

基于指纹图谱的 Box-Benhnken 响应面法结合 BP 神经网络多指标优化黑胡椒提取工艺

程索婷,孙新宇,王紫彤,任佩,邹纯才*,鄢海燕*

皖南医学院药学院,芜湖 241002

摘要:基于中药指纹图谱技术,采用 Box-Benhnken 响应面法结合 BP 神经网络优化黑胡椒的提取工艺。将黑胡椒 HPLC 指纹图谱总峰面积标准化值、胡椒碱峰面积归一化值、指纹图谱相似度分别赋以权重,得到综合评价指标。在单因素试验的基础上,应用 Box-Benhnken 响应面法优化黑胡椒提取工艺,最佳提取工艺为乙醇浓度 90%、料液比 1:40(g/mL)、超声时间 40 min。选取 Box-Benhnken 响应面法获得的综合评价指标进行 BP 神经网络训练、验证与预测,得到最佳提取工艺为乙醇浓度 100%、料液比 1:30(g/mL)、超声时间为 40 min。三组黑胡椒最优提取工艺验证结果证明,BP 神经网络的综合评价指标为 0.895,优于 Box-Benhnken 响应面法的综合评价指标 0.885。本研究基于中药指纹图谱技术,采用 Box-Benhnken 响应面法结合 BP 神经网络,可为黑胡椒提取工艺的优化提供新思路,获取最佳提取方案。

关键词:黑胡椒;胡椒碱;指纹图谱;Box-Benhnken 响应面法;BP 神经网络

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)9-1481-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.9.004

Multi index optimization of black pepper extraction process by Box-Benhnken response surface method based on fingerprint combined with BP neural network

CHENG Suo-ting, SUN Xin-yu, WANG Zi-tong, REN Pei, ZOU Chun-cai*, YAN Hai-yan*

School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

Abstract:To optimize the extraction process of black pepper by Box-Benhnken response surface method combined with BP neural network based on traditional Chinese medicine fingerprint technology. The comprehensive evaluation indexes were obtained by weighting the total peak area standardization value of HPLC fingerprint of black pepper, the peak area normalization value of piperine and the similarity of fingerprint. On the basis of single factor experiment, the extraction process of black pepper was optimized by Box-Benhnken response surface methodology. The optimal extraction process was as follows: ethanol concentration was 90%, solid-liquid ratio was 1:40 (g/mL) and ultrasonic time was 40 min. BP neural network was trained, verified and predicted by selecting the comprehensive evaluation indexes obtained by Box-Benhnken response surface method. The optimal extraction process was as follows: ethanol concentration was 100%, solid-liquid ratio was 1:30 (g/mL) and ultrasonic time was 40 min. The validation results of three groups of optimal extraction process of black pepper showed that the comprehensive evaluation index of BP neural network was 0.895, which was better than that of Box-Benhnken response surface method, i. e. 0.885. Based on the fingerprint technology of traditional Chinese medicine, the Box-Benhnken response surface method combined with BP neural network can provide a new idea for the optimization of black pepper extraction process and obtain the best extraction scheme.

Key words:black pepper; piperine; fingerprint; Box-Benhnken response surface method; BP neural network

收稿日期:2022-04-18

接受日期:2022-08-16

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重大项目(KJ2015ZD41, KJ2016SD60);2021年皖南医学院大学生科研资助项目(WK2021XS42)

*通信作者 E-mail:zouche@163.com, yhy0801@126.com

胡椒为胡椒科植物胡椒 *Piper nigrum* L. 的干燥近成熟或成熟果实。秋末至次春果实呈暗绿色时采收,晒干,为黑胡椒。具温中散寒、下气、消痰等功

效,用于胃寒呕吐、腹痛泄泻等^[1]。胡椒在多种中成药中与其它药味配伍使用,如庆余辟瘟丹^[1]、七味楂藤子丸^[1]、帕朱丸^[1]、复方蛤青片^[1]、活血止痛膏^[1]等,也以单独药味使用,如小儿敷脐止泻散^[1]。黑胡椒中含有众多的生物碱,具有止痛消炎、抗氧化等多种药理活性^[2-5],胡椒碱是其中代表性成分,也是胡椒的质量标志成分^[6],在《中国药典》2020年版中,胡椒、黑胡椒等药材或以胡椒入药的方剂,多以胡椒碱的含量作为药材或制剂的质量评价指标^[1]。现有文献中涉及胡椒的提取方法,也多是单一地以胡椒碱为评价指标,未考虑提取工艺对胡椒中其它生物碱含量的影响^[7,8]。中药指纹图谱是一种综合的、量化的标示中药内在特性的质量评价方法,自《中国药典》2010年版开始应用于中药的质量控制,主要是HPLC化学指纹图谱^[9],可有效克服单一评价指标的局限性。现有提取工艺的优化,所选用的方法以响应面优化和正交试验居多^[10-12],但响应面优化试验往往存在局限性,所选取的方案并不一定是最佳方案。BP神经网络模拟人脑神经网络功能及其思维方式,以反向传播方式,为达到理想结果而调整网络的权值和阈值来处理复杂的非线性问题^[13,14]。为此,本研究拟采用BP神经网络结合中药指纹图谱^[14],通过Box-Behnken响应面法多指标优化乙醇浓度、料液比和超声时间等因素对黑胡椒提取工艺的影响,明确黑胡椒提取工艺参数,为后续的相关剂型生产提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津UV-20A高效液相色谱仪(岛津公司);Heidol-LR4010/4011旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司);FA2004B电子天平(上海越平科学仪器有限公司);KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RHP-400A型高速多功能粉碎机(浙江永康市荣浩工贸有限公司)。

1.2 材料

黑胡椒(产地:海南,海南觉森电子商务有限公司,批号:20210905);胡椒碱(成都埃法生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号:AF20081753);无水乙醇(安徽安特食品股份有限公司,批号:2111073604);甲酸(天津市化学试剂三厂,批号:20080828);甲醇、乙腈为色谱纯;无水乙醇、甲酸为分析纯;水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 黑胡椒供试品溶液

参照《中国药典》2020版一部胡椒质量标准的含量测定方法^[1],取黑胡椒,粉碎,过50目筛。取粉末约0.1g,精密称定,置50mL棕色量瓶中,加入无水乙醇40mL,避光超声处理30min,放冷,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液10mL,置25mL的棕色量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 胡椒碱对照品溶液

