

正交试验和 BP 人工神经网络模型优化胰蛋白酶提取 鱼腥草多糖的工艺

邵方元¹, 付腾飞², 薛兴阳³, 周苏娟⁴, 陈宏远^{1*}, 孟江^{2*}, 王颖芳²

- (1. 广东药学院, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州 510006;
2. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 3. 广州医学院附属肿瘤医院, 广州 510009;
4. 广东药学院医药信息工程学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 正交试验和 BP 神经网络模型优选胰蛋白酶法提取鱼腥草多糖的工艺条件。方法: 以多糖得率及其含量为指标, 结合正交试验和人工神经网络方法, 考察加酶量、温度、时间对提取工艺条件的影响。结果: BP 神经网络模型优化工艺为加胰蛋白酶量 2.5%, 于 45 °C 温浸 2.4 h; 正交试验优选的工艺条件为加胰蛋白酶量 2%, 于 45 °C 温浸时间 2.5 h; 前者的综合评分略高于后者。结论: BP 神经网络模型法优选的提取工艺耗时短、耗能低, 在实际应用中具有较好成效。

[关键词] 鱼腥草多糖; 胰蛋白酶法提取; 正交试验; BP 神经网络

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)11-0014-04

[doi] 10.11653/syjf2013110014

Optimization of Trypsin Extraction Technology of Polysaccharides from *Houttuynia cordata* by Orthogonal Test and BP Artificial Neural Network Model

SHAO Fang-yuan¹, FU Teng-fei², XUE Xing-yang³, ZHOU Su-juan⁴,
CHEN Hong-yuan^{1*}, MENG Jiang^{2*}, WANG Ying-fang²

- (1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
3. Guangzhou Medical University Cancer Institute and Hospital, Guangzhou 510009, China;
4. College of Medical Information Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize trypsin extraction technology of polysaccharides from *Houttuynia cordata* by BP-neural network model and orthogonal test. **Method:** With yield and content of polysaccharides as indexes, effect of the dosage of trypsin, time and temperature on extraction technology by orthogonal test and artificial neural network. **Result:** Optimum extraction technology of orthogonal test was as following: the dosage of trypsin 2%, soaked 2.5 h at 45 °C; Optimum extraction technology of BP neural network model was as following: the dosage of trypsin 2.5%, soaked 2.4 h at 45 °C, which was higher than orthogonal design in comprehensive score. **Conclusion:** Optimized extraction technology of BP neural network model had good results in practical

[收稿日期] 20121209(007)

[基金项目] 广州市卫生局中医药科研课题(2010A32)

[第一作者] 邵方元, 在读硕士, 从事抗肿瘤分子靶向药物研究, Tel:13560215798, E-mail: shaogz2011@sina.com

[通讯作者] * 陈宏远, 博士, 副教授, 从事免疫药理学相关研究, Tel:020-39352187, E-mail: hychen1208@126.com; 孟江, 博士, 教授, 从事中药炮制及饮片质量标准化研究, Tel:020-39352169, E-mail: jiangmeng666@126.com

applications for short time and low energy consuming.

[**Key words**] polysaccharides from *Houttuynia cordata*; trypsin extraction; orthogonal test; BP neural network

鲜鱼腥草具有清热解毒、消肿排脓、利尿通淋的功效^[1],其化学成分主要包括黄酮类、酚类、挥发油、多糖等^[2]。药理研究发现,鱼腥草水溶性多糖对羟自由基和超氧自由基有较明显的清除作用^[3]。目前鱼腥草多糖的提取多采用碱法、酸法、超声提取法^[4-6]。酶解法提取多糖具有条件温和、耗时短、效率高等优点^[7],因此,本实验采用正交试验和BP神经网络优化胰蛋白酶提取鱼腥草多糖的工艺条件,以正交试验的数据为样本,建立提取工艺的BP神经网络模型,用神经网络模型预测最佳提取工艺,并比较正交试验优化条件和BP神经网络模型预测工艺条件,为鱼腥草多糖的提取提供参考。

1 材料

UV1800型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),JYT-10型电子天平(上海医用激光仪器厂),GZX-9240MBE型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),AY120型电子天平(日本岛津公司)。

葡萄糖对照品(Sigma公司,批号100485),胰蛋白酶(250 NFU·mg⁻¹,广州市齐云生物,批号090846),试剂均为分析纯。苯酚试液参照文献^[7]配制。

鱼腥草购于广州清平市场,经广东药学院中药鉴定教研室程轩轩博士讲师鉴定为三白草科蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草。

2 方法与结果

2.1 鱼腥草粗多糖的提取 称取鱼腥草药材50 g,提取,提取液浓缩至1:4,醇沉至乙醇体积分数80%,静置>2 h,抽滤,取沉淀,置于50℃烘箱中烘干,即得。

2.2 鱼腥草多糖含量测定 精密称取105℃干燥至恒重的葡萄糖0.098 g,加水溶解并定容至100 mL,得葡萄糖对照品贮备液。精密量取该贮备液0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,分别置10 mL具塞试管中,加水补充至1.0 mL,摇匀,精密加5%苯酚溶液1 mL,浓硫酸5 mL,室温放置40 min。另取水1 mL,加同量苯酚和浓硫酸,同法操作,作为空白对照。于490 nm测定吸收度(A),以A为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 8.429X - 0.0258 (r = 0.9959)$ 。精密称取于50℃

