

BP 神经网络结合熵权法优化甘草皂苷提取工艺

朱紫烨, 田彦芳, 张 迁, 虞 立, 何 昱*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 通过 BP 神经网络结合熵权法, 优化甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 皂苷提取工艺。方法 以甘草皂苷 G_2 、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积为评价指标, 乙醇体积分数、料液比、提取时间为影响因素, 正交试验优化提取工艺。在 R 语言环境下用熵权法计算 3 种皂苷综合指标, 再建立 BP 神经网络系统分析数据。结果 最佳条件为乙醇体积分数 75%, 料液比 1:12, 提取时间 1.6 h, 测得值 351.844, 与预测值 (346.452) 接近。结论 该方法准确有效, 可用于优化甘草皂苷提取工艺。

关键词: 甘草; 皂苷; 提取; BP 神经网络; 熵权法; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)09-1830-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.013

Extraction optimization for saponins from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by BP neural network combined with entropy method

ZHU Zi-ye, TIAN Yan-fang, ZHANG Qian, YU Li, HE Yu*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

KEY WORDS: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; saponins; extraction; BP neural network; entropy method; orthogonal test

甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效^[1]。甘草皂苷是其重要的生理活性成分, 具有抗炎、抗病毒、抗菌、保肝降酶、免疫调节效应等众多作用^[2-3], 但目前对其提取工艺的研究进展缓慢, 基本停留在单一成分 (甘草酸等) 或总皂苷的层面^[4-5], 而鲜有对多种皂苷同时测定、综合考虑优化提取工艺的报道。目前, 大多采用正交试验设计, 通过直观分析及方差分析来选择最优提取工艺^[6-7]。本实验选择甘草中最主要的 3 种甘草皂苷类成分^[8-9], 即甘草皂苷 G_2 、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B, 以峰面积为指标, 通过正交试验设计, 在 R 语言环境下用熵权法计算其综合评

价指标, 再利用 BP 神经网络算法分析数据, 优化该类成分提取工艺。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent Technologies 公司); Qtrap 4500 质谱仪 (美国 ABSCIEX 公司); HH-6A 数显恒温水浴锅 (金坛市金分仪器有限公司); KQ-250E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AL104 电子天平 (万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试药 甘草 (批号 150319) 由浙江中医药大学名中医馆提供, 经浙江中医药大学药学院陈锡林教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎; 甘草酸对照品 (批号 20120910, 含有量 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司)。乙腈、甲醇为色谱纯 (美国 Tedia 公司);

收稿日期: 2016-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81573868); 浙江省自然科学基金项目 (LR13H270001); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目 (2014)

作者简介: 朱紫烨 (1995—), 女, 从事中药学研究。Tel: 18158518286, E-mail: 2335277519@qq.com

*通信作者: 何 昱, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分分析、质量评价及新药开发研究。Tel: (0571) 61768145, E-mail: heyu0923@sina.com

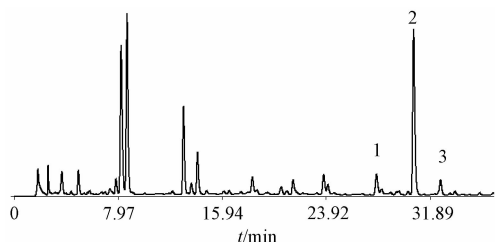
水为 Millipore 超纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)；流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 15% ~ 25% B；10 ~ 17 min, 25% ~ 30% B；17 ~ 25 min, 30% ~ 35% B；25 ~ 45 min, 35% ~ 60% B；45 ~ 55 min, 60% ~ 90% B)；检测波长 0 ~ 10 min, 276 nm；10 ~ 25 min, 360 nm；25 ~ 55 min, 252 nm；体积流量 0.8 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液制备 精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 1.5 h，过滤，合并提取液，定容至 250 mL，即得。