取胡椒碱对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,制得浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胡椒碱对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱 YMC-Pack ODS-A C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液 (40:60), 等度洗脱, 分析时间 100 min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL , 体积流量 1 mL/min; 检测波长 240 nm, 滤膜孔径为 0.45 μm 。

2.3 黑胡椒 HPLC 图的建立

按“2.1.1”和“2.1.2”项下方法制备黑胡椒供试品溶液以及胡椒碱对照品溶液,根据“2.2”项下色谱条件进样,记录色谱图。基于保留时间的一致性,根据胡椒碱对照品主峰的保留时间确认黑胡椒提取物 HPLC 色谱图中 S 峰为胡椒碱标志物峰(见图1)。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度试验

取同一批黑胡椒粉末,精密称定,按照“2.1.1”项下方法制备黑胡椒供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样5次,记录色谱图。计算胡椒碱的保留时间 RSD 值为 0.20%, 峰面积 RSD 值为 0.20%, 结果表明方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批黑胡椒粉末,精密称定,按照“2.1.1”项下方法制备5份黑胡椒供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,记录色谱图。计算胡椒碱的保留时间 RSD 值为 0.06%, 峰面积 RSD 值为 2.45%, 说明该方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一批黑胡椒粉末,精密称定,按照“2.1.1”项下方法制备黑胡椒供试品溶液,按“2.2”项下色

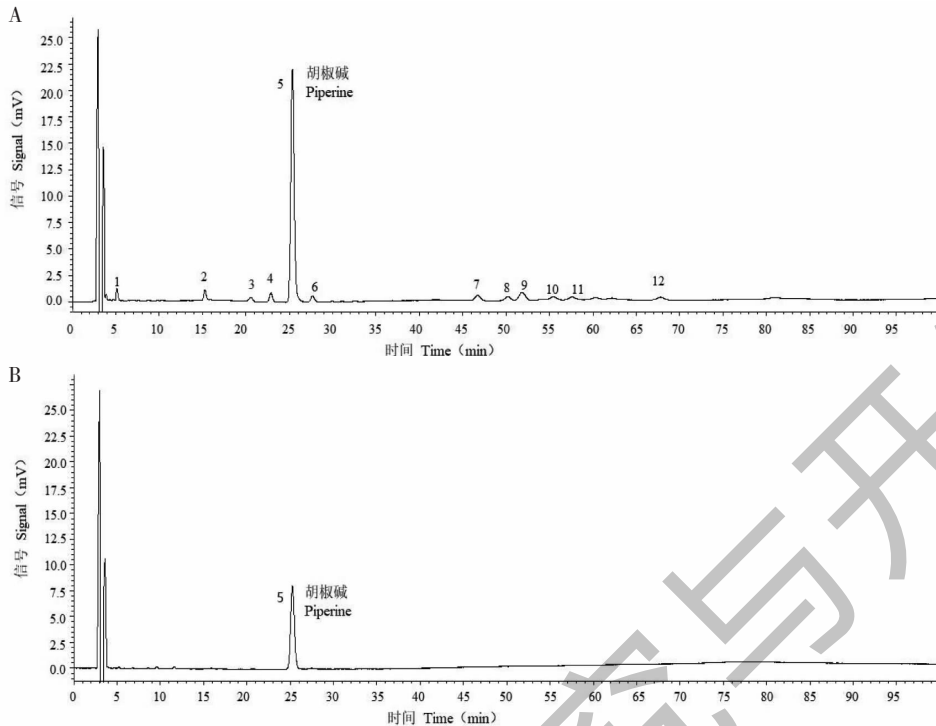


图1 黑胡椒供试品溶液(A)与胡椒碱对照品溶液(B)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of black pepper test solution (A) and piperine reference solution (B)

谱条件,分别于0、4、8、12、16 h 进样,记录色谱图。计算胡椒碱的保留时间 RSD 值为 0.08%,峰面积 RSD 值为 0.07%,表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.5 Box-Behnken 响应面优化试验

指纹图谱的建立按“2.2”项下色谱条件进样,记录各提取条件下的色谱图,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版本)中,建立指纹图谱。设置参照图谱 S1 后,经多点校正,Mark 峰匹配并确认共有峰(见图 2A~5A)。

综合评价指标的确定以总峰面积标准化值(总峰面积标准化值 = $\frac{A_i(n)}{\sum_{i=1}^p A_i(n)/p}$, $A_{i(n)}$ 为第 i ($i=1, 2, 3, \dots, p$) 个样品 n 个共有峰的总峰面积, p 为样品数)、胡椒碱峰面积归一化值(胡椒碱峰面积占样品总峰面积的比值)、指纹图谱相似度(以参照图谱 S1 为对照指纹图谱生成的相似度)计算综合评价指标(R), $R = \text{总峰面积标准化数值} \times 0.3 + \text{胡椒碱峰面积归一化值} \times 0.5 + \text{指纹图谱相似度} \times 0.2$ (式中的 0.2、0.3、0.5 为权重系数,为各因素对综合评价指标的重要程度)^[15]。

2.5.1 单因素试验

考察因素水平设计参考《中国药典》2020 年版

一部黑胡椒供试品溶液的制备方法^[1]和文献^[16,17],根据预试验结果,设置单因素试验主要考察内容为:乙醇浓度、料液比和超声时间。考察因素及其水平见表 1。

表 1 单因素试验条件

Table 1 Single factor experimental conditions

| 因素 Factor | 变量 Variable quantity |
|-----------------------------------|------------------------------|
| 乙醇浓度 Ethanol concentration (%) | 80、85、90、95、100 |
| 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL) | 1:10、1:20、1:30、 1:40、1:50 |
| 超声时间 Ultrasonic time (min) | 40、50、60、70、80 |

2.5.1.1 乙醇浓度的考察

按照“2.1.1”项下黑胡椒提取物的制备方法,参照“2.5.1”项下考察因素及其水平表,选择料液比为 1:30 (g/mL),超声时间为 60 min,分别考察乙醇浓度为 100%、95%、90%、85%、80% 对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱总峰面积标准化值、胡椒碱峰面积归一化值、指纹图谱相似度及综合评价指标的影响,结果见表 2 和图 2。

