

# Box-Behnken 响应面设计联合 LS-SVM 数学模型优化经典名方涤痰汤的有效成分提取工艺

陈思邈 李旭冉 张宇燕 金伟锋 陶水良 丁志山 陈伟燕

浙江中医药大学 杭州 310053

**摘要:** [目的] 通过 Box-Behnken 响应面设计联合最小二乘支持向量机(least squares-support vector machine, LS-SVM)数学模型,优化涤痰汤有效成分的提取工艺。[方法] 以涤痰汤中 5 种有效成分(辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚)的总提取量为评价指标,在乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度等单因素考察的基础上,利用 Box-Behnken 响应面法,设计四因素三水平试验,通过 LS-SVM 数学模型构建,预测涤痰汤有效成分的最佳提取工艺。[结果] 涤痰汤的最佳提取工艺为乙醇浓度 55%、液料比 10:1 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )、提取时间 88 min、提取温度 65  $^{\circ}\text{C}$ ,且模型预测值与实验值相对误差为 0.57%,吻合度高。[结论] Box-Behnken 响应面设计联合 LS-SVM 数学模型可用于涤痰汤的提取工艺优化,所得最佳提取工艺稳定可行。LS-SVM 数学模型的应用也为传统中药及复方中药制剂的开发研究提供了新的方法。

**关键词:** 涤痰汤;响应面法;最小二乘支持向量机;辛弗林;橙皮苷;新橙皮苷; $\alpha$ -细辛醚; $\beta$ -细辛醚

中图分类号:R331 文献标志码:A 文章编号:1005-5509(2022)06-0613-10

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.06.006

**Box-Behnken Response Surface Design Combined with LS-SVM Mathematical Model to Optimize the Extraction Process of Effective Components of the Classic Famous Prescription Ditan Decoction** CHEN Simiao, LI Xuran, ZHANG Yuyan, et al Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053), China

**Abstract:** [Objective] To optimize the extraction process of effective components of Ditan Decoction through Box-Behnken response surface design combined with least squares-support vector machine(LS-SVM) mathematical model. [Methods] The total extraction of 5 effective components(synephrine, hesperidin, neohesperidin,  $\alpha$ -asarone,  $\beta$ -asarone) in Ditan Decoction were used as the evaluation indicators. On the basis of single factor investigation such as ethanol concentration, liquid-to-material ratio, extraction time and extraction temperature, the Box-Behnken response surface method was used to design a 4-factor 3-level test, and the experimental results were constructed through the LS-SVM mathematical model to predict the optimal extraction process of the effective components of Ditan Decoction. [Results] The optimal extraction process of Ditan Decoction was ethanol concentration 55%, liquid-to-material ratio 10:1 ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ), extraction time 88 min, extraction temperature 65  $^{\circ}\text{C}$ , and the relative error between the predicted value of the model and the measured value was 0.57%, indicating high consistency. [Conclusion] Box-Behnken response surface design combined with LS-SVM mathematical model can be used to optimize the extraction process of Ditan Decoction, and the obtained optimal extraction process is stable and feasible. The application effect of the LS-SVM mathematical model also provides a new method for the development and research of traditional Chinese medicine and compound preparations.

**Key words:** Ditan Decoction; response surface methodology; least squares support vector machine; synephrine; hesperidin; neohesperidin;  $\alpha$ -asarone;  $\beta$ -asarone

涤痰汤源于明代《奇效良方》,组分包含胆南星、橘红、石菖蒲、茯苓、枳实等 9 味药<sup>[1]</sup>,具有涤痰开窍、利气补虚之功效,能开窍醒神治其标;同时补气渗湿化痰,使湿无所聚,痰无所生,以固其本<sup>[2]</sup>,主治中风、痰迷心窍、舌强不能言。临床加减化裁后常用于中风<sup>[3]</sup>、抑郁<sup>[4]</sup>、痴呆<sup>[5]</sup>,以及冠心病<sup>[6]</sup>、肺部疾病<sup>[7-8]</sup>等属于痰涎壅盛的疾病的治疗,均取得了较好的临床疗效。现代临床用药通常保留经典涤痰汤组方中橘红、枳

实、石菖蒲等组分<sup>[9-12]</sup>。研究也表明这些延用药物及其有效成分均具有较强的药理作用,如橘红、枳实中的辛弗林、新橙皮苷等能促进脂质代谢<sup>[13-14]</sup>;橙皮苷具有抗病毒、抗菌、消炎、抗氧化等作用<sup>[15]</sup>,石菖蒲挥发油中的 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚等能显著抗栓塞,保护心肌、血管细胞,改善血管功能等<sup>[16]</sup>。这些活性物质在复方疗效中起了重要作用,在中药材、中药提取物、中药制剂研究中常作为指标性成分,用于作用机制和质量

基金项目:国家自然科学基金项目(81774230);浙江省自然科学基金项目(LY21H270012)

Fund projects: National Natural Science Foundation Project(81774230); Natural Science Foundation Project of Zhejiang Province(LY21H270012)

通信作者:陈伟燕,E-mail: chenweiyuan19@sina.com

标准的建立控制研究。为深入开展对经典名方涤痰汤的开发研究,本研究选用方中具有较强生物活性,并作为药品质量控制指标性成分的辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚的总提取量为评价指标,优化涤痰汤提取工艺,为进一步开展古代经方中药复方制剂的制剂工艺和药效物质基础研究奠定基础。

响应面设计在优化中药制剂提取工艺方面广泛运用,能有效优化提取工艺条件,减少实验次数,提高效率。支持向量机(support vector machine, SVM)是建立在统计学基础上的数学模型,特别适用于复杂的中小型数据集分类,能有效解决非线性及高维模式识别问题。而最小二乘支持向量机(least squares-support vector machine, LS-SVM)由SVM改进而来<sup>[17]</sup>,将不等式约束变为等式约束,使算法的复杂度大大减小<sup>[18]</sup>。本研究采用Box-Behnken响应面设计实验,以涤痰汤中5个成分的总提取量为指标,联合LS-SVM数学模型,以期更有效地优化涤痰汤提取工艺。

## 1 材料和方法

**1.1 仪器** Waters e2695高效液相色谱系统和Empower软件购于美国沃特世公司;FA2104型电子分析天平购于上海舜宇恒平科学仪器有限公司;JP-040超声波清洗机购于深圳洁盟清洗设备有限公司;Milli-Q Integral超纯水仪购于德国默克密理博公司;Matlab 2015b软件为美国迈斯沃克软件公司产品。