2.3 甘草皂苷鉴定 通过与文献 [7] 中的色谱峰保留时间以及质谱碎片离子质荷比对照，可以确定供试品溶液 HPLC 色谱图中除了标示的 3 种成分外，其他明显可见的色谱峰基本为黄酮类成分。因此，本实验选择甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 来代表该类成分进行提取工艺优化，结果见图 1。



1. 甘草皂苷 G₂ 2. 甘草酸 3. 乌拉尔甘草皂苷 B
1. licoricesaponin G₂ 2. glycyrrhizin 3. uralsaponin B

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4 甘草皂苷峰面积测定

2.4.1 指标确定 由于甘草中皂苷类成分的 HPLC 色谱峰峰面积与质量浓度成正比，故本实验以峰面积代替质量浓度，以其为指标优化提取工艺。

2.4.2 精密度试验 取“2.2”项下供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次，测得甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积 RSD 分别为 0.11%、0.99%、2.40%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，测得甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉

尔甘草皂苷 B 峰面积 RSD 分别为 1.93%、1.54%、2.53%，表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液，于 0、2、4、6、10、12 h 进样，测得甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积 RSD 分别为 1.67%、1.51%、2.25%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5 单因素试验

2.5.1 综合评价指标 在 R 语言环境下编写程序，采用熵权法计算甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 的权重，三者权重系数分别为 a、b、c，综合评价指标 = a × 甘草皂苷 G₂ 峰面积 + b × 甘草酸峰面积 + c × 乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积。

2.5.2 提取方法 根据文献 [10]，选择较常用的水煎煮法、乙醇回流提取法、氨性乙醇回流提取法和超声法进行考察。精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，用 10 倍量水、60% 乙醇、含 0.3% 氨水的 60% 乙醇、60% 乙醇提取 2 次，每次 1.5 h，提取液过滤，合并，定容至 250 mL，按“2.1”项下方法测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积，并计算综合指标。结果，三者权重系数分别为 0.075、0.243、0.682，则各方法的综合指标分别为 217.103、347.007、346.804、327.501，即乙醇回流提取法的综合指标最高。

2.5.3 乙醇体积分数 精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 10 倍量 20%、40%、60%、80% 乙醇及无水乙醇，回流提取 2 次，每次 1.5 h，过滤，合并提取液，定容至 250 mL，按“2.1”项下方法测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积，并计算综合指标。结果，三者权重系数分别为 0.278、0.230、0.492，则各体积分数乙醇的综合指标分别为 281.137、320.970、333.864、297.673、271.567，即 60% 乙醇的综合指标最高。

2.5.4 料液比 精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入料液比 1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12、1 : 14 的 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 1.5 h，过滤，合并提取液，定容至 250 mL，按“2.1”项下方法测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积，并计算综合指标。结果，三者权重系数分别为 0.171、0.161、0.668，则各料液比综合指标分别为 233.777、245.547、263.599、258.685、259.085，即料液比 1 : 10 的

综合指标最高。

2.5.5 提取时间 精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h，过滤，合并提取液，定容至 250 mL，按“2.1”项下方法测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积，并计算综合指标。结果，三者权重系数分别为 0.245、0.233、0.522，则各提取时间的综合指标分别为 325.129、328.731、343.620、336.602、311.803，即提取时间 1.5 h 的综合指标最高。

2.5.6 提取次数 精密称取甘草粗粉 2 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 10 倍量 60% 乙醇回流提取，提取次数分别为 1、2、3、4 次，每次 1.5 h，过滤，合并提取液，定容至 250 mL，按“2.1”项下方法测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积，并计算综合指标。结果，三者权重系数分别为 0.197、0.135、0.668，则各提取次数

的综合指标分别为 208.790、247.455、247.638、247.864，由于提取 3、4 次的结果较 2 次无明显增加，从环保、经济、效率角度考虑，提取次数选择 2 次。

2.6 正交试验设计 在单因素试验基础上，选择乙醇体积分数（A）、料液比（B）、提取时间（C）作为影响因素，设计 3 因素 3 水平 L₉(3⁴) 的正交试验，3 种甘草皂苷的权重系数分别为 0.234、0.255、0.511，因素水平见表 1，正交试验与结果见表 2。