表 2 乙醇浓度对综合评价的影响

Table 2 Effect of ethanol concentration on comprehensive evaluation

| 乙醇浓度 Ethanol concentration (%) | 总峰面积标准化值 Standardized value of total peak area | 胡椒碱峰面积归一化值 Normalized value of piperine peak area | 指纹图谱相似度 Fingerprint similarity | 综合评价指标 Comprehensive evaluation index |
|--------------------------------------|--|---|--------------------------------------|---|
| 80 | 0.998 | 0.740 | 1.000 | 0.869 |
| 85 | 0.983 | 0.737 | 1.000 | 0.863 |
| 90 | 1.014 | 0.733 | 1.000 | 0.871 |
| 95 | 1.001 | 0.746 | 1.000 | 0.873 |
| 100 | 1.004 | 0.741 | 1.000 | 0.872 |

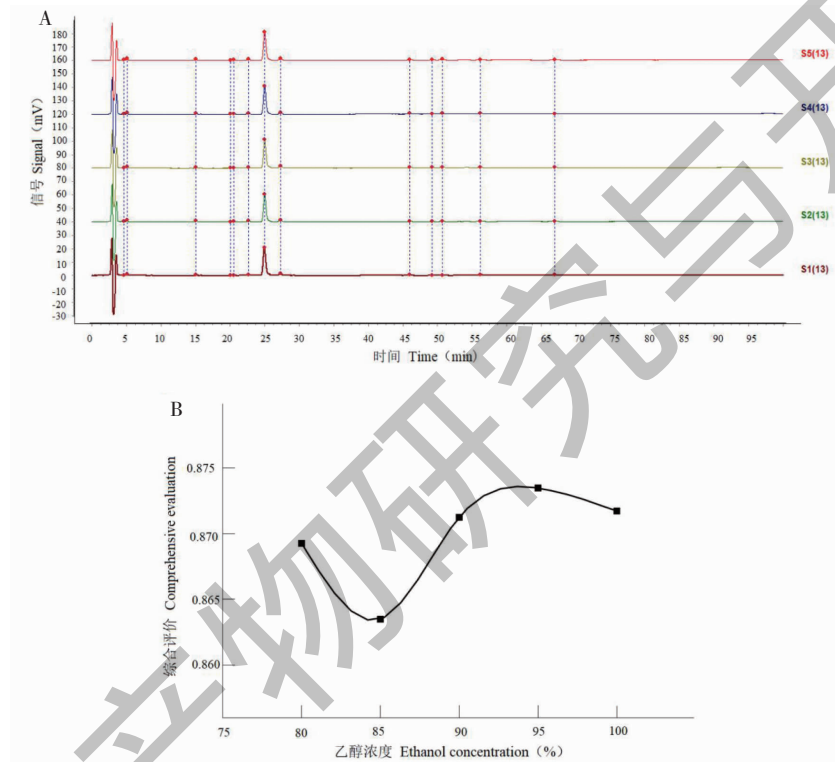


图 2 乙醇浓度对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱 (A) 及综合评价指标 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on HPLC fingerprint (A) and comprehensive evaluation index (B) of black pepper extract

由图 2、表 2 可知,指纹图谱的相似度为 1,乙醇浓度为 85% 时综合评价指标最低,随着乙醇浓度的升高,综合评价指标升高,并趋于平缓。当乙醇浓度为 95% 时综合评价指标达到最高值。为此,确定单因素考察的最佳乙醇浓度为 95%。

2.5.1.2 料液比的考察

按照“2.1.1”项下黑胡椒提取物的制备方法,参照“2.5.1”项下考察因素及其水平表,结合“2.5.1.1”项下的考察结果,选定乙醇浓度为 95%,选择超声时间为 60 min,分别考察料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱总峰面积标准化值、胡椒碱峰面积归一化值、指纹

图谱相似度及综合评价指标的影响,结果见表 3 和图 3。

由表 3 和图 3 可知,指纹图谱的相似度为 1,随着料液比的比值增加,综合评价指标逐渐增高,并在 1:20 (g/mL) 时达到拐点,后续随着料液比的增加,综合评价指标基本趋于平稳。结合胡椒碱峰面积归一化值在料液比为 1:20 (g/mL) 时为峰值即 0.778,且在实际生产中料液比过大会增加浪费和污染,综合考虑各方面影响后选取料液比 1:20 (g/mL) 为单因素考察的最佳料液比。

2.5.1.3 超声时间的考察

按照“2.1.1”项下黑胡椒提取物的制备方法,

表 3 料液比对综合评价指标的影响

Table 3 Effect of solid-liquid ratio on comprehensive evaluation index

| 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL) | 总峰面积标准化值 Standardized value of total peak area | 胡椒碱峰面积归一化值 Normalized value of piperine peak area | 对照指纹图谱相似度 Fingerprint similarity | 综合评价指标 Comprehensive evaluation index |
|-------------------------------------|--|---|--|---|
| 1:10 | 0.697 | 0.760 | 1.000 | 0.789 |
| 1:20 | 1.007 | 0.778 | 1.000 | 0.891 |
| 1:30 | 1.074 | 0.764 | 1.000 | 0.904 |
| 1:40 | 1.150 | 0.758 | 1.000 | 0.924 |
| 1:50 | 1.072 | 0.771 | 1.000 | 0.907 |