烘干至衡重的粗多糖0.10 g,加水溶解并定容至50 mL,摇匀,精密量取1 mL定容至10 mL量瓶中,摇匀,同上法测定A,计算多糖含量及其得率。

2.3 正交试验优选^[8] 在单因素试验基础上,确定pH 7,选取加酶量、温度、时间为考察因素,按L₉(3⁴)正交表进行提取,以多糖得率及含量的综合评分为指标,权重系数分别为0.4,0.6,确定最佳工艺(n=5),因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 鱼腥草多糖的胰蛋白酶法提取工艺正交试验因素水平

水平	A 温度/℃	B 加酶量/%	C 时间/h
1	45	2.0	1.5
2	55	3.0	2.5
3	65	4.0	3.5

表2 鱼腥草多糖的胰蛋白酶法提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	多糖 得率 /%	多糖 含量 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	5.56	24.53	76.10
2	1	2	2	2	7.98	20.31	72.80
3	1	3	3	3	9.00	18.60	71.56
4	2	1	2	3	8.55	18.30	69.54
5	2	2	3	1	7.36	14.34	56.41
6	2	3	1	2	6.80	14.49	55.15
7	3	1	3	2	12.18	15.11	62.25
8	3	2	1	3	11.03	12.16	61.70
9	3	3	2	1	13.81	10.43	65.51
K ₁	220.47	217.90	192.95	198.02			
K ₂	181.10	190.91	207.86	200.21			
K ₃	199.46	192.22	200.22	202.80			
R	39.37	26.99	14.91	4.78			

由直观分析可知,胰蛋白酶提取鱼腥草多糖的影响因素大小顺序依次为温度>加酶量>时间;方差分析表明因素A,B各水平间具有显著性差异,是胰蛋白酶法提取鱼腥草多糖的主要影响因素,C因素则无显著性影响。得最佳提取条件为A₁B₁C₂,即加胰蛋白酶量2%,于45℃温浸2.5 h。

2.4 BP神经网络的建立与运用 神经网络模型

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	258.68	2	129.34	67.72	<0.05
B	154.40	2	77.20	40.42	<0.05
C	37.04	2	18.52	9.70	>0.05
D(误差)	3.82	2	1.91		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

是由生物学中大脑和神经系统的启示而建立的一种信息处理的计算模型。由接受信息的输入层、输出信息的输出层及中间隐含层构成。后传递神经网络模型(BP)具有逼近能力强、训练算法简单明确、计算量小、并行性强等优点,是现在最常用的网络计算方法之一^[9]。

2.4.1 BP 神经网络的设计

2.4.1.1 输入层节点的确定 影响鱼腥草多糖提取效率的主要有温度、加酶量和时间 3 个因素,以此来建立优选的 BP 神经网络模型,确定为 3 个输入层节点。

2.4.1.2 输出层节点的确定 输出层节点的设置由预测指标来确定,此网络以综合评分为评价指标,确定为 1 个输出层节点。

2.4.1.3 隐含层节点数的确定 隐含层节点数的确定无明确方法,此处由经验公式 $n_1 = \text{sqr}(n + m) + a$ 计算,其中 n_1 为隐含层节点数, m 为输出神经元数, n 为输入神经元数, a 为 1~10 中常数,以此来确定隐含层神经元个数。通过对不同神经元数的网络进行训练对比,发现当网络的隐含层节点数为 4 时,网络具有足够的泛化能力和输出精度,且网络的训练步数较少,因此确定网络的隐含层节点数为 4。

2.4.1.4 传递函数 网络隐含层传递函数 Tansig,输出层神经元的传递函数 Logsig。建立的 BP 神经网络如图 1。

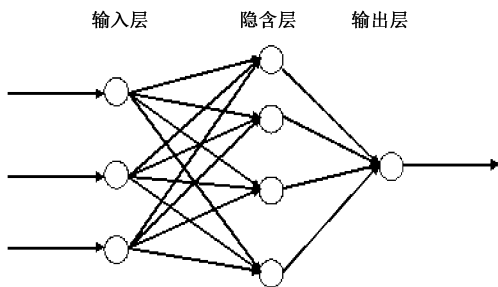


图 1 BP 神经网络模型

2.4.2 BP 神经网络的运用 采用上述确定的 BP 网络结构,用 MATLAB 语言编程,构建网络并训练。

训练前对训练样本做归一化处理,使得输入向量的值量化至 0~1,以便于更好地利用 MATLAB 神经网络工具箱中训练函数,样本数据利用公式 $X_n = (X - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$,其中 X, X_n 分别为归一化前后的数据, X_{max}, X_{min} 分别为样本数据中最大值和最小值。训练结束后再将输出还原成原单位。训练时目标误差平方和(SSE)取 0.000 1,最大训练迭代次数 1 000 次,采用自适应学习速率,采用 trainlm 函数进行训练,训练后的网络收敛于目标误差 0.000 1,满足精度要求。

