

Box-Behnken 效应面法结合微遗传算法优化夏枯草的提取工艺

曲永胜¹, 解盈盈², 郭威^{1,2}, 周倩^{1,2}, 王亮^{1,2*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优化夏枯草中迷迭香酸的超声提取工艺, 确定工艺参数的最优范围。方法: 以乙醇体积分数、液固比、提取时间为考察因素, 迷迭香酸提取率为评价指标, 采用 Box-Behnken 效应面法进行试验设计并建立数学模型, 采用微遗传算法对该模型进行优化, 得到提取工艺参数最优范围。结果: 夏枯草中迷迭香酸的最佳提取工艺为超声功率 200 W, 超声频率 53 kHz, 乙醇体积分数 (50.03 ± 1.21)%, 液固比 (48.28 ± 2.27) mL·g⁻¹, 提取时间 (47.34 ± 1.43) min。迷迭香酸提取率 0.301%。结论: Box-Behnken 效应面法和微遗传算法联用时优化的迷迭香酸工艺提取率高, 能得到具有浮动范围且不影响提取率、容易在生产中实现的工艺参数, 可为中药提取工艺的研究提供参考。

[关键词] 夏枯草; 工艺参数; 最优范围; 微遗传算法; 迷迭香酸; 超声提取法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200014

Optimization of Extraction Process of *Prunellae Spica* by Box-Behnken Response Surface Methodology and Micro-genetic Algorithm

QU Yong-sheng¹, XIE Ying-ying², GUO Wei^{1,2}, ZHOU Qian^{1,2}, WANG Liang^{1,2*}

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasonic extraction process ranges of rosmarinic acid from *Prunellae Spica*. **Method:** Taking ethanol concentration, liquid-solid ratio and extraction time as factors, yield of rosmarinic acid as index, mathematical model was established by Box-Behnken response surface methodology. The model was optimized by micro-genetic algorithm in order to obtain the optimum ranges of extraction process parameters. **Result:** Optimal conditions of extraction process were as following: ultrasonic power of 200 W, ultrasonic frequency of 53 kHz, ethanol concentration of (50.03 ± 1.21)%, liquid-solid ratio of (48.28 ± 2.27) mL·g⁻¹, extraction time of (47.34 ± 1.43) min. Yield of rosmarinic acid was 0.301%. **Conclusion:** This optimized process has a high yield of rosmarinic acid, it can obtain a floated wide of process parameters.

[Key words] *Prunellae Spica*; process parameters; optimal range; micro-genetic algorithm; rosmarinic acid; ultrasonic extraction

夏枯草有清肝泻火、明目、散结消肿的功效^[1]。迷迭香酸是该药材的主要活性成分之一, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗血小板聚集等生物活性, 在食品、医药、化妆品等领域已有广泛应用^[2-3], 2015年版《中国药典》即以迷迭香酸含量作为夏枯草的

质量评价指标。目前对夏枯草提取工艺的研究较多^[4-9], 一般以总黄酮、三萜酸或迷迭香酸为指标, 采用正交设计、均匀设计或效应面法等优化提取工艺。这些方法虽然可以得到较佳的实验效果, 但对工艺条件各因素可接受的波动范围未进行考察。

[收稿日期] 20151209(008)

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(2015-167)

[第一作者] 曲永胜, 硕士, 副研究员, 从事中药分析与质量控制研究, Tel:0531-82949828, E-mail:liuqus@sina.com

[通讯作者] *王亮, 硕士, 助理研究员, 从事中药分析与质量控制研究, Tel:0531-82949856, E-mail:wliang81@gmail.com

微遗传算法是近几年新发展起来的搜索最佳实验条件的优化方法之一,通过模拟自然进化过程,使原始数据在迭代过程中产生“遗传和变异”,并从全局的角度去寻找最优实验条件,可有效避免最优实验条件选取时的主观性和局部最优解问题^[10]。本实验以迷迭香酸提取率为指标,运用 Box-Behnken 效应面法建立迷迭香酸提取率和各影响因素的数学模型。以该模型为目标函数,采用微遗传算法进行搜索,以获得具有浮动范围的迷迭香酸提取条件,有利于减低实际生产中的条件控制难度,为中药材提取工艺的研究提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱系统(美国安捷伦公司),BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司),Simplicity 型纯水仪(美国密理博公司)。夏枯草为市售中药饮片,购自济南三九大药房,经山东省中医药研究院于宗渊研究员鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* 的干燥果穗;迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111871-201203),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 迷迭香酸的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取迷迭香酸对照品适量,加甲醇制成 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取供试品粉末(过三号筛)适量,精密加入适当体积分数的乙醇溶液 10 mL,称重,超声提取,冷却至室温,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, $5 \mu\text{m}$),流动相乙腈-0.3% 磷酸溶液(20:80),检测波长 330 nm,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。理论板数按迷迭香酸计 $> 11\,000$ 。