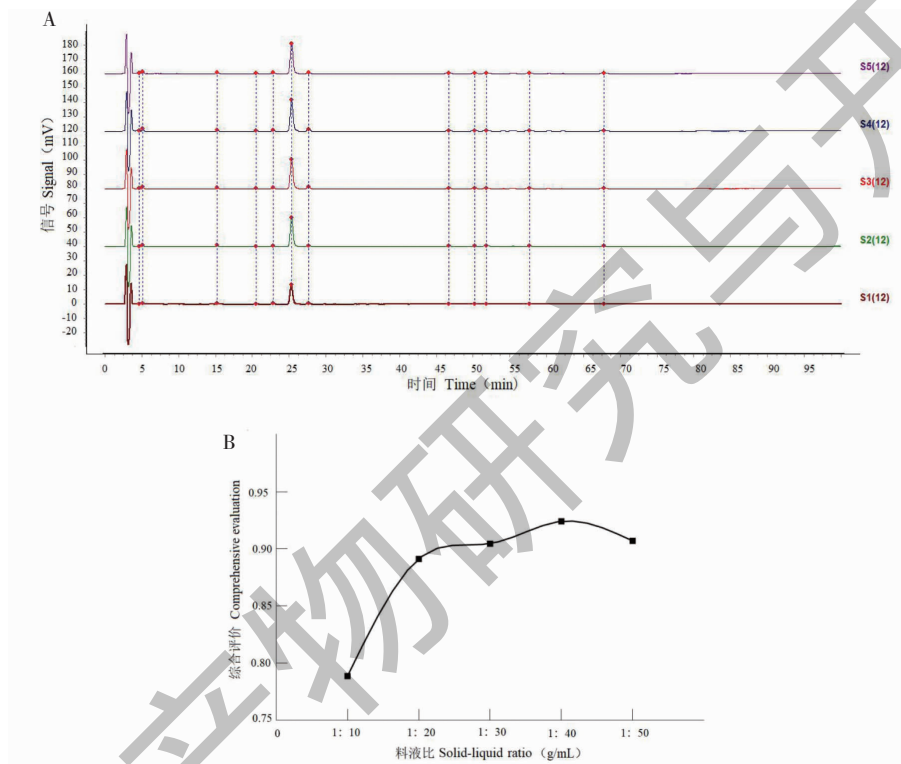


图 3 料液比对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱 (A) 及综合评价指标 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on HPLC fingerprint (A) and comprehensive evaluation index (B) of black pepper extract

参照“2.5.1”项下考察因素及其水平表,选定乙醇浓度为 95%,料液比为 1:20,分别考察超声时间为 40、50、60、70、80 min 对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图

谱总峰面积标准化值、胡椒碱峰面积归一化值、指纹图谱相似度及综合评价指标的影响,结果见表 4 和图 4。

表 4 超声时间对综合评价指标的影响

Table 4 Effect of ultrasonic time on comprehensive evaluation index

| 超声时间 Ultrasonic time (min) | 总峰面积标准化值 Standardized value of total peak area | 胡椒碱峰面积归一化值 Normalized value of piperine peak area | 对照指纹图谱相似度 Fingerprint similarity | 综合评价指标 Comprehensive evaluation index |
|----------------------------------|--|---|--|---|
| 40 | 0.967 | 0.628 | 0.999 | 0.804 |
| 50 | 1.093 | 0.631 | 0.998 | 0.843 |
| 60 | 0.966 | 0.603 | 1.000 | 0.791 |
| 70 | 0.960 | 0.613 | 1.000 | 0.795 |
| 80 | 1.014 | 0.533 | 0.989 | 0.769 |

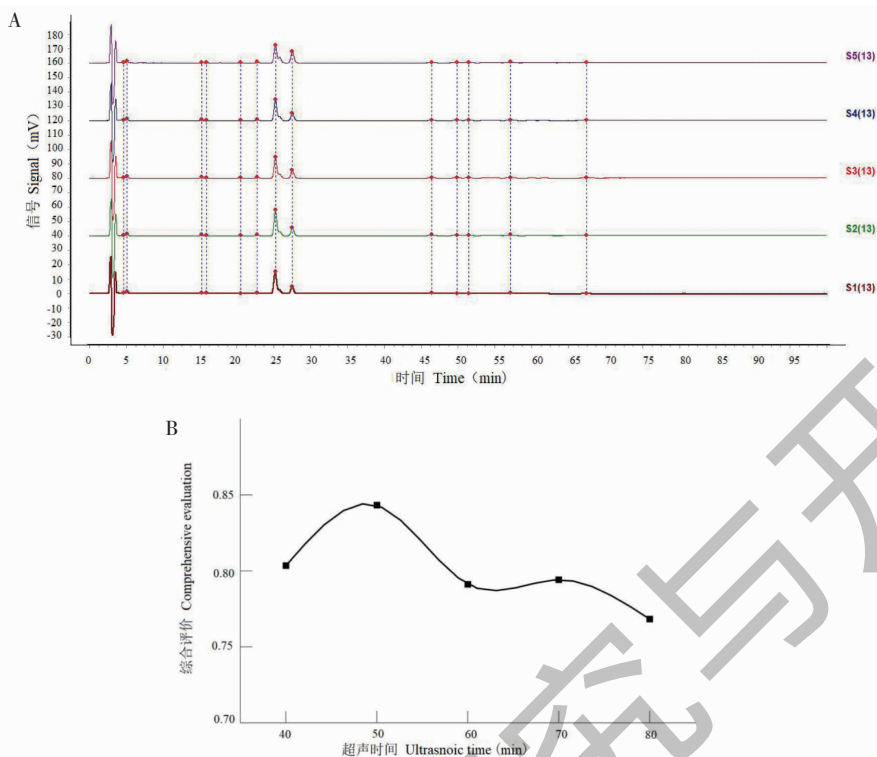


图4 超声时间对黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱 (A) 及综合评价指标 (B) 的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic time on HPLC fingerprint (A) and comprehensive evaluation index (B) of black pepper extract

由表4和图4可知,指纹图谱的相似度均大于0.998,超声时间在50 min时综合评价指标达到最大值,并且随着超声时间的增加,综合评价指标逐渐降低。因此,选取50 min为单因素考察的最佳超声提取时间。

2.5.2 Box-Benhnken 响应面优化试验

根据 Box-Benhnken 试验设计原理,在单因素试验的基础上,选取乙醇浓度(A)、料液比(B)和超声时间(C)3个影响因素,利用 Design-Expert 8.0 软件设计三因素三水平试验表(见表5),并以综合评价(R)作为评价指标进行黑胡椒提取工艺的 Box-Benhnken 响应面优化试验。17组试验结果的指纹图谱见图5,Box-Benhnken 响应面优化试验结果见表6。

利用 Design-Expert 8.0 对表6中的各因素与综

合评价指标结果进行多元二次回归拟合分析,得到模型回归方程为: $R = 0.87 + 1.970 \times 10^{-3} A + 0.018B - 0.016C - 6.241 \times 10^{-3} AB + 0.015AC + 2.277 \times 10^{-3} BC + 0.018 \times A^2 - 0.013 \times B^2 + 0.026 \times C^2$ 。黑胡椒提取工艺响应曲面二次回归方程模型方差分析结果见表7。

由表7可知,模型 $P < 0.05$,说明该回归模型是可信的;失拟项 $P = 0.6840 > 0.05$,无显著性差异,说明该模型与实验数据拟合程度较高,存在的误差小。表7中,因素B(料液比)、C(超声时间)的 P 值 < 0.05 ,说明因素B(料液比)、C(超声时间)对综合评价指标有显著影响;交叉项中 A^2 、 C^2 的 P 值 < 0.05 ,说明 A^2 、 C^2 交叉项对综合评价指标有显著影响。模型的残差正态概率分析结果见图6。