2.4.3 主要因素的仿真和优化 在正交试验基础上,改变 1 种影响因素值,保持其他 3 种影响因素值不变,应用所建立的神经网络模型进行模拟,得不同因素对鱼腥草多糖提取综合评分的影响曲线。

结果随提取温度的增加(45,50,55,60,65 ℃),鱼腥草多糖提取的综合评分逐渐下降(76.35,73.29,71.31,65.26,63.51),可能与胰蛋白酶的最适温度有关,当提取温度>最适温度后,酶的催化效率逐步降低,故选取酶解温度 45 ℃;当加酶量逐步增加时(2%,2.5%,3%,3.5%,4%),其对综合评分的影响有少许增加,之后下降(76.35,76.49,72.80,72.24,71.83),下降的原因可能是当酶添加量增加时,与多糖相结合的蛋白被水解脱去的量相应增多,不可避免地伴随多糖的损失,从而最终多糖含量和得率降低;当酶添加量约 2.5%时,综合评分最高;随酶解时间的推移(1.5,2,2.5,3,3.5 h),其综合评分先升后降(75.28,76.27,76.35,75.44,75.31),下降可能是由于有些多糖随酶解时间增加后发生转化损失,故选取酶解时间约 2.4 h。因此,确定鱼腥草多糖的最佳提取工艺条件为加胰蛋白酶量 2.5%,于 45 ℃温浸 2.4 h。

2.5 验证试验 按以上优选的提取工艺各进行 3 次验证试验,结果应用 BP 神经网络预测工艺的综合评分 76.51,按正交试验所得工艺的综合评分 76.35,说明应用神经网络模型预测得到的优化工艺略优于正交试验,且能耗更低。

3 讨论

通过对正交试验结果进行建模和分析,可充分挖掘试验信息,变离散数据为连续数据,以进行仿真、评估和优化,并能对各主要因素的变化进行敏感性仿真分析,模拟各因素的变化规律,获得多因素连续区域中的最优组合,同时也为分析各因素的变化规律和因素间的交互作用提供定量化的分析方法,说明将人工神经网络和正交试验相结合以优选提取

联合色谱法和 UV 评价中药制剂体外溶出度

张玉军^{1*}, 麦意梅², 莫志江³

- (1. 广西壮族自治区药品和医疗器械集中采购服务中心, 南宁 530021;
2. 广州市药检所二分所, 广州 5102501;
3. 广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨联合色谱法和 UV 用于评价中药制剂体外溶出度的可行性。方法: 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCL 为释放介质, 小柴胡片为研究对象, 按《中国药典》2005 年版测定该制剂的体外溶出度, 采用 UV 测定释放液在 272 nm 处吸收度, 通过 HPLC 测定黄芩苷含量。释放液的 UV 吸收成分被分解为特定成分(黄芩苷)和非特定成分(除黄芩苷外的成分)两部分。结果: HPLC 可反映特定成分黄芩苷的溶出度; 通过扣除释放液中黄芩苷的 UV 吸收值, UV 可用于描述非特定成分的溶出度。结论: 联合色谱法和 UV 可较好地评价中药制剂的体外溶出度。

[关键词] 小柴胡片; 体外溶出度; 测定; 评价

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0017-05

[doi] 10.11653/syfy2013110017

Investigation of Determination and Evaluation for *in vitro* Dissolution of Chinese Medicine Preparations by Co-Chromatography and UV

ZHANG Yu-jun^{1*}, MAI Yi-mei², MO Zhi-jiang³

- (1. Medicines and Medical Equipment Centralized Purchasing Service Center of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China;
2. No. 2 of Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510251, China;
3. The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[收稿日期] 20121205(011)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅课题(桂卫 Z2010256)

[通讯作者] * 张玉军, 副主任中药师, 在职硕士研究生, 从事中药药物研究, Tel: 0771-2801500, E-mail: Zhangyj20@126.com

工艺条件的方法是可行的。该方法既不需要增加试验次数, 又能定量分析因素变化规律和寻找最佳参数组合, 为其他中药有效成分的提取工艺提供了一个新思路。

[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: 化学工业出版社, 2005: 155.
- [2] 李爽, 于庆海, 金佩珂. 鱼腥草的有效成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(2): 144.
- [3] 张建新. 微波提取鱼腥草水溶性多糖清除自由基特性的研究[J]. 食品科技, 2006, 31(8): 115.

- [4] 孟江, 周毅生, 廖华卫. 超声波提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 17.
- [5] 嵇文亚, 孟江. 碱法提取鱼腥草多糖的工艺研究[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(1): 44.
- [6] 嵇文亚, 孟江, 徐玉茵. 酸法提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 河南中医学报, 2008, 23(3): 22.
- [7] 黄秀香, 赖红芳, 罗丽程. 超声波协同复合酶法提取半边莲多糖工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 44.
- [8] 展学孔, 周海妹, 马小花, 等. 海参多糖提取新工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 40.
- [9] 闻新, 周露, 王丹力, 等. MATLAB 在神经网络中的设计与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 207.

[责任编辑 全燕]