**1.2 药物和试剂** 姜半夏、麸枳实、茯苓、化橘红、石菖蒲、党参、竹茹均购于浙江中医药大学中药饮片有限公司(批号:200701、200801、200801、200901、200701、200901、200201),甘草、胆南星均购于浙江中医药大学杭州滨江门诊部(批号:20201028、20210401),均符合2020年版中国药典(一部)相应药材项下的质量标准要求;橙皮苷对照品、新橙皮苷对照品均购于上海源叶生物科技有限公司(批号:Z31J6L2067、M03J8S39169);辛弗林对照品、 $\alpha$ -细辛醚对照品、 $\beta$ -细辛醚对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司(批号:MUST-19101716、MUST-20051401、MUST-19112611);甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购于美国天地有限公司(批号:21075219、21075218);无水乙醇(分析纯)购于杭州双林化工试剂有限公司(批号:20210915);磷酸(分析纯)购于深圳西陇科学股份有限公司(批号:1708301);水为超纯水。

## 1.3 方法

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱为SunFire C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 4%A; 5~10 min, 4%A→20%A; 10~25 min, 20%A→30%A; 25~40 min, 30%A→60%A; 40~45 min, 60%A→65%A),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10  $\mu$ L,柱温30  $^{\circ}$ C,波长220 nm。

### 1.3.2 溶液制备

**1.3.2.1 对照品溶液制备** 精密称取各对照品适量,以甲醇定容至5 mL,得到质量浓度分别为0.800、10.000、10.000、1.200、0.200 mg·mL<sup>-1</sup>的辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚储备液。精密量取上述储备液,混匀后加甲醇并定容至5 mL,制成质量浓度分别为0.096、1.200、1.200、0.144、0.024 mg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**1.3.2.2 供试品溶液制备** 按涤痰汤处方比例称取50 g药材粉末,过40目筛,加10倍80%乙醇,55  $^{\circ}$ C超声提取60 min,0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤,得到供试品溶液。

### 1.3.3 测定方法建立

**1.3.3.1 系统适用性试验** 分别吸取1.3.2.1和1.3.2.2项下的混合对照品溶液和供试品溶液适量,按1.3.1项下色谱条件分析。

**1.3.3.2 线性关系考察** 分别吸取1.3.2.1项下储备液,以甲醇梯度稀释制成辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚5种成分系列梯度的对照品溶液,然后按1.3.1项下色谱条件分析,分别对峰面积(Y)和质量浓度(X)进行线性回归,得到回归方程。

**1.3.3.3 精密度试验** 取同一浓度的混合对照品溶液,按1.3.1项下色谱条件连续6次进样分析,记录5个主要成分的峰面积,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值。

**1.3.3.4 重复性试验** 取同一批样品6份,按1.3.2.2项下方法制备供试品溶液,按1.3.1项下色谱条件进样分析,记录5个主要成分的峰面积,计算RSD值。

**1.3.3.5 稳定性试验** 取样品适量,按1.3.2.2项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别于0、1、2、4、6、8、12 h进样分析,计算5个主要成分峰面积的RSD值。

**1.3.3.6 加样回收试验** 取已知含量的供试品6份,每份50 g,按1.3.2.2项下方法制备供试品溶液,加入含辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚质

量浓度分别为0.096、1.200、1.200、0.144、0.024 mg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液,分别进样分析,记录峰面积并计算5个主要成分的平均加样回收率及RSD值。

**1.3.4 涂痰汤提取工艺的单因素实验** 根据现代中药制剂工艺研究要求,制剂制备研究需要根据其药效物质合理有效制定其质量标准,有助于按照国家新药申报要求开展规范开发。中药及其复方制剂在制备提取过程中溶剂浓度、液料比、提取时间、提取温度、提取次数、pH值等是影响制剂质量和药效的重要因素<sup>[19-20]</sup>。其中,溶剂被认为是一个重要参数,它直接影响有效物质的溶解度。结合药品安全性要求和现代制剂工艺制备规范要求,中药制剂常以水和不同浓度的乙醇作为溶剂,本研究根据涂痰汤中各指标成分的理化性质特点,根据相似相溶原理,采用乙醇作为提取溶剂,并结合文献<sup>[21-23]</sup>和预试验结果,选取乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度、提取次数等影响较大的几个因素,采用Box-Behnken响应面设计合理的水平,优化涂痰汤的制剂制备工艺。

按照涂痰汤处方比例分别精密称取每份样品50 g,过40目筛,固定其他因素不变,以单因素乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度、提取次数不同水平的实验条件下制备各供试品溶液,分别测定涂痰汤中5个主要成分的浓度,并计算提取量(mg·5g<sup>-1</sup>),考察各影响因素的不同水平对涂痰汤主要成分总提取量的影响。

**1.3.5 Box-Behnken响应面设计优化涂痰汤提取工艺** 以单因素试验为基础,同时考虑到提取次数对提取率的影响不大,本研究选取乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)为因素,通过Design-Expert软件进行Box-Behnken响应面设计。

### 1.3.6 LS-SVM优化涂痰汤提取工艺

**1.3.6.1 模型的仿真及参数寻优** 利用LS-SVM,以等式约束替代原来的不等式约束,在保证精度的前提下,将复杂的非线性问题转化为对线性矩阵的求解<sup>[24]</sup>。利用Matlab 2015b软件,以乙醇浓度( $x_1$ )、液料比( $x_2$ )、提取时间( $x_3$ )、提取温度( $x_4$ )为4个提取工艺数据,设涂痰汤中5种有效成分辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚的总提取量为Y。考虑数据量,本研究采用形式简单、非线性逼近能力强的径向基核函数(radial basis function, RBF)<sup>[25]</sup>,同时确定核参数g和惩罚因子C,以使LS-SVM模型最优化。两者

与样本密切相关,C值代表了对误差的宽容度,C值越大,允许的误差越小,但C值过大会导致过拟合;C值越小则使模型泛化能力增加,同时对误差的容忍度也越大。核参数g则与样本的输入范围呈正相关,范围越大核参数g取值就越大,反之则相应减小。

**1.3.6.2 条件寻优及结果预测** 得到最优核参数和惩罚因子后,重新利用LS-SVM模型,得到主要成分总提取量预测值。将实际值和预测值进行分析对比,进一步验证预测结果的可信度。最后根据Box-Behnken响应面实验结果结合制剂工艺实际,通过Matlab 2015b软件梯度增设待预测数据集,利用LS-SVM模型进行最优条件的预测。

**1.3.6.3 工艺验证** 按照LS-SVM模型预测的最优条件进行5次平行试验,测定5种成分辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚的总提取量平均值以及RSD值,并与预测值相比较,计算相对误差以验证其可靠性。