表 1 因素水平
Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 料液比	C 提取时间/h
1	40	1 : 8	1.0
2	60	1 : 10	1.5
3	80	1 : 12	2.0

表 2 试验设计与结果 (n=3)
Tab. 2 Design and results of tests (n=3)

编号	因素			峰面积			综合指标
	A	B	C	甘草皂苷 G ₂	甘草酸	乌拉尔甘草皂苷 B	
1	1	1	1	122.20	878.45	89.20	298.045
2	1	2	2	130.13	935.60	87.23	313.461
3	1	3	3	137.67	988.87	98.57	334.590
4	2	1	2	127.73	949.83	94.13	320.051
5	2	2	3	135.17	1 001.10	101.77	338.756
6	2	3	1	134.70	1 012.17	102.30	341.739
7	3	1	3	118.05	873.00	85.25	293.666
8	3	2	1	125.90	947.00	99.50	321.642
9	3	3	2	138.00	1 016.30	107.95	346.402

2.7 BP 神经网络模型建立及优化

2.7.1 可靠性验证试验 建立输入层为 3、隐藏层为 7、输出层为 1 的 3 层结构 BP 神经网络系统，其中输入节点为 3 个，即乙醇体积分数、料液比、提取时间；输出节点为 1 个，即综合指标。为确定 BP 神经网络系统的稳定性，将 9 组数据分别用留一法交叉验证进行训练，即将 9 组实验中的 8 组作为训练组，1 组作为测试组进行训练。参数设定如下：学习速率为 10⁻²，均方误差为 6.5 × 10⁻⁵，最大迭代次数为 500 次，每 5 次显示 1 次结果，其余参数设定为默认值。结果，9 组数据的预测误差分别为 1.933、1.438、0.652、1.490、1.273、0.847、1.166、0.333、0.370，平均 1.056，具有显著性意义，故 BP 神经网络系统具有稳定性。再将 9 组实验数据同时作为训练数据和测试数据，将测试结果与实际数据进行比较，来验证 BP 神经网络

的可靠性，结果见图 2，可知其具有良好的可靠性。

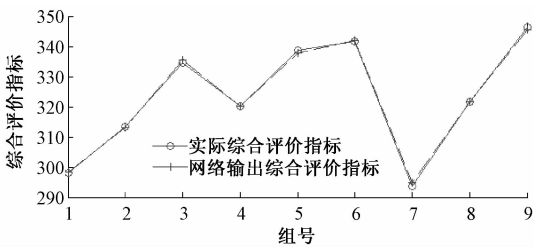


图 2 BP 神经网络可靠性验证试验结果
Fig. 2 Results of verification tests for BP neural network reliability

2.7.2 BP 神经网络预测 在“2.7.1”项条件和参数下，将 9 组实验数据作为训练组进行训练，得到网络参数，在此基础上输入新的条件，即乙醇体积分数 40% ~ 80%（步长为 5），料液比 1 : 8 ~

1:12 (步长为 1), 提取时间 1~2 h (步长为 0.2), 可得到 270 个条件的综合指标, 从中筛选出最优工艺, 具体见表 3。由表可知, 最优工艺为乙醇体积分数 75%, 料液比 1:12, 提取时间 1.6 h, 综合指标 346.452。

表 3 BP 神经网络预测结果

Tab. 3 Results of BP neural network prediction				
编号	乙醇/%	料液比	提取时间/h	综合指标
1	40	1:8	1.0	298.061
2	40	1:8	1.2	308.032
3	40	1:8	1.4	294.260
4	40	1:8	1.6	293.672
5	40	1:8	1.8	293.680
...	...	...	...	...
236	75	1:12	1.2	343.500
237	75	1:12	1.4	346.449
238	75	1:12	1.6	346.452
239	75	1:12	1.8	346.451
240	75	1:12	2.0	346.428
...	...	...	...	...
266	80	1:12	1.2	342.711
267	80	1:12	1.4	346.436
268	80	1:12	1.6	346.451
269	80	1:12	1.8	346.451
270	80	1:12	2.0	346.450