2.1.4 线性关系考察 取对照品储备液,分别加流动相稀释成质量浓度分别为 50, 150, 250, 350, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 2\,918.3X + 107.37$ ($r = 0.9999$),线性范围 $0.50 \sim 5.00 \mu\text{g}$ 。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件连续进样 6 次,计算迷迭香酸峰面积的 RSD 0.6%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温避光放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后按 2.1.3 项下色谱条件测定,计算迷迭香酸峰面积的 RSD 1.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取供试品粉末(过三号筛)6 份,每份约 0.2 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,计算迷迭香酸含量的 RSD 1.3%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取供试品粉末(过三号筛)9 份,每份约 0.1 g,分成高、中、低 3 组,各加入一定量迷迭香酸对照品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率 98.2%,RSD 1.2%。表明该方法准确度良好。

2.2 Box-Behnken 效应面试验 通过单因素试验考察乙醇体积分数、液固比、提取时间对迷迭香酸提取率的影响,确定了各因素的取值范围。由于提取次数为非连续变量,数据处理较为困难,不能进行回归处理,结合预试验结果,暂定提取数为 1 次;超声提取时由于热效应导致提取温度控制困难,故提取时固定初始温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。取夏枯草粉末(过三号筛)17 份,固定提取溶剂用量 10 mL,根据中心组合试验设计原理,各因素设计 3 个水平,试验安排及结果见表 1。

表 1 夏枯草提取工艺的效应面试验分析

Table 1 Response surface test analysis of extraction process of *Prunellae Spica*

No.	A 乙醇体积分数/%	B 液固比/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	C 提取时间/ min	迷迭香酸提取率/%
1	20	10	30	0.168 8
2	60	10	30	0.258 2
3	20	60	30	0.228 9
4	60	60	30	0.280 8
5	20	35	10	0.208 4
6	60	35	10	0.250 1
7	20	35	50	0.222 6
8	60	35	50	0.294 6
9	40	10	10	0.234 5
10	40	60	10	0.262 4
11	40	10	50	0.237 0
12	40	60	50	0.292 9
13	40	35	30	0.286 3
14	40	35	30	0.283 8
15	40	35	30	0.283 1
16	40	35	30	0.290 0
17	40	35	30	0.298 4

对表 1 中数据采用 Design Expert 8.0 软件进行效应面分析,建议用二阶多项式回归较优,以迷迭香酸提取率为效应值,所建模型的方差分析见表 2。得回归方程 $Y = -9\,500 + 8\,370A + 3\,480B + 969C - 18.7AB + 19AC + 14BC - 83.7A^2 - 33.1B^2 - 27.4C^2$ 。

表 2 回归模型方差分析

Table 2 ANOVA of regression model

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.021 0	9	2.34×10^{-3}	49.21	<0.000 1
A	8.12×10^{-3}	1	8.12×10^{-3}	170.60	<0.000 1
B	3.47×10^{-3}	1	3.47×10^{-3}	72.86	<0.000 1
C	1.05×10^{-3}	1	1.05×10^{-3}	22.02	0.002 2
AB	3.50×10^{-4}	1	3.50×10^{-4}	7.34	0.030 2
AC	2.31×10^{-4}	1	2.31×10^{-4}	4.84	0.063 6
BC	1.95×10^{-4}	1	1.95×10^{-4}	4.10	0.082 5
A ²	4.72×10^{-3}	1	4.72×10^{-3}	99.06	<0.000 1
B ²	1.80×10^{-3}	1	1.80×10^{-3}	37.82	0.000 5
C ²	5.06×10^{-4}	1	5.06×10^{-4}	10.63	0.013 9
残差	3.33×10^{-4}	7	4.76×10^{-5}		
失拟项	1.78×10^{-4}	3	5.94×10^{-5}	1.53	0.336 3
纯误差	1.55×10^{-4}	4	3.88×10^{-5}		
总误差	0.021 4	16			