## 2 结果

**2.1 系统适用性试验结果** 将混合对照品溶液和供试品溶液进样后结果表明,供试品溶液色谱图中5种主要成分色谱峰的保留时间与混合对照品的保留时间相同,待测成分与其他色谱峰可实现基线分离,分离度>1.5。见图1。

**2.2 线性关系考察结果** 将辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\beta$ -细辛醚、 $\alpha$ -细辛醚5种成分系列梯度的对照品溶液进样分析,分别以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得到回归方程,说明5个对照品在相应浓度范围内线性关系良好。见表1。

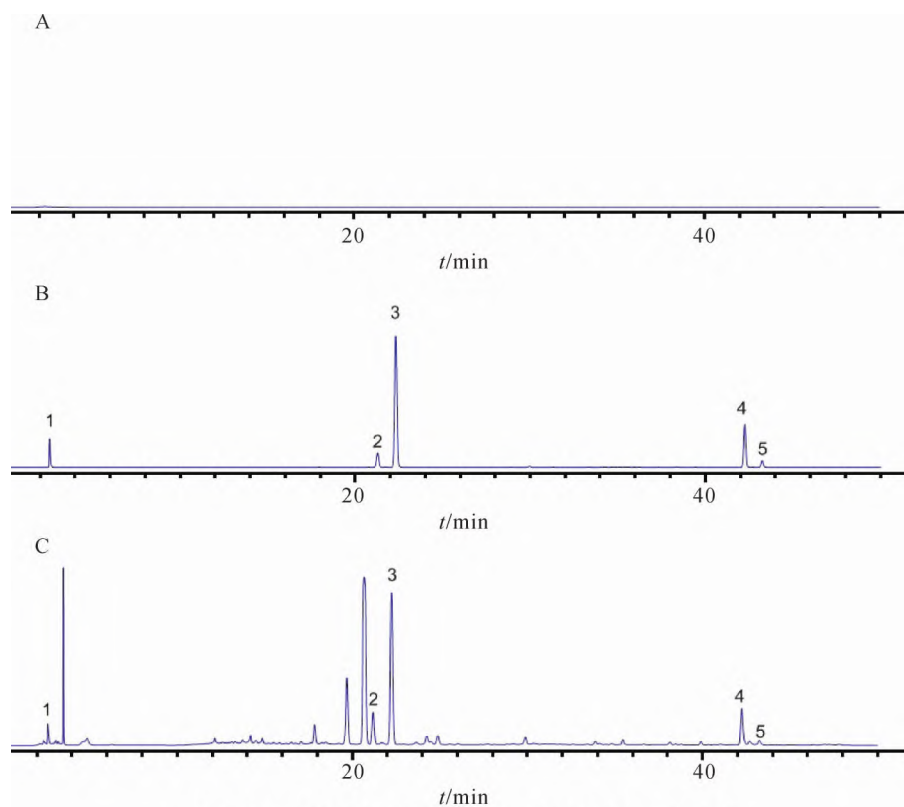
**2.3 精密度试验结果** 取同一浓度的混合对照品溶液,连续6次进样,5个主要成分的峰面积RSD值分别为1.59%、0.48%、0.41%、0.71%和0.69%,表明仪器精密度良好。

**2.4 重复性试验结果** 取同一批样品6份,制备供试品溶液后进样分析,计算得到5个主要成分的峰面积RSD值分别为1.48%、0.70%、0.51%、0.81%和1.23%,表明方法重复性良好。

**2.5 稳定性试验结果** 制备供试品溶液,室温放置,分别于0、1、2、4、6、8、12 h进样分析,结果5个主要成分峰面积RSD值分别为1.98%、1.53%、0.84%、1.34%和1.66%,表明制备的供试品溶液在12 h内较稳定。

**2.6 加样回收试验结果** 取已知含量的供试品6份,





注:A.空白样品;B.混合对照品;C.涤痰汤。1-辛弗林 2-橙皮苷 3-新橙皮苷 4-β-细辛醚 5-α-细辛醚

Note: A. Blank sample; B. Mixed reference; C. Ditan Decoction. 1-synephrine 2-hesperidin 3-neohesperidin 4-β-asarone 5-α-asarone

图1 空白样品、混合对照品和涤痰汤的HPLC图

Fig.1 HPLC diagram of blank sample, mixed reference and Ditan Decoction

表1 回归方程和相关系数

Tab.1 Regression equation and correlation coefficient

成分	回归方程	$R^2$	线性范围( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
辛弗林	$Y=2.050\times 10^4 X+4.573\times 10^4$	0.9991	0.016~0.160
橙皮苷	$Y=1.943\times 10^3 X+4.261\times 10^4$	0.9993	0.200~2.000
新橙皮苷	$Y=1.782\times 10^4 X-3.242\times 10^5$	0.9990	0.200~2.000
β-细辛醚	$Y=4.796\times 10^4 X-2.604\times 10^5$	0.9994	0.024~0.240
α-细辛醚	$Y=4.424\times 10^4 X-5.820\times 10^3$	0.9991	0.004~0.040

制备供试品溶液,加入已知质量浓度的混合对照品溶液,记录峰面积,计算得到5个主要成分的平均加样回收率分别为97.53%、102.47%、99.72%、104.52%和98.09%,RSD值分别为1.79%、1.28%、1.64%、1.90%和1.58%,表明该方法准确性良好。

## 2.7 单因素实验结果

**2.7.1 乙醇浓度对提取效果的影响** 液料比为10:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),提取温度为55℃,提取时间为60 min时,分别检测乙醇浓度35%、50%、65%、80%、95%对主要成

分提取量的影响。见图2a。结果表明,乙醇浓度为50%时提取效果最好。

**2.7.2 液料比对提取效果的影响** 乙醇浓度为50%,提取温度为55℃,提取时间为60 min时,分别检测液料比6:1、8:1、10:1、12:1、14:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )对主要成分提取量的影响。见图2b。结果表明,当液料比为10:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )时,提取效果最好。

**2.7.3 提取时间对提取效果的影响** 乙醇浓度为50%,液料比为10:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),提取温度为55℃时,分

别检测提取时间为45、60、75、90、105 min对主要成分提取量的影响。见图2c。结果表明,提取时间为90 min时,提取效果最好。

**2.7.4 提取温度对提取效果的影响** 乙醇浓度为50%,液料比为10:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),提取时间为90 min时,分别检测提取温度45、55、65、75、85  $^{\circ}\text{C}$ 对主要成分提取量的影响。见图2d。结果表明,提取温度为65  $^{\circ}\text{C}$ 时,提取效果最好。