表5 Box-Benhnken 响应面试验因素与水平表设计

Table 5 Factors and levels design of Box-Benhnken response surface test

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|----------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%) | B 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL) | C 超声时间 Ultrasonic time (min) |
| -1 | 90 | 10 | 40 |
| 0 | 95 | 20 | 50 |
| 1 | 100 | 30 | 60 |

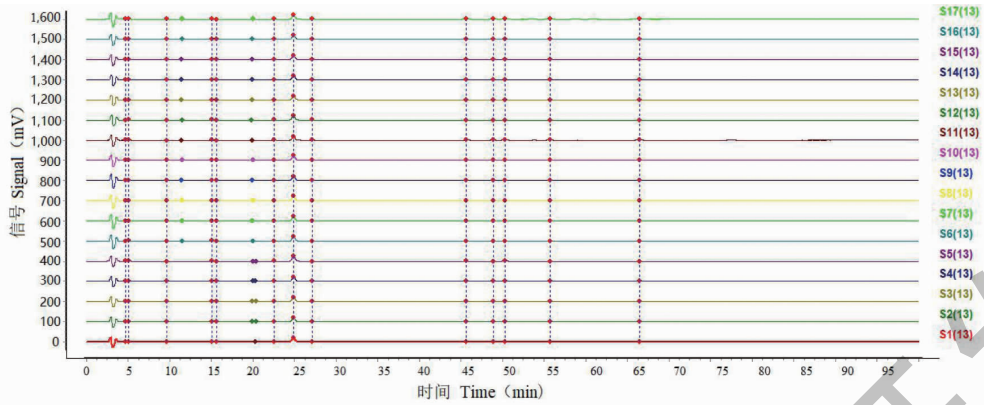


图 5 17 组黑胡椒提取物 HPLC 指纹图谱

Fig. 5 HPLC fingerprint of 17 groups of black pepper extracts

表 6 Box-Benhnken 响应面试验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Benhnken response surface test

| 编号 No. | 因素 Factor | | | 总峰面积 标准化值 Standardized value of total peak area | 胡椒碱峰 面积归一化值 Normalized value of piperine peak area | 相似度 Similarity | 综合评价指数 Comprehensive evaluation index | 预测综合 评价指标 Predict comprehensive evaluation index |
|-----------|--------------|--------|--------|---|---|-------------------|--|---|
| | A | B | C | | | | | |
| 1 | 90(-1) | 10(-1) | 50(0) | 0.879 | 0.756 | 1.000 | 0.841 | 0.853 |
| 2 | 100(+1) | 10(-1) | 50(0) | 1.001 | 0.741 | 0.999 | 0.871 | 0.849 |
| 3 | 90(-1) | 30(+1) | 50(0) | 1.068 | 0.741 | 0.999 | 0.891 | 0.961 |
| 4 | 100(+1) | 30(+1) | 50(0) | 1.094 | 0.733 | 0.999 | 0.895 | 0.859 |
| 5 | 90(-1) | 20(0) | 60(+1) | 1.189 | 0.786 | 0.999 | 0.950 | 0.950 |
| 6 | 100(+1) | 20(0) | 40(-1) | 1.082 | 0.772 | 1.000 | 0.911 | 0.946 |
| 7 | 90(-1) | 20(0) | 60(+1) | 1.012 | 0.763 | 1.000 | 0.885 | 0.850 |
| 8 | 100(+1) | 20(0) | 60(+1) | 1.056 | 0.779 | 1.000 | 0.906 | 0.849 |
| 9 | 95(0) | 30(+1) | 40(-1) | 0.967 | 0.783 | 1.000 | 0.882 | 0.896 |
| 10 | 95(0) | 30(+1) | 40(-1) | 1.077 | 0.776 | 1.000 | 0.911 | 0.944 |
| 11 | 95(0) | 10(-1) | 60(+1) | 0.877 | 0.771 | 1.000 | 0.849 | 0.849 |
| 12 | 95(0) | 30(+1) | 60(+1) | 1.010 | 0.769 | 1.000 | 0.888 | 0.853 |
| 13 | 95(0) | 20(0) | 50(0) | 0.877 | 0.771 | 1.000 | 0.849 | 0.863 |
| 14 | 95(0) | 20(0) | 50(0) | 0.953 | 0.760 | 1.000 | 0.866 | 0.863 |
| 15 | 95(0) | 20(0) | 50(0) | 0.971 | 0.768 | 1.000 | 0.875 | 0.863 |
| 16 | 95(0) | 20(0) | 50(0) | 0.972 | 0.795 | 0.999 | 0.889 | 0.863 |
| 17 | 95(0) | 20(0) | 50(0) | 0.914 | 0.787 | 1.000 | 0.868 | 0.863 |

表 7 回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of regression model

| 来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 Mean square | F | P | 显著性 Significance |
|--------------|------------------------|-----------|------------------------|-------|---------|---------------------|
| 模型 Model | 0.010 | 9 | 1.151×10^{-5} | 6.59 | 0.010 6 | * |
| A | 3.104×10^{-5} | 1 | 3.104×10^{-5} | 0.18 | 0.686 0 | |
| B | 2.493×10^{-3} | 1 | 2.493×10^{-3} | 14.27 | 0.006 9 | ** |
| C | 1.945×10^{-3} | 1 | 1.945×10^{-3} | 11.13 | 0.012 5 | * |

续表 7 (Continued Tab. 7)

| 来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 Mean square | <i>F</i> | <i>P</i> | 显著性 Significance |
|-----------------|------------------------|-----------|------------------------|----------|----------|---------------------|
| AB | 1.558×10^{-4} | 1 | 1.558×10^{-4} | 0.89 | 0.376 5 | |
| AC | 9.037×10^{-4} | 1 | 9.037×10^{-4} | 5.17 | 0.057 1 | |
| BC | 2.073×10^{-5} | 1 | 2.073×10^{-5} | 0.12 | 0.740 6 | |
| A ² | 1.342×10^{-3} | 1 | 1.342×10^{-3} | 7.68 | 0.027 6 | * |
| B ² | 6.922×10^{-4} | 1 | 6.922×10^{-4} | 3.96 | 0.086 8 | |
| C ² | 2.793×10^{-3} | 1 | 2.793×10^{-3} | 15.99 | 0.005 2 | ** |
| 残差 Residual | 1.223×10^{-3} | 7 | 1.747×10^{-4} | | | |
| 失拟项 Lack of fit | 3.492×10^{-4} | 3 | 1.164×10^{-4} | 0.53 | 0.684 0 | |
| 纯误差 Pure error | 8.739×10^{-4} | 2 | 2.185×10^{-4} | | | |
| 总离差 Cor total | 0.012 | 16 | | | | |

注: * 差异显著, $P < 0.05$; ** 差异极显著, $P < 0.01$ 。

Note: * Significant, $P < 0.05$; ** Extremely significant, $P < 0.01$.

