	A(倍)	B(h)	C(次)	D(空白)	黄芩苷(%)	汉黄芩苷(%)	丹皮酚(%)	干膏收率(%)	综合评分(分)
1	10	1	1	1	8.86	1.74	1.11	26.22	64.58
2	10	1.5	2	2	11.61	2.27	1.70	36.44	86.70
3	10	2	3	3	12.10	2.50	1.84	39.53	92.54
4	12	1	2	3	11.57	2.34	1.70	36.26	87.19
5	12	1.5	3	1	12.45	2.59	2.00	40.39	96.03
6	12	2	1	2	9.51	1.85	1.30	28.45	69.94
7	14	1	3	2	13.03	2.77	2.00	40.46	100.00
8	14	1.5	1	3	9.57	1.90	1.39	29.87	71.63
9	14	2	2	1	12.08	2.43	1.90	38.08	91.80
K <sub>1</sub>	81.27	83.92	68.72	84.14					
K <sub>2</sub>	84.39	84.79	88.56	85.55					
K <sub>3</sub>	87.81	84.76	96.19	83.79					
S <sub>j</sub>	6.54	0.86	27.47	1.76					

2.15 含量测定及干膏率计算 按2.1.3项下方法制备供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样分析,测定各供试品中成分含量及提取液干膏率,结果见表6。

表7 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	F 临界值	P 值
A	64.14	2	12.32	99	
B	1.45	2	0.28	99	
C	1206.84	2	231.73	99	<0.01
D(误差)	5.21	2			

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00, F<sub>0.01</sub>(2,2) = 99.00

从方差分析结果可知,提取次数(C)对于干膏率、黄芩苷、汉黄芩苷、丹皮酚的提取有显著影响,为主要因素。加水量(A)、提取时间(B)对提取的影响不大,为次要因素。结合直观分析,各因素作用主次为 C > A > B,且 C<sub>3</sub> > C<sub>2</sub> > C<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> > A<sub>2</sub> > A<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> > B<sub>3</sub> > B<sub>1</sub>,所优选最佳工艺确定为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即 14 倍量水、1.5 h/次、提取 3 次。

2.16 基于正交试验的人工神经网络优化 以正交试验中加水量、提取时间、提取次数 3 个因素数值作为输入层,以黄芩苷含量、汉黄芩苷含量、丹皮酚含量、干膏率数值作为输出层,运用 MATLAB (R2014b 版本,Math Works,美国)软件编程,建立 BP 人工神经网络。采用 Levenberg-Marquardt 算法,最大迭代次数 1 000 次,网络计算精度为 1 × 10<sup>-5</sup>,建立并训练网络,很快即获得性能与预测能力良好的 BP 人工神经网络(均方误差为 2.02 × 10<sup>-6</sup>)。基于所建立的 BP 人工神经网络模型,以加水量等 3 个因素值为自变量,并分别对 3 个因素制定合适的步长,采用 MATLAB 相关函数对每个因素定义域值进行编

程,利用 sim 函数对网络优化结果进行仿真输出,以寻求输出值最大组合。结果 BP 人工神经网络模型仿真优化最佳提取工艺为:11 倍量水,提取 105 min,提取 3 次。

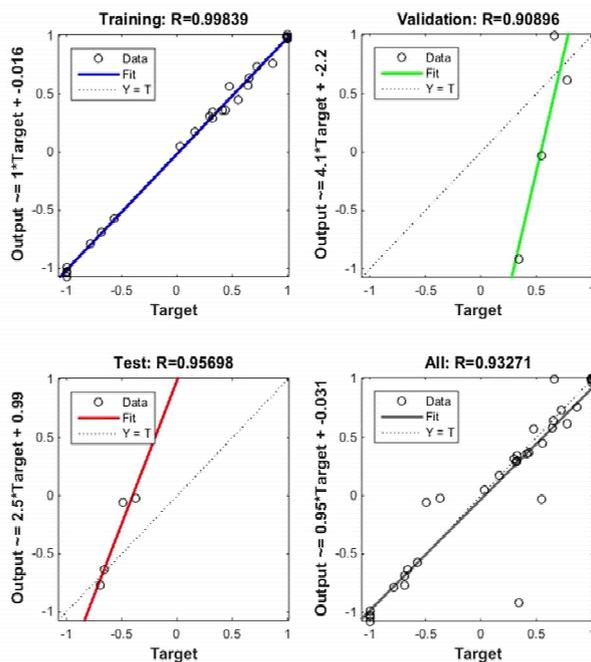


图2 BP 人工神经网络训练结果分析图

2.17 验证试验 称取 0.5 倍处方量饮片,按正交设计试验与 BP 人工神经网络所优选最佳提取工艺参数,分别平行安排 3 组试验,与正交试验最佳工艺所得结果比较,BP 人工神经网络优化工艺试验的考察指标均处于更优水平,且重复性良好,具有可操作性;同时节约能源。由此确定解毒止血颗粒最佳提取工艺参数为 11 倍量水,加热回流提取 3 次,提取 105 min/次。见表 8。