**2.7.5 提取次数对提取效果的影响** 乙醇浓度为50%,液料比为10:1( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),提取温度为65  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间为90 min时,分别检测提取1、2、3、4次对主要成分提取量的影响。见图2e。结果表明,随着提取次数的增加,提取的主要成分的总含量增加,但当提取次数大于3次时,增势变缓。

**2.8 Box-Behnken响应面设计结果** 以单因素试验为基础,选取乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)为因素,进行Box-Behnken响应面设计,按照四因素三水平分别称取药材50 g,共运行

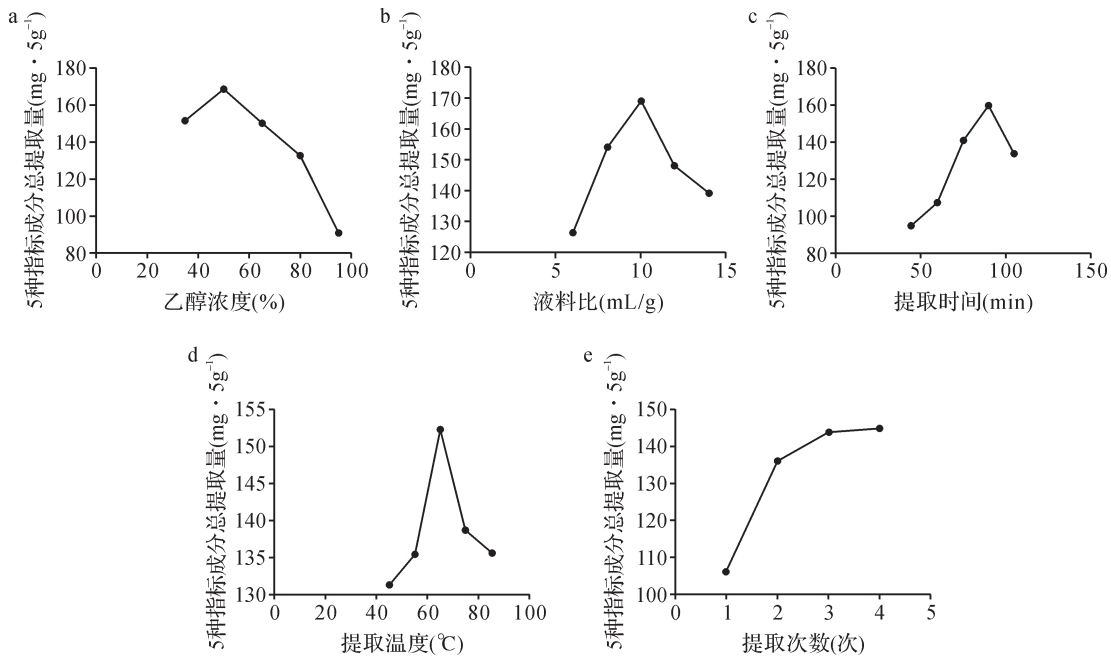
试验30次,因素及水平和实验结果见表2、3。

## 2.9 LS-SVM优化涤痰汤提取工艺结果

**2.9.1 模型的仿真及参数寻优结果** 通过Box-Behnken响应面设计得到30组实验数据。以30行4列的输入变量矩阵和30行1列的输出变量矩阵替代原本30行5列的数据矩阵,导入Matlab 2015b软件(因素水平值代替输入变量)。为了更容易正确收敛得到最优解,对样本数据进行归一化处理,再用Matlab 2015b软件编程以及LS-SVM建模,同时采用RBF函数,最后采用交叉验证方法得到最优核参数 $g$ 为2.5,最优惩罚因子 $C$ 为1.5。见图3。

**2.9.2 预测结果及分析** 得到最优核参数和惩罚因子后,重新利用LS-SVM模型,可以得到30组Box-Behnken Design分析方案的主要成分总提取量预测值。见表4。

利用均方误差(mean-square error, MSE)评估LS-SVM模型性能,公式如下:



注:a.乙醇浓度对5种主要成分总提取量的影响;b.液料比对5种主要成分总提取量的影响;c.提取时间对5种主要成分总提取量的影响;d.提取温度对5种主要成分总提取量的影响;e.提取次数对5种主要成分总提取量的影响。

Note: A. Effect of ethanol concentration on the total extraction volume of the five main components; B. Effect of liquid-to-material ratio on the total extraction volume of the five main components; C. Effect of extraction time on the total extraction volume of the five main components; D. Effect of extraction temperature on the total extraction volume of the five main components; E. Effect of extraction times on the total extraction volume of the five main components.

图2 不同因变量对5种主要成分总提取量的影响

Fig.2 Effects of different dependent variables on the total extraction volume of the five main components

表2 Box-Behnken实验设计的因素及水平  
Tab.2 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

水平	因素			
	A (%)	B(mL·g <sup>-1</sup> )	C(min)	D(°C)
-1	35	8:1	75	55
0	50	10:1	90	65
1	65	12:1	105	75