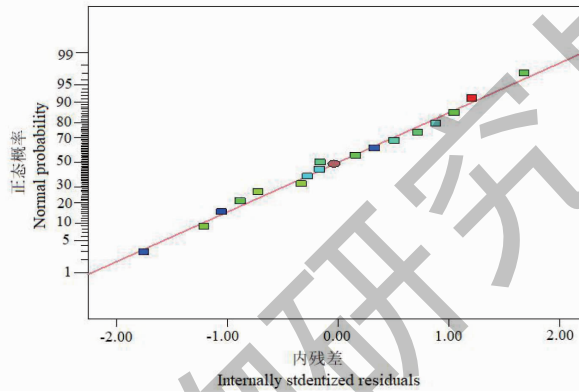


图 6 残差的正态概率分布图

Fig. 6 Normal probability distribution of residuals

由图 6 可知,模型的残差正态概率基本分布在同一直线上,说明黑胡椒提取工艺综合评价的实际

测得值与模型预测值相差较小。由 Design-Expert 8.0 软件绘制所得三维表面图见图 7。

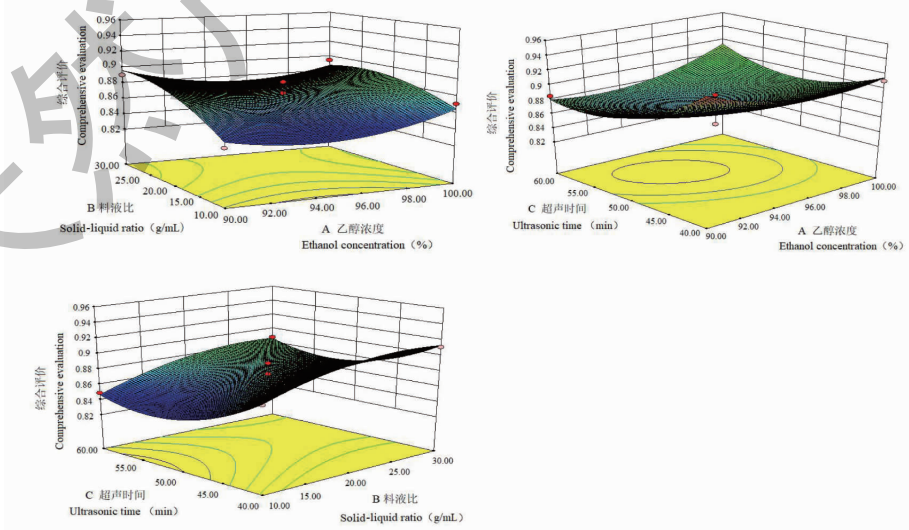


图 7 各因素交互作用对黑胡椒提取工艺的影响

Fig. 7 Effect of interaction of various factors on extraction of black pepper

由图 7 可直观地观察响应面的形状和陡峭程度,分析各因素之间相互作用对综合评价指标影响的大小^[18]。采取 Box-Behnken 响应面法得到的黑胡椒最优提取工艺为:乙醇浓度为 90%,料液比为 1:40(g/mL),超声时间为 40 min。

2.6 BP 神经网络

现今 BP 神经网络运用广泛,覆盖了农业、环境、建筑以及软件设计等等,其更可以运用在药物提取工艺的优化上。中药的提取工艺受各种因素的影响,各因素与评价指标之间往往不存在线性关系。BP 神经网络方法可以在一个多维空间寻找优化工艺参数的范围^[19],这为提取工艺的优化提供新的设计思路。

2.6.1 模型建立

BP 神经网络是一种层状的网络,分为输入层、

隐藏层和输出层。输入层信号依次传过各隐藏层,然后传到输出层,每一层的输出只影响下一层的输出^[20]。实验采用的为 3 层结构的 BP 神经网络建立模型。输入节点数为 3,即乙醇浓度(A)、料液比(B)、超声时间(C);输出的节点数为 1 个,即综合评价指标(R)。

2.6.2 网络训练及结果

采用“2.6.1”的模型,使用 Matlab 2014a 软件进行语言编程,成功构建了 1 个 3-6-1 的神经网络模型并进行训练,以“2.5.2”响应面试验中的三组数据(编号为 4、5 和 11)进行赋值训练,并以“2.5.2”响应面试验中的三组数据(编号为 1、6 和 13)进行验证。验证所用的三个因素以及得到的综合评价指标见表 8。

表 8 BP 神经网络学习后验证值

Table 8 Validation values after BP neural network learning

| 编号 No. | 乙醇浓度 Ethanol concentration(%) | 料液比 Solid-liquid ratio(g/mL) | 超声时间 Ultrasonic time(min) | 预测综合评价指标 Predict comprehensive evaluation index | 综合评价指标 Comprehensive evaluation index |
|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---|---|
| 1 | 90 | 1:10 | 50 | 0.849 | 0.841 |
| 2 | 100 | 1:20 | 40 | 0.950 | 0.911 |
| 3 | 95 | 1:20 | 50 | 0.853 | 0.849 |