2.8 验证试验 精密称取甘草粗粉 2 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 按上述最优工艺条件回流提取 2 次, 过滤, 合并提取液, 定容至 250 mL, 测定甘草皂苷 G₂、甘草酸、乌拉尔甘草皂苷 B 峰面积, 并计算综合指标。结果见表 4。由表可知, 在最优工艺条件下的平均综合指标为 351.844, 与预测值 346.452 接近, 表明该方法可靠有效。

表 4 验证试验结果 (n=3)

Tab. 4 Results of verification tests (n=3)				
编号	峰面积			综合指标
	甘草皂苷 G ₂	甘草酸	乌拉尔甘草皂苷 B	
1	142.90	1 076.10	110.50	352.206
2	143.50	1 072.10	114.00	353.800
3	143.20	1 055.90	113.70	349.526
平均值	143.20	1 068.03	112.73	351.844

3 讨论

3.1 甘草皂苷提取工艺 甘草中甘草皂苷的提取方法有水煎煮法、乙醇回流提取法、氨性乙醇回流提取法、超声辅助提取法等, 其中水煎煮法操作简单, 但提取时间长、用水量大、能耗大、杂质多; 乙醇回流提取法提取时间较低、提取剂用量较少、

能耗较低、杂质较少, 具有工业实用价值; 氨性乙醇回流提取法杂质少于水煎煮法及乙醇回流提取法; 超声波辅助提取法提取率高、提取速度快、操作简便^[10]; 目前, 也有学者使用复合酶提取法^[11]、过热水提取法^[12]等新技术提取甘草皂苷, 不同提取方法各有利弊。本实验根据综合指标测定结果, 最终选用乙醇回流提取法。

3.2 指标可行性 因为甘草提取液中成分比较复杂, 图 1 中甘草皂苷 G₂ 的色谱峰虽未能获得基线分离, 但可采用垂直分割的积分模式。从“2.4”项下结果来看, 其峰面积重复性良好, 可反映各成分在甘草提取液中的含有量。

3.3 熵权法 本实验用多目标优化甘草皂苷提取工艺, 比单目标优化更为全面、准确、有效, 同时也符合中药多成分、多作用的特点。由于考察指标从单个增加为多个, 故如何有效建立指标之间的关系显得十分重要。文献 [13] 报道, 研究人员大多是人为给予权重, 这使得实验结果较为主观, 具有一定随机性和不合理性, 故本实验以熵权法赋予各指标权重, 避免了人为因素对实验的干扰, 使结果较客观可靠, 该方法是依据各指标的变异程度, 利用信息熵计算各指标的熵权, 再通过其修正各指标的权重, 从而获得较客观的权重系数, 它有着客观性和适应性, 赋予的权重具有客观、真实、有效的特点^[14]。

3.4 R 语言 R 语言是一款具有非常强大的统计分析及作图能力的开源软件系统语言, 其操作简单、分析能力突出、运算能力高、作图功能强。目前, 研究者大多用 Matlab 等软件对数据进行分析^[15], 而鲜有用 R 语言建立 BP 神经网络对提取工艺进行优化的报道, 更尚未将其应用于甘草皂苷类成分。本实验运用 R 语言建立 BP 神经网络, 希望对中药多成分提取工艺的研究有所突破。

3.5 BP 神经网络 BP 神经网络是一种模拟人脑组织结构及其运转机制的智能系统, 有自组织、自适应和自学习的能力及良好的函数逼近能力, 特别适用于研究复杂的非线性关系, 为解决复杂问题提供了简单有效的方法^[16]。它有着良好的拟合与预测能力, 能寻找一定范围内的最优值, 相比正交试验和响应面等有限的条件, 其能通过自主学习寻找到大范围内的最优提取工艺条件, 使得实验操作次数减少, 条件更精准。因此, 本实验建立该方法寻找最优的甘草皂苷提取工艺条件, 可使结果更加有效准确。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 86-87.