表3 Box-Behnken实验设计及结果  
Tab.3 Box-Behnken experimental design and results

组数	A (%)	B (mL·g <sup>-1</sup> )	C(min)	D(°C)	5 种主要成分提取量(mg·5g <sup>-1</sup> )					总提取量 (mg·5g <sup>-1</sup> )
					辛弗林	橙皮苷	新橙皮苷	β-细辛醚	α-细辛醚	
1	0	0	-1	-1	3.354	65.679	86.502	4.522	0.619	160.675
2	0	0	1	-1	3.016	65.057	85.317	4.126	0.469	157.985
3	-1	0	0	-1	2.383	58.629	68.156	4.639	0.458	134.265
4	1	0	0	-1	2.906	60.596	68.114	5.290	0.776	137.682
5	0	-1	0	-1	2.061	49.972	80.848	5.286	0.993	139.161
6	0	1	0	-1	2.498	50.619	61.220	5.560	0.934	120.830
7	-1	-1	0	0	3.430	74.008	75.921	4.605	0.689	158.653
8	-1	1	0	0	3.847	84.623	57.761	5.104	0.739	152.074
9	1	1	0	0	3.314	75.510	62.270	5.046	0.798	146.939
10	1	-1	0	0	2.992	73.537	76.246	4.887	0.681	158.343
11	0	0	0	0	4.220	73.736	79.432	5.813	1.110	164.311
12	0	0	0	0	4.224	4.224	78.669	4.640	0.996	165.301
13	0	1	1	0	2.807	68.152	87.069	4.817	0.639	163.484
14	0	-1	1	0	3.495	67.547	71.500	4.613	0.909	148.064
15	0	0	0	0	4.429	75.022	79.003	4.832	0.877	164.163
16	0	-1	-1	0	2.868	67.610	69.751	4.850	1.131	146.211
17	0	0	0	0	4.644	78.541	77.082	4.383	1.001	165.651
18	0	1	-1	0	2.841	61.145	77.872	4.773	1.009	147.640
19	1	0	-1	0	2.866	67.496	76.528	4.995	1.121	153.006
20	1	0	1	0	2.731	56.527	69.561	4.513	1.058	134.390
21	0	0	0	0	4.557	76.850	77.914	4.288	0.862	164.471
22	-1	0	-1	0	1.830	38.579	51.027	3.772	0.708	95.915
23	-1	0	1	0	1.752	38.026	50.027	3.368	0.669	93.843
24	0	0	0	0	4.629	77.198	78.223	4.688	0.882	165.620
25	0	0	1	1	2.665	56.455	65.535	3.953	0.907	129.515
26	0	0	-1	1	2.404	57.294	65.409	4.382	1.020	130.509
27	1	0	0	1	2.802	69.624	82.578	5.221	1.172	161.397
28	-1	0	0	1	1.563	30.188	40.693	2.348	0.473	75.264
29	0	1	0	1	2.616	53.501	67.983	4.303	0.896	129.300
30	0	-1	0	1	1.832	36.450	45.348	3.069	0.726	87.425

陈思邈,等: Box-Behnken 响应面设计联合 LS-SVM 数学模型优化经典方涂痰汤的有效成分提取工艺

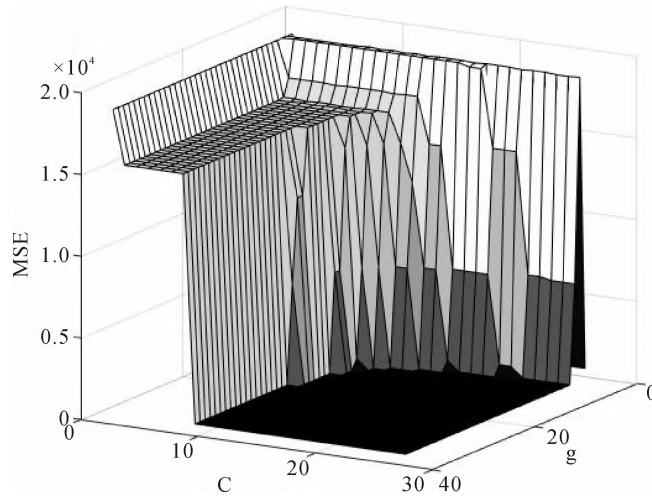


图3 最优参数结果图

Fig.3 Result graph of optimal parameters

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - y_i^*)^2$$

其中,  $n$  表示数据集组数,  $y_i$  表示 LS-SVM 预测值,  $y_i^*$  表示实际值。

最后将 30 组实际值和预测值代入上述公式计算得  $MSE=23.88$ , 得到实验数据和模型预测数据分析对比图。见图 4。表明 30 组实际和预测的总提取量都很接近, 进一步表明模型仿真成功, 拟合接近实际试验数据, 预测效果可信。

**2.9.3 模型的条件寻优及结果预测** 根据 Box-Behnken 响应面实验结果结合制剂工艺实际, 通过 Matlab 2015b 软件梯度增设 88 组待预测数据集, 利用 LS-SVM 模型进行最优条件的预测。最终得到最优的提取条

件是: 乙醇浓度 55%、液料比 10:1 ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ )、提取时间 88 min、提取温度 65  $^{\circ}\text{C}$ , 在此最优条件下预测指标成分总提取量为  $166 \text{ mg} \cdot 5\text{g}^{-1}$ 。

**2.9.4 涤痰汤最优提取条件的工艺验证结果** 按照模型预测的最优提取工艺进行 5 次平行试验, 测定 5 种成分辛弗林、橙皮苷、新橙皮苷、 $\alpha$ -细辛醚、 $\beta$ -细辛醚的总提取量平均值为  $166.958 \text{ mg} \cdot 5\text{g}^{-1}$  (RSD 值为 0.28%)。见表 5。与预测值  $166 \text{ mg} \cdot 5\text{g}^{-1}$  比较, 相对误差为 0.57%, 说明实验值与预测值吻合度高, 预测的涤痰汤最优提取工艺真实、可信。

### 3 讨论

古代经方作为中医处方的典型代表, 是中医药传承的重要手段, 也是中医学代代相传的历史瑰宝。近

表 4 LS-SVM 模型的指标成分总提取量预测值

Tab.4 Predicted value of total extraction amount of index components of LS-SVM model ( $\text{mg} \cdot 5\text{g}^{-1}$ )

组数	总提取量预测值	组数	总提取量预测值	组数	总提取量预测值
1	160	11	165	21	165
2	157	12	165	22	95
3	134	13	163	23	93
4	137	14	148	24	165
5	139	15	165	25	129
6	120	16	146	26	130
7	158	17	165	27	161
8	152	18	147	28	75
9	146	19	153	29	129
10	158	20	134	30	87

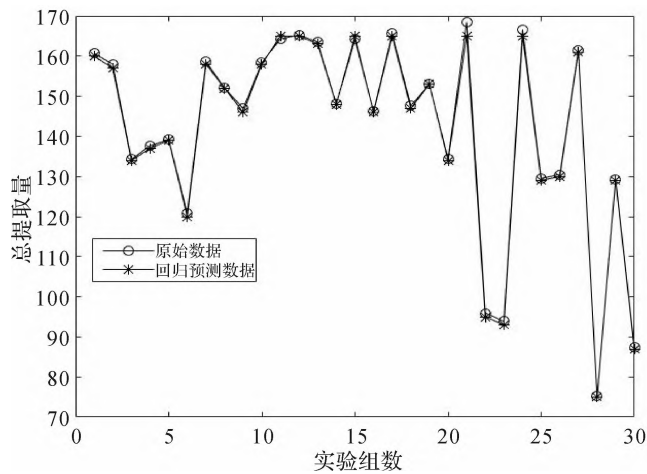


图4 实验数据和模型预测数据分析对比图

Fig.4 Comparison chart of experimental data and model prediction data analysis

表5 按照优化工艺进行的5次平行试验结果

Tab.5 Results of 5 parallel tests carried out according to the optimized process (n=5, mg·5g<sup>-1</sup>)