由表 8 可知,构建的 3-6-1 的神经网络模型可较好地拟合各因素水平与综合评价指标的映射关

系。BP 神经网络的训练过程见图 8。BP 神经网络预测综合评价指标见表 6。

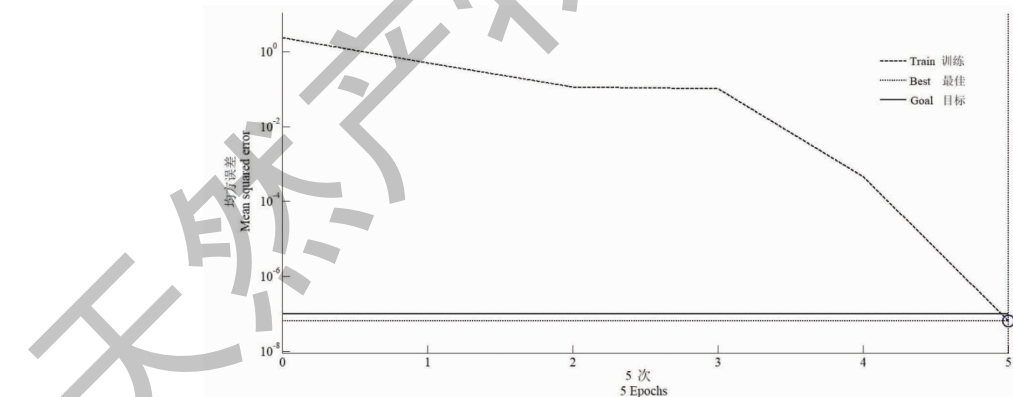


图 8 BP 神经网络训练过程

Fig. 8 BP neural network training process

BP 神经网络预测综合评价指标与 Box-Behnken 响应面试验的综合评价指标相近,网络训练的均方误差曲线见图 9,误差结果见图 10。图 9 结果显示预测值与实测值非常相近,相关系数 $R =$

1,表明该网络模型较好。图 10 显示,BP 神经网络所预测的结果与实际值的误差均小于 0.1,可显示该软件所得结果的准确性较好。

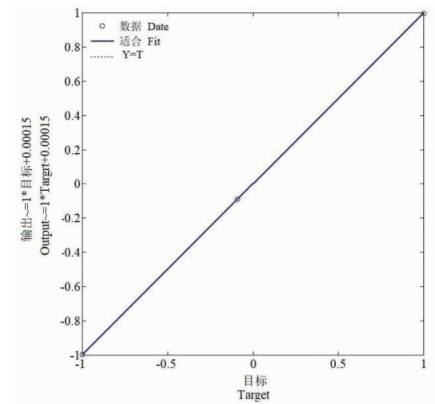


图9 均方误差图

Fig. 9 Mean square error diagram

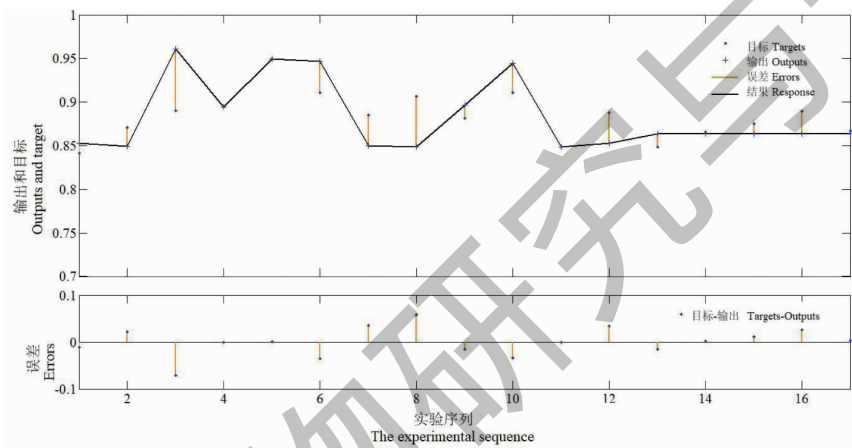


图10 预测值与实测值的误差图

Fig. 10 Error between predicted value and measured value

2.6.3 BP神经网络预测结果

将BP神经网络得到的17组预测综合评价指标(见表6)输入Design-Expert 8.0软件,得到的最佳提取工艺为:乙醇浓度100%、料液比1:30(g/mL)、超声时间40 min。

2.7 验证试验

取同一批黑胡椒样品,分别按Box-Behnken响应面优化法和BP神经网络预测的最佳提取工艺进行提取,并计算综合评价指标,结果见表9。

表9 验证试验结果

Table 9 Verification test results

| 优化方法 Optimization method | 总峰面积 标准化值 Standardized value of total peak area | 胡椒碱峰 面积归一化值 Normalized value of piperine peak area | 指纹图谱相似度 Fingerprint similarity | 综合评价指标 Comprehensive evaluation index | 均值 mean value | RSD (%) |
|--------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|------------------|------------|
| Box-Behnken 响应面 | 0.104 | 0.766 | 1.000 | 0.895 | 0.885 | 1.61 |
| Box-Behnken response surface | 1.054 | 0.752 | 1.000 | 0.892 | | |
| BP神经网络 BP neural network | 1.003 | 0.737 | 1.000 | 0.869 | 0.895 | 0.30 |
| | 1.059 | 0.752 | 1.000 | 0.893 | | |
| | 1.065 | 0.758 | 1.000 | 0.898 | | |
| | 1.041 | 0.762 | 1.000 | 0.894 | | |

由表 9 可知, Box-Benhnken 响应面的综合评价指标均值为 0.885, RSD 值为 1.61%; BP 神经网络的综合评价指标均值为 0.895, RSD 值为 0.30%。BP 神经网络得到的提取工艺要优于响应面优化所得到的提取工艺且更稳定。为此, 最终确定黑胡椒的最佳提取工艺为: 乙醇浓度 100%, 料液比 1:30 (g/mL), 超声时间 40 min。

3 讨论与结论

中药以多成分相互协调发挥药理作用, 但现有文献对胡椒中胡椒碱的提取工艺考察多以单指标即胡椒碱来评价, 提取工艺的结果难以反映中药复杂多成分的内在本质。本研究采用多指标(胡椒碱的含量即胡椒碱峰面积占总峰面积之比、黑胡椒共有成分含量即黑胡椒提取物共有峰峰面积占总峰面积之比、指纹图谱相似度)评价黑胡椒中胡椒碱的提取工艺更能反映中药多成分相互协同发挥药效的内在本质, 既考虑黑胡椒的主要质量标志物胡椒碱, 也考虑了其它未知成分, 侧重个体兼顾整体, 更科学、可靠, 可为胡椒中胡椒碱的提取提供更科学的理论和技术支持。

《中国药典》2020 年版和有关文献^[21,22]采用 HPLC 法对胡椒碱进行定量分析, 是以甲醇-水为流动相, 检测器为紫外检测器, 检测波长为 343 nm。经过对胡椒碱进行全波长的扫描, 发现胡椒碱在 240 nm 波长处也有吸收峰且吸光度值可满足分析要求, 同时在 240 nm 波长也可满足其它生物碱的测定要求, 故本研究中指纹图谱的测定波长选择为 240 nm。流动相由甲醇-水改为乙腈-0.1% 甲酸水溶液后, 各成分间的分离效果也得到明显改善。