由表 2 可知,建立的模型极显著,具有统计学意义。模型中自变量 A, B, C, A², B² 极显著, AB, C² 显著,其他项不显著。复相关系数 R² = 0.984 4,说明模型拟合较好,校正决定系数 0.964 4 和变异系数 2.68%,表明此模型能解释 96.44% 效应值变化,整体误差较小。失拟检验不显著说明试验误差较小。根据二次多项式模型,应用 Design Expert 8.0 软件绘制三维效应曲面及等高线图,见图 1。由回归模型进行预测分析,迷迭香酸提取率的预测值 0.306 85%,效应面法预测的最优提取条件为乙醇体积分数 49.98%,液固比 48.42 mL·g⁻¹,提取时间 47.35 min。

2.3 微遗传算法搜索迷迭香酸提取最佳工艺 以迷迭香酸提取率的 Box-Behnken 效应面二次回归模型为目标函数,参考效应面预测的最佳提取工艺,设定自变量搜索边界为乙醇体积分数 40% ~ 60%,液固比 40 ~ 60 mL·g⁻¹,提取时间 40 ~ 50 min。使用 Matlab 2012a 外挂 SGALAB 1003 Beta 5.0.0.8 遗传算法工具箱,应用微遗传算法搜索最优提取条件,初始种群大小为 100,单点交叉概率 0.80,单点变异概率 0.01,进化 100 代,随机搜索 10 次,结果见表 3,所得历代适应度曲线见图 2。

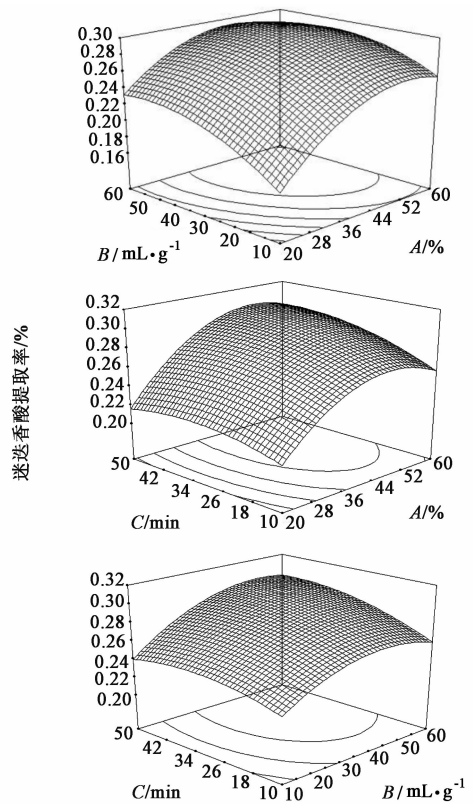


图 1 乙醇体积分数、液固比及提取时间对迷迭香酸提取率影响的效应面和等高线

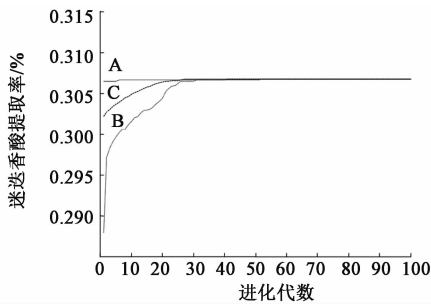
Fig. 1 Response surfaces and contour plots for effect of factors on yield of rosmarinic acid

表 3 微遗传算法搜索的迷迭香酸最优提取条件

Table 3 Optimum extraction conditions of rosmarinic acid by micro-genetic algorithm

No.	乙醇体积分数/%	液固比/mL·g ⁻¹	提取时间/min	迷迭香酸提取率预测值/%
1	50.20	46.68	47.99	0.306 7
2	50.79	45.83	45.17	0.306 5
3	48.35	47.89	47.29	0.306 6
4	51.24	48.90	48.20	0.306 7
5	50.13	50.55	48.77	0.306 7
6	49.14	47.19	45.90	0.306 7
7	50.21	48.83	47.50	0.306 8
8	50.61	48.24	48.36	0.306 8
9	50.44	48.53	47.09	0.306 8
10	49.16	50.16	47.11	0.306 7