次数	5 种主要成分提取量					总提取量
	辛弗林	橙皮苷	新橙皮苷	β-细辛醚	α-细辛醚	
1	4.858	71.110	84.660	5.163	0.953	166.745
2	4.840	72.207	84.470	4.923	1.019	167.459
3	4.323	72.095	84.419	5.006	1.044	166.887
4	4.739	73.403	83.258	4.931	1.031	167.362
5	4.760	72.271	83.400	4.885	1.019	166.335
平均值	4.704	72.217	84.042	4.981	1.014	166.958
RSD(%)						0.28

年来,有关中药提取工艺的研究逐渐增多,但多以单味药为主。众所周知,中药中多组分配伍、多种有效成分的相互作用才是其发挥药效的根本,这使得中药成分研究与临床复方用药实际脱节,违背了中药研究的整体性思想<sup>[26]</sup>。因此,探索复方的提取工艺优化十分有必要。新版的中药新药注册办法分四类进行注册申报,分别是中药创新药、中药改良型新药、古代经典名方中药复方制剂、同名同方药。结合现代中药制剂工艺申报对质量标准建立的规范性要求,需要根据药效指标成分开展中药复方制剂工艺的全面研究。涤痰汤作为传统经方,现可考其源于温胆汤和导痰汤,方中半夏、竹茹、枳实、橘红燥湿降气化痰、清热除烦;胆南星善化风痰;石菖蒲具有豁痰开窍、醒神定志之效;茯苓、甘草补气渗湿,使湿无所聚,痰无所生,以固其本,凡痰浊闭阻、气机失畅所致的疾病均适用此

方<sup>[1]</sup>。经历代医学名家朱丹溪、汪昂、沈金鳌等的加减应用和演化,扩大了该方临床应用范围<sup>[27]</sup>,但其作用机制及药效物质基础还未深入研究,迫切需要基于中医整体思维明确其疗效物质,同时对其有效物质提取工艺进行优化。本研究引用了现代数学建模的思路方法,可用于涤痰汤以及其他经典名方中药复方制剂的开发研究,有助于建立制剂质量标准。

响应面设计是一种运用广泛的试验设计优化方法,大大减少试验次数,直接考察影响因素之间的交互作用<sup>[28]</sup>。Box-Behnken响应面设计在中药提取方面的应用已较为普遍,能有效优化工艺条件,提高生产效率。但响应面优化法也存在其局限性,当变量个数比较多以及模型存在很强的非线性时,寻找合适的优化设计会非常困难<sup>[29]</sup>。所以在使用响应面设计之前,必须确定合理的影响因素与水平,设计的实验点应包



括最佳实验条件,这就对前期数据提出较高要求。本研究考察了乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度以及提取次数对有效成分总提取量的影响,结果表明乙醇浓度、液料比、提取时间和提取温度对提取效果的影响更为显著,同时得到了因素的最优水平。以单因素实验为基础,四因素三水平为实验点,利用 Box-Behnken 响应面设计有效运行实验 30 次。

LS-SVM 模型能将小数量样本、高维度等特征问题有效分类<sup>[30]</sup>,降低复杂度,增加求解速度,预测能力强、精度高,在回归估计、模式识别、控制理论以及非线性预测等方面运用广泛<sup>[31]</sup>。RBF 函数具有良好的泛化能力和较快的学习收敛能力,可将多维问题转化为一维问题<sup>[32]</sup>。MSE 被用来反映估计量与被估计量之间的差异程度,值越小,说明模型拟合的精确度越高。本研究在单因素实验和 Box-Behnken 响应面设计基础上,将实验结果联合 LS-SVM 模型,同时采用 RBF 函数,分析预测涤痰汤的提取工艺。结果提示 MSE=23.88,表明拟合效果良好,进一步预测最优提取条件为:乙醇浓度 55%、液料比 10:1 (mL·g<sup>-1</sup>)、提取时间 88 min、提取温度 65 ℃,5 种指标成分总提取量实验值与预测值相对误差为 0.57%,证明该模型真实、可信。

LS-SVM 模型因其显著优势成为继神经网络之后的研究热点,但其在中药提取方面的运用还有待于进一步研究。本研究通过 Box-Behnken 响应面设计联合 LS-SVM 模型预测,优化了涤痰汤的制剂提取工艺,经验证分析其具有较好的拟合预测效果。本研究结果为涤痰汤的开发奠定了较好的基础,有助于深入研究涤痰汤及其制剂的作用机制,同时也证实 Box-Behnken 响应面设计联合 LS-SVM 模型在优化中药复方制剂提取工艺上具有较好的有效性、实用性,为中药新药开发、制剂工艺研究提供了创新性方法。

#### 参考文献:

#### References:

- [1] 康蕾,杨仁义,陈思睿,等.《奇效良方》辨治中风病学术思想探析[J].中国中医急症,2020,29(6):1095-1097,1117.  
KANG Lei, YANG Renyi, CHEN Siyao, et al. A brief analysis of the academic thought of differentiating and treating stroke in *Miraculous Prescriptions*[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2020, 29(6):1095-1097, 1117.
- [2] 崔海,王可.涤痰汤治疗中风病的研究进展[J].中医药导报, 2010, 16(6):131-133.  
CUI Hai, WANG Ke. Ditan decoction advances in the