表 8 验证试验结果( $n=3$ )

组别		黄芩苷(%)	RSD(%)	汉黄芩苷(%)	RSD(%)	丹皮酚(%)	RSD(%)	干膏收率(%)	RSD(%)
正交优化	1	12.40	1.11	2.52	1.01	1.96	1.36	26.13	0.62
	2	12.29		2.50		1.95		26.00	
	3	12.13		2.47		1.91		26.32	
BP 神经网络优化	1	12.67	0.83	2.71	1.09	1.98	2.26	26.52	0.37
	2	12.76		2.74		1.91		26.47	
	3	12.88		2.77		1.90		26.33	

### 3 讨论

基于中药多成分、多靶点的作用特性,多指标综合加权评分是目前中药提取工艺质量评价的重要手段。AHP法作为一种介于主、客观权重系数法之间的赋权方法,既可体现研究者对各项指标的主观重视程度,又可通过数学处理反映各项指标之间的相互联系与影响,降低经验性权数法的主观影响,使各指标权重系数具有较好的合理性和科学性,目前已被广泛应用于中药的提取工艺研究并具较好的实用价值<sup>[6-8]</sup>。

正交试验因其“均匀分散、整齐可比”的特点,在筛选影响因素主次、优化最佳参数组合等方面的研究中应用广泛,但受限于因素水平的设定,正交试验所筛选出的最佳参数只是已设水平的组合,有可能只是较优组合而非最佳组合。BP神经网络基于其输入层、隐藏层、输出层的三层神经网络结构,可通过相应函数完成输入层与输出层的高度非线性拟合,从而实现了对多因素多指标的试验优化。因此,通过正交试验获得训练数据和样本,再利用BP神经网络进行优化筛选的方法,只需进行较少次数试验即可获取理想试验参数组合,可操作性强,目前在中药炮制工艺与提取工艺的相关研究中均有应用<sup>[9-11]</sup>。

本文联合多种方法得出解毒止血颗粒最优提取工艺参数,为制剂开发奠定基础。但是本文仅基于解毒止血方在临床以汤剂的形式给药,采用正交试验联合BP神经网络优选出解毒止血汤水提工

艺参数,未比较其他溶剂提取。下一步拟将醇提工艺优选,并结合水提、醇提2种提取物的药理学实验确定最优的提取工艺。

### 参考文献

- [1] 石玮玮,鲁丽莎,马士辉,等. 解毒止血汤联合功能锻炼促进全髋关节置换术后快速康复的临床疗效观察[J]. 四川中医, 2017, 35(3): 143-145.
- [2] 晏子俊,张良明,陈彦清,等. 攀枝花车前草中总黄酮的提取及其含量[J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2595-2599.
- [3] 曾祖平,石佳,王子君,等. 紫草乳膏提取工艺研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(11): 2872-2875.
- [4] 王跃生,欧阳旭,王丹辉,等. 数学模式试验设计方法的优缺点比较及其在中药研究应用中的适宜性分析[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 207-210.
- [5] 任爱农,卢爱玲,田耀洲,等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372-374.
- [6] 李慧,刘其南,张丽,等. 基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2832-2837.
- [7] 查日维,谢晓梅,杨沫,等. 基于层次分析法的多指标综合评价优选木瓜提取方法[J]. 中成药, 2014, 36(3): 643-646.
- [8] 马聪,包永睿,孟宪生,等. 基于层次分析和量效比较法优选荆芥总黄酮提取工艺[J]. 中药材, 2015, 38(2): 381-385.
- [9] 吴娜,赵重博,胡美变,等. BP-ANN结合正交试验法优化白附子多糖提取工艺[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1248-1253.
- [10] 张超,韩丽,杨秀梅,等. BP神经网络结合正交试验优化苦参方中荆芥挥发油的提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(1): 70-74.
- [11] 罗妮妮,程玲,傅超美,等. 正交试验结合人工神经网络模型优化蓬莪术炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 10-13.

(2019-05-21 收稿 责任编辑:王明)