[2] 王 兵, 王亚新, 赵红燕, 等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.

[3] 李海华, 青 梅, 于 娟, 等. 甘草的研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(2): 199-204.

[4] 徐建军, 马清河, 李海齐, 等. 甘草酸提取工艺研究[J]. 新疆中医药, 2013, 31(1): 40-43.

[5] 朱中佳, 熊富良, 张雪琼, 等. 甘草总皂苷的提取纯化工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(2): 341-343.

[6] 黄明进, 王文全, 沈寿茂. 甘草总黄酮和总皂苷成分的提取工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药, 2010, 12(4): 24-27.

[7] 田彦芳, 万海同, 朱紫烨, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1118-1125.

[8] 叶 静, 肖美添, 汤须崇, 等. HPLC-ELSD 法测定甘草中 3 种甘草皂苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(4): 368-370.

[9] 方诗琦, 瞿其扬, 仲欢欢, 等. 甘草中 5 种三萜皂苷的同时测定及主成分分析[J]. 中成药, 2016, 38(2): 336-341.

[10] 李玉山. 甘草酸提取纯化工艺的研究进展[J]. 化学试剂, 2016, 38(5): 428-432.

[11] 张 卉, 赵婷婷, 戴柳江, 等. 半仿生-酶法提取甘草中甘草酸的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(9): 969-972.

[12] Shabkhiz M A, Eikani M H, Sadr Z B, *et al.* Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. *Food Chem*, 2016, 210: 396-401.

[13] 任桂玲, 李沈明, 郭艳玲, 等. 逆向连续循环低温提取金莲花口服液工艺研究[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2022-2026.

[14] 虞 立, 张宇燕, 杨洁红, 等. R 语言多目标优化养阴通脑颗粒组方中 3 种黄酮类指标成分提取工艺[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1156-1160.

[15] 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.

[16] Pernfa-Espinoza A V, Ordieres-Meré J B, Martínez-de-Pisón F J, *et al.* TAO-robust backpropagation learning algorithm[J]. *Neural Netw*, 2005, 18 (2): 191-204.

黄姜中薯蓣皂苷元提取工艺的优化

赵国强， 王常高， 林建国， 杜 馨， 蔡 俊*
(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

摘要：目的 优化黄姜中薯蓣皂苷元的提取工艺。**方法** 先优化自然预发酵的温度（45、52、62 ℃）和时间（12、24、36 h）。再以纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶酶量为影响因素，薯蓣皂苷元得率为评价指标，正交试验优化提取工艺。**结果** 最佳自然预发酵条件为 45 ℃ 发酵 24 h，52 ℃ 发酵 12 h，62 ℃ 发酵 36 h；最佳提取条件为纤维素酶酶量 50 U/g，木聚糖酶酶量 100 U/g，果胶酶酶量 120 U/g，薯蓣皂苷元得率 0.845%，比恒温自然发酵下提高了 69%。**结论** 该方法稳定可行，可用于提取黄姜中薯蓣皂苷元。
关键词：黄姜；薯蓣皂苷元；提取
中图分类号：R284.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)09-1834-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.014

Extraction optimization for diosgenin from *Dioscorea zingiberensis*

ZHAO Guo-qiang， WANG Chang-gao， LIN Jian-guo， DU Xin， CAI Jun*
(Ministry of Education Key Laboratory for Fermentation Engineering; Hubei Provincial Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation; School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

收稿日期：2017-04-12
基金项目：国家自然科学基金（31401807）
作者简介：赵国强（1992—），男，硕士生，研究方向为发酵过程优化与放大。E-mail: 1144104685@qq.com
* **通信作者：**蔡 俊（1968—），男，博士，教授，博士生导师，研究方向为发酵工程。E-mail: caijun@mail.hbut.edu.cn