- treatment of stroke[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2010, 16(6):131-133.
- [3] 孟繁霞,王爱雨,王贵卿.涤痰汤加减治疗中风病 103 例[J].山东中医杂志,2002,21(9):531-532.  
MENG Fanxia, WANG Aiyu, WANG Guiqing. 103 cases of apoplexy treated by Ditan Decoction[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2002, 21(9):531-532.
- [4] 黄侃,陈眉,裘涛,等.涤痰化痰汤防治急性脑卒中后抑郁的临床研究[J].上海中医药杂志,2011,45(11):51-53,59.  
HUANG Kan, CHEN Mei, QIU Tao, et al. Clinical research on "Ditan Huayu Decoction" in preventing and treating post-stroke depression[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2011, 45(11):51-53, 59.
- [5] 郑素玉.涤痰汤对血管性痴呆患者认知水平及血同型半胱氨酸的影响[J].按摩与康复医学,2020,11(12):52-54.  
ZHENG Suyu. Effects of Ditan Decoction on cognitive level and blood homocysteine in patients with vascular dementia[J]. Chin Manip Rehabil Med, 2020, 11(12):52-54.
- [6] 张瑞娟,任胜洪,石燕芳,等.加味涤痰汤治疗颈动脉粥样硬化合并痰瘀互结型高血脂血症的临床研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(11):1752-1756.  
ZHANG Ruijuan, REN Shenghong, SHI Yanfang, et al. Clinical study on Jiawei Ditan Decoction in the treatment of carotid atherosclerosis complicated with phlegm and blood stasis type hyperlipidemia[J]. Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovasc Dis, 2020, 18(11):1752-1756.
- [7] 沈海霞,李应宏,郝文婕,等.解毒祛瘀涤痰汤联合化疗治疗非小细胞肺癌患者临床效果观察[J].内科,2020,15(4):383-386.  
SHEN Haixia, LI Yinghong, HAO Wenjie, et al. Observation on the clinical effect of Jiedu Quyu Ditan decoction combined with chemotherapy for treating patients with non-small cell lung cancer[J]. Intern Med, 2020, 15(4):383-386.
- [8] 周倩倩.清热涤痰汤辅助治疗呼吸机相关性肺炎 32 例[J].中医研究,2020,33(7):22-24.  
ZHOU Qianqian. Adjuvant treatment of 32 cases of ventilator-associated pneumonia with Qingre Ditan decoction[J]. Tradit Chin Med Res, 2020, 33(7):22-24.
- [9] 陈芳芳,唐艳,李海峰.涤痰汤加减治疗痰浊瘀阻证青年急性缺血性脑卒中的疗效及对认知功能的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2021,19(12):1980-1983.  
CHEN Fangfang, TANG Yan, LI Haifeng. Effect of modified Ditan Decoction on acute ischemic stroke in youths with phlegm turbidity and stasis syndrome and its effect on cognitive function[J]. Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovasc Dis, 2021, 19(12):1980-1983.
- [10] 仇卫锋,雒军强.瓜蒌薤白半夏汤合涤痰汤加减治疗痰浊闭阻型冠心病心绞痛的效果及对氧化应激指标、ET-1、NO、cTnI、VWF 水平的影响[J].临床医学研究与实践,2021,6(29):150-152.  
QIU Weifeng, LUO Junqiang. Effect of modified Gualou

- Xiebai Banxia decoction and Ditan decoction on angina pectoris of coronary heart disease with phlegm-turbid obstruction type and its influences on oxidative stress indexes, ET-1, NO, cTnI and vWF levels[J].*Clin Res Pract*,2021,6(29):150-152.
- [11] 梅鲜鲜,李正富,杜羽,等.范永升教授涤痰开窍法治疗系统性红斑狼疮脑病[J].*浙江中医药大学学报*,2020,44(3):255-258.
- MEI Xianxian, LI Zhengfu, DU Yu, et al. Professor FAN Yongsheng's treatment of systemic lupus erythematosus encephalopathy with eliminating phlegm and resuscitation[J].*J Zhejiang Chin Med Univ*,2020,44(3):255-258.
- [12] 倪璐,蒋涛,张闻东,等.涤痰汤加减配合针刺治疗卒中后吞咽障碍痰瘀阻络证的临床疗效[J].*中国实验方剂学杂志*,2021,27(18):101-106.
- NI Lu, JIANG Tao, ZHANG Wendong, et al. Clinical effect of modified Ditan Tang combined with acupuncture on syndrome of phlegm and blood stasis blocking collaterals of dysphagia after apoplexy[J].*Chin J Exp Tradit Med Form*,2021,27(18):101-106.
- [13] 陈志远,田光辉.辛弗林的制备方法及其药理作用研究进展[J].*江苏调味副食品*,2019(1):14-16.
- CHEN Zhiyuan, TIAN Guanghui. Preparation methods and pharmacological effects of Synephrine[J].*Jiangsu Condi Subs Food*,2019(1):14-16.
- [14] 谢琪,吴逸群,雷敏.新橙皮苷的体内外糖脂代谢调节作用与影响机制分析[J].*科学养生*,2020,23(1):282,288.
- XIE Qi, WU Yiqun, LEI Min. Analysis of the regulatory effect and influence mechanism of Neohesperidin on glucose and lipid metabolism in vitro and in vivo[J].*Regimen*,2020,23(1):282,288.
- [15] 曹铭希.陈皮中橙皮苷的提取及其药理活性的研究进展[J].*中国医药指南*,2012,10(12):452-454.
- CAO Mingxi. Research progress on extraction of hesperidin from *Pericarpium Citri Reticulatae* and its pharmacological activity[J].*Guid China Med*,2012,10(12):452-454.
- [16] 刘家欣,王丹,刘森,等. $\alpha$ -细辛醚和 $\beta$ -细辛醚在心脑血管病中的作用及机制研究进展[J].*现代生物医学进展*,2019,19(9):1797-1800.
- LIU Jiaxin, WANG Dan, LIU Sen, et al. Research progress of the effects and mechanisms of alpha-asarone and beta-asarone in cardio-cerebrovascular diseases[J].*Prog Mod Biomed*,2019,19(9):1797-1800.
- [17] SEHRA S K, BRAR Y S, KAUR N, et al. Software effort estimation using FAHP and weighted kernel LSSVM machine[J].*Soft Comput*,2019,23(21):10881-10900.
- [18] 邱忠超,张卫民,高玄怡,等.基于 PSO-LSSVM 的疲劳裂纹漏磁定量识别技术[J].*北京理工大学学报*,2018,38(11):1101-1104,1140.
- QIU Zhongchao, ZHANG Weimin, GAO Xuanyi, et al. Quantitative identification of magnetic flux leakage of fatigue crack based on PSO-LSSVM[J].*Trans Beijing Inst Technol*,2018,38(11):1101-1104,1140.
- [19] YU P, LI Q, FENG Y M, et al. Extraction and analysis of six effective components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by deep eutectic solvents (DES) combined with quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) method[J].*Molecules*,2021,26(5):1310.
- [20] 于凤琳,袁丹,陈宇,等.高效液相色谱法同时测定牡蒿叶中 4 个绿原酸类成分含量[J].*浙江中医药大学学报*,2021,45(6):675-684.
- YU Fenglin, YUAN Dan, CHEN Yu, et al. Simultaneous determination of four chlorogenic acids in *Artemisia Japonica* Thunb. leaves by HPLC[J].*J Zhejiang Chin Med Univ*,2021,45(6):675-684.
- [21] 李绍林,王光明,颜仁梁,等.石菖蒲挥发油 SFE-CO<sub>2</sub> 萃取工艺的优化[J].*中成药*,2017,39(7):1518-1521.
- LI Shaolin, WANG Guangming, YAN Renliang, et al. Optimization of SFE-CO<sub>2</sub> extraction process for volatile oil of *Acorus calamus* [J].*Chin Tradit Pat Med*,2017,39(7):1518-1521.
- [22] 徐坤勇,郭建忠,颜娟,等.响应曲面法优化败毒散提取工艺[J].*中国现代中药*,2021,23(11):1975-1981.
- XU Kunyong, GUO Jianzhong, YAN Juan, et al. Response surface methodology for optimization of extraction process of Baidu San[J].*Mod Chin Med*,2021,23(11):1975-1981.
- [23] 张璐,范杰平,曹婧,等.响应面法优化枳实中辛弗林的超声辅助提取工艺[J].*食品科学*,2011,32(14):1-5.
- ZHANG Lu, FAN Jieping, CAO Jing, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction process for synephrine from *Citrus aurantium* fruit by response surface methodology[J].*Food Sci*,2011,32(14):1-5.
- [24] 张启龙,韩耀图,龚宁,等.基于 LS-SVM 的渤海油田防砂设计优化方法研究[J].*石油机械*,2021,49(1):110-117.
- ZHANG Qilong, HAN Yaotu, GONG Ning, et al. Optimization of sand control in Bohai oilfield based on LS-SVM[J].*China Petrol Mach*,2021,49(1):110-117.
- [25] 黄昊,胡永峰.基于采样点局部密度的径向基函数核宽度确定方法及其在装备设计中的应用范例[J].*军事运筹与系统工程*,2016,30(4):58-64.
- HUANG Hao, HU Yongfeng. Radial basis function kernel width determination method based on local density of sampling points and its application example in equipment design[J].*Military Oper Res Syst Eng*,2016,30(4):58-64.
- [26] 刘文龙,赵靖,李原华,等.中药宏观质量的评价与控制理论体系的建立与应用研究[J].*中草药*,2021,52(3):613-620.
- LIU Wenlong, ZHAO Jing, LI Yuanhua, et al. Study on establishment and application of evaluation and control theory system of holistic quality of traditional Chinese medicine[J].*Chin Tradit Herb Drug*,2021,52(3):613-620.