以乙醇为提取溶剂对胡椒的提取工艺进行优化已有文献报道。其中 Wang 等^[23]采用正交试验设计, 利用超声波提取法获得的黑胡椒中胡椒碱的最佳提取工艺为乙醇浓度 80%、料液比 1:20、超声功率 700 W、超声时间 80 min。Wang 等^[10]采用响应曲面法设计, 利用回流提取法获得的白胡椒中胡椒碱的最佳提取工艺参数为料液比 1:12、提取 3 次、每次 2.0 h。此外, 胡椒中胡椒碱的提取还有采用超临界 CO₂ 法^[24]、酶辅助超临界 CO₂ 法^[25]、酶法提取^[26]等。本研究考虑到实际操作选用了无水乙醇作为提取溶剂, 超声波提取法为提取方法来进行进一步的研究。虽然提取工艺的优化以响应面法和正交试验法为多, 但响应面法和正交试验法优化试验往往存在局限性, 所选取的方案并不一定是最佳方

案。BP 神经网络可利用神经网络自主学习的能力, 弥补以往优化试验中的不足, 为提取方法的优化提供新方案^[27,28]。本研究基于中药指纹图谱技术, 采用 Box-Benhnken 响应面法结合 BP 神经网络优化黑胡椒的提取工艺结果表明, BP 神经网络得到的提取工艺要优于响应面优化所得到的提取工艺且更稳定。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 254, 476, 594, 917, 1143, 1340, 1395.
- 2 Fu M. The research of inhibitory regulation of piperine/deoxyschisandrin on hippocampal neuronal neuronal [D]. Beijing: Tsinghua University (清华大学), 2009.
- 3 HURilebagen. Overview of pharmacological action of piperine [J]. J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志), 2009, 15(2): 68-69.
- 4 Liu P, Suo JX, Yu TF. Research progress of pharmacological action of piperine [J]. Chin Drug Appl Monit (中国药物应用与监测), 2007, (3): 7-9.
- 5 Xu JT, Wang Y, Ma F, et al. Piperine promotes the apoptosis of skin squamous cancer cells through the Keap1/Nrf2/ARE pathway [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2022, 39: 296-305.
- 6 Liu CX, Chen SL, Xiao XH, et al. A new concept on quality marker of Chinese material medica: quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1443-1457.
- 7 Ruan Z, Du P, Jiang YT. Studies on extraction for piperine in *Piper nigrum* L. [J]. J Pharm Res (药学研究), 2015, 34: 442-443.
- 8 Chen SY, Zhao DD, Zeng XY, et al. Ultrasonic extraction piperine from *Piper nigrum* L. [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2017, 56: 932-934.
- 9 Yan HY, Zou CC. Progress and prospect of application of traditional Chinese medicine fingerprint (specific chromatogram) in Chinese Pharmacopoeia (2010-2020) [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2022, 42(1): 150-155.
- 10 Wang ZY, Wang T, Zhang F, et al. Optimization of extraction process white pepper by response surface methodology [J]. China Food Addit (中国食品添加剂), 2021, 32(2): 76-82.
- 11 Pan PC, Chen XF, Shen W, et al. Optimization of the compound herbalsimachiae extraction process based on orthogonal experiment and response surface method [J]. J Pharm

- Pract(药学实践杂志),2020,38(1):27-34.
- 12 Pernía-Espinoza AV, Ordieres-Meré JB, Martínez-de-Pisón FJ, et al. TAO-robust back propagation learning algorithm [J]. Neural Netw,2005,18:191-204.
 - 13 Tang SL,Zhang XX. Research on early-warning and evaluation of traditional Chinese medicine industry security based on BP neural network [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药),2017,48:406-418.
 - 14 Zhou SM,Liu B. Application of fingerprint similarity software of traditional Chinese medicine in “Pharmaceutical Analysis” teaching[J]. Teach For Reg(林区教学),2020(1):23-26.
 - 15 Wang H,Zou CC,Yan HY. Box-Behnken response surface method combined with fingerprint to optimize the extraction process of total anthraquinone from cassia seeds [J]. J Hainan Med Univ(海南医学院学报),2022,28:507-515.
 - 16 Jiao HY,Li YF,Xie XY. Extraction process optimization for piperine based on Plackett-Burman and Box-Behnken response surface design [J]. China Pharm(中国药师),2020,23:2389-2394.
 - 17 Liu X,Hou SC,Gu L. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of piperine [J]. Anhui Agric Univ(安徽农业科学),2015,43:281-284.
 - 18 Yang YC,Yang L,Duan YX, et al. Optimization of preparation of triterpenoid ointments from *Dischidia chinensis* by using response surface methodology [J]. Chin J Trop Agric(热带农业科学),2022,42(1):75-83.
 - 19 Shen MJ. Progress in application of artificial neural network in the study of traditional Chinese medicine and production [J]. Shandong Chem Ind(山东化工),2016,45(16):50-52.
 - 20 Fu Y,Lin Q,Liu P. Research and application of improved BP neural network algorithm [J]. Comput Digit Eng(计算机与数字工程),2019,47:1037-1041.
 - 21 Yang M,Deng L,Hou HL. Rapid determination of piperine in pepper [J]. Stand Quail Light Ind(轻工标准与质量),2019(6):90-91.
 - 22 Lin YG. Improvement of detection method of piperine content [J]. Value Eng(价值工程),2017,36(24):174-175.
 - 23 Wang XL. Study on the extraction and antioxidant activity of piperine from *Piper nigrum* [J]. China Condiment(中国调味品),2017,42(9):51-54.
 - 24 Andrade KS, Trivellin G, Ferreira SRS. Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods [J]. J Supercrit Fluids, 2017,128:370-377.
 - 25 Dutta S,Bhattacharjee P. Nanoliposomal encapsulates of piperine-rich black pepper extract obtained by enzyme-assisted supercritical carbon dioxide extraction [J]. J Food Eng,2017,201:49-56.
 - 26 Liu X. Study on extraction, purification and functional activity of piperine [D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学),2016.
 - 27 Jia HJ,He Y,Chen Y, et al. Multi-index optimization of water extraction process of Siwu Decoction by BP neural network combined with entropy weight method [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2019,50:4313-4319.
 - 28 Wang JL,Liu XX,Wei SC, et al. Prediction of critical flux and pressure of enzymolysis extraction-ultrafiltration purification for fibrous rhizome herbs based on BP neural network [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:586-590.