由图 2 可知,在进化约 40 代后,迷迭香酸提取率的最大、最小、平均适应度都基本稳定在 0.306% 的水平,搜索效果较好。对表 3 的搜索结果进行统计学分析,见表 4。结果发现 10 次随机搜索结果



A. 最大值;B. 平均值;C. 最小值

图 2 迷迭香酸提取率历代适应度曲线

Fig. 2 Fitness curves of yield of rosmarinic acid in past dynasties

中,3 个因素的变异范围较小,迷迭香酸提取率的 95% 置信区间的精度较高,说明搜索对目标函数值的逼近程度较好。最优提取条件可选择 10 次随机搜索的平均水平。

表 4 迷迭香酸随机搜索结果的平均水平

Table 4 Average levels from random search results of rosmarinic acid

指标	数值	95% 置信区间	
		下限	上限
乙醇体积分数/%	50.03 ± 1.21	49.36	50.69
液固比/mL·g ⁻¹	48.28 ± 2.27	47.17	49.39
提取时间/min	47.34 ± 1.43	46.50	48.18
迷迭香酸提取率/%	0.306 7 ± 0.000 1	0.306 6	0.306 8

2.4 提取工艺的对比验证 按照 Box-Behnken 效应面优化的提取条件和微遗传算法搜索的 10 次最优结果的平均条件进行提取。精密称取供试品粉末(过三号筛)0.3 g,每个条件平行提取 3 次,结果迷迭香酸提取率分别为 0.300%,0.301%,无显著差别。2 种方法实际值与预测值的相对误差均较小,说明 2 种数据处理方法均可以较好地 对迷迭香酸的提取率进行寻优。相对于 Box-Behnken 效应面法得到的工艺参数,微遗传算法搜索得到的工艺参数可在一定范围内波动,且不影响提取率,在生产实际中更易于实现。

3 讨论

效应面法可减少实验时间、降低成本、提高实验效率,但各因素的波动对效应值的影响不明确,因此 在实际应用中,为达到较高的效应值,需要对各因素

进行尽量精确的控制,增加了工艺控制的难度。而使用遗传算法搜索得到的最优工艺参数可在一定范围内波动,且不影响提取率,在生产实际中更易于实现。因此,采用效应面法建立数学模型后,使用遗传算法搜索各因素最优范围,将这 2 种方法联合使用,可取长补短,得到较好的结果,对实际应用具有一定参考意义。目前,效应面结合微遗传算法应用较少^[10],本实验选择夏枯草为研究对象,以乙醇体积分数、液固比、提取时间为考察因素,采用 Box-Behnken 效应面法建立了迷迭香酸提取率的数学模型,以该模型为目标函数,应用微遗传算法搜索了最优提取条件,可用于解决中药提取工艺优化中的实际问题。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:280.

[2] 周丹,刘艾林,杜冠华. 迷迭香酸的药理学研究进展[C]. 大连:中国医院药学论坛,2011.

[3] 夏伯候,刘菊妍,李春,等. 夏枯草水提液及水提醇沉上清液降血压药效评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):113-116.

[4] 何力,张国文,杨佳,等. 响应曲面法优化超声提取夏枯草中黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技,2010,31(9):259-261,264.

[5] 刘秀梅,孙秀荣. 正交试验法优选夏枯草提取工艺[J]. 中国现代药物应用,2009,3(8):149-150.

[6] 王启斌,朱海涛,陈黎. 超声波提取夏枯草总黄酮效果研究[J]. 医药导报,2012,31(8):1067-1069.

[7] 陈富超,李鹏,方宝霞,等. 正交实验优选白毛夏枯草中木犀草素的提取工艺[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(6):498-499.

[8] 郭淑英,夏彬彬,冯波. 均匀设计优选夏枯草的超声波提取工艺研究[J]. 吉林医药学院学报,2010,31(6):319-320,324.

[9] 朱鹤云,彭秀玲,冯波. 正交试验优选夏枯草中迷迭香酸超声波提取工艺[J]. 吉林医药学院学报,2011,32(1):11-14.

[10] 杨晓文,韩荣荣,徐彦杰,等. 基于微遗传算法的多目标 Box-Behnken 设计试验条件优化分析[J]. 中国卫生统计,2012,29(3):337-340.

[责任编辑 刘德文]