(下转第 628 页)

- Med Univ, 2019, 43(9):959-961, 965.
- [8] GAO Q, YANG M, ZUO Z. Overview of the anti-inflammatory effects, pharmacokinetic properties and clinical efficacies of arctigenin and arctiin from *Arctium lappa* L.[J].Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(5):787-801.
- [9] ZHOU B, WENG G, HUANG Z, et al. Arctiin prevents lps-induced acute lung injury via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in mice[J].Inflammation, 2018, 41 (6): 2129-2135.
- [10] ZHANG S, CHU C, WU Z, et al. IFIH1 contributes to M1 macrophage polarization in ARDS[J].Front Immunol, 2021, 11:580838.
- [11] ZHONG N S, YANG Z F, JIANG M, et al. A potential Chinese medicine granule suppressing ARDS of COVID-19: Keguan-1 [J].Chin J Integr Med, 2020, 26 (11):803-804.
- [12] ZELOVÁ H, HOŠEK J. TNF-α signaling and inflammation: Interactions between old acquaintances[J].Inflamm Res, 2013, 62(7):641-651.
- [13] YU X, LAN P, HOU X, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1β production via suppressing the NF-κB pathway and ROS production[J].J Hepatol, 2017, 66(4):693-702.
- [14] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Interleukin (IL-6) immunotherapy[J].Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(8):a028456.
- [15] CAI B, GAN X, HE J, et al. Morin attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation through inhibition of PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway[J].Int Immunopharmacol, 2018, 63:198-203.
- [16] HE S, FU Y, YAN B, et al. Curcumol alleviates the inflammation of nucleus pulposus cells via the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway and delays intervertebral disk degeneration[J].World Neurosurg, 2021, 155:e402-411.
- [17] LI S T, DAI Q, ZHANG S X, et al. Ulinastatin attenuates LPS-induced inflammation in mouse macrophage RAW264.7 cells by inhibiting the JNK/NF-κB signaling pathway and activating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J].Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(8):1294-1304.
- [18] FAN S, QI D, YU Q, et al. Intermedin alleviates the inflammatory response and stabilizes the endothelial barrier in LPS-induced ARDS through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway[J].Int Immuno Pharmacol, 2020, 88:106951.
- [19] ZHOU Y, YANG Y, LIANG T, et al. The regulatory effect of microRNA-21a-3P on the promotion of telocyte angiogenesis mediated by PI3K (P110α)/AKT/mTOR in LPS induced mice ARDS[J].J Transl Med, 2019, 17 (1): 427.
- (收稿日期:2022-03-06)
- 
- (上接第622页)
- [27] 丁瑞丛,杨怡然,刘玲,等.涤痰汤源流探析[J].中国中医基础医学杂志, 2018, 24(3):308-309, 314.  
DING Ruicong, YANG Yiran, LIU Ling, et al. Analysis of the origin of Ditan Decoction[J].J Basic Chin Med, 2018, 24(3):308-309, 314.
- [28] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索, 2015, 34(8):41-45.  
LI Li, ZHANG Sai, HE Qiang, et al. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J].Res Explor Lab, 2015, 34(8):41-45.
- [29] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3):236-240.  
WANG Yongfei, WANG Chengguo. Theory and application of response surface method[J].J CUN(Nat Sci Edit), 2005, 14(3):236-240.
- [30] 蔡力钢,李海波,杨聪彬,等.基于改进VMD和自适应BSA优化LS-SVM的刀具磨损状态监测方法[J].北京工业大学学报, 2021, 47(1):10-23.  
CAI Ligang, LI Haibo, YANG Congbin, et al. Tool wear state recognition model based on modified variational mode decomposition and LS-SVM with the adaptive backtracking search algorithm[J].J Beijing Univ Technol, 2021, 47(1):10-23.
- [31] 张伟,吴丹,李小奇,等.基于最小二乘支持向量机的大坝应力预测模型[J].水利与建筑工程学报, 2011, 9(1):26-29.  
ZHANG Wei, WU Dan, LI Xiaoqi, et al. Dam's stress prediction model based on LS-SVM method[J].J Water Resour Archit Eng, 2011, 9(1):26-29.
- [32] 王凯迪,李迪,冷杨松,等.基于径向基函数神经网络模型的车门结构多目标优化[J].山东理工大学学报(自然科学版), 2021, 35(2):77-82.  
WANG Kaidi, LI Di, LENG Yangsong, et al. Multi-objective optimization of door structure based on RBF neural network model[J].J Shandong Univ Technol(Nat Sci Edit), 2021, 35(2):77-82.
- (收稿日期:2021-11-02)