

应用人工神经网络—遗传算法优化多西紫杉醇微球制备工艺参数

张纪兴¹, 程国华^{2*}, 庞廷媛², 胡泽丽²(1.广东药学院, 广州 510006; 2.广州医学院附属肿瘤医院, 广州 510095)

摘要: 目的 优化多西紫杉醇壳聚糖微球的制备工艺参数。方法 应用人工神经网络对微球制备工艺参数与考察指标之间的关系进行模型拟合, 并结合遗传算法优化微球的制备工艺参数。结果 模型参数优化结果为: 壳聚糖浓度 3.730 8%、乳化剂用量 0.500 4 g、油水体积比 1.843 3、药载比 25.027 7、交联剂用量 2.246 5 mL、搅拌乳化时间 63.419 1 min、搅拌速率 611.922 8 r·min⁻¹。考察指标预测结果是: 微球的载药量 43.653 8%、粒径 8.168 5 μm、跨距 0.594 0。验证实验数据

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B031404013)

作者简介: 张纪兴, 男, 副教授 Tel: (020)39352117 E-mail: jxzh1998282@163.com *通信作者: 程国华, 男, 主任药师
Tel: (020)83598100 E-mail: ghcheng661203@126.com

与网络模型优化结果基本吻合。**结论** 应用人工神经网络建模结合遗传法寻优, 可以实现多西紫杉醇壳聚糖微球制备工艺参数的优化。

关键词: 多西紫杉醇; 壳聚糖微球; 人工神经网络; 遗传算法

中图分类号: R943.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0147-06

Application of Artificial Neuralnetwork and Genetic Algorithm to the Process Parameters Optimization of Docetaxel Chitosan Microspheres

ZHANG Jixing¹, CHENG Guohua^{2*}, PANG Tingyuan², HU Zeli²(1.Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2.Affiliated Tumour Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize process parameters of docetaxel chitosan microspheres. **METHODS** The preparation was selected by $L_{18}(3^7)$ orthogonal design, and a mathematical model of relationship between the independent variables and dependent variables was established by using back-propagation(BP) artificial neural networks(ANN) and the process parameters were optimized with genetic algorithm(GA). **RESULTS** The optimum process parameters GA-predicted was established as follows: 3.730 8% as concentration percentage of chitosan, 0.500 4 g as amount of emulsifier, 1.843 3 as volume percentage ratio of organic phase to water phase, 25.027 7 as drug loading ratio, 2.246 5 mL as volume of glutaral, 63.419 1 min as duration of rotation and 611.922 8 $r \cdot min^{-1}$ as rotation speed with the maximum drug loading 43.65 38%, the minimum span dispersity 0.594 0, and 8.168 5 μm as the mean diameter of docetaxel chitosan microspheres. Bias between observed and predicted values of the drug loading, the mean diameter and span dispersity of Docetaxel chitosan microspheres had no significant difference. **CONCLUSION** The multi-objective simultaneous optimization of process parameters in docetaxel chitosan microspheres preparation could be achieved by combining BP ANN modeling with GA. The models developed in this study were proved to be predictable and feasible.

KEY WORDS: docetaxel; chitosan microspheres; artificial neural network; genetic algorithm

多西紫杉醇(docetaxel)是一种半合成紫杉类抗肿瘤的化疗药物。研究表明, 多西紫杉醇可用于治疗多种癌症如乳腺癌、肺癌^[1-2]。但该药在体内分布广泛, 临床使用上亦出现不少不良反应^[3-4]。

若制备成粒径适宜的微球制剂, 静注后微球被肺毛细血管床以机械滤过方式截留, 药物从微球中释放浓集于靶区, 就可以使其具有肺靶向性, 从而达到提高疗效, 降低不良反应的目的^[5]。壳聚糖(chitosan)由于其生物可降解性、相容性、分解产物无毒性等一系列优点成为目前常用的微球载体材料^[6]。本研究采用壳聚糖制备多西紫杉醇肺靶向微球, 以期临床合理开发应用多西紫杉醇提供参考。

影响微球制备的工艺参数较多, 且呈现复杂的非线性关系, 采用传统的统计-回归方法较难确定最佳的制备工艺。而基于人工智能的神经网络则很适于处理这类复杂的多变量非线性系统, 并可通过网络的预测能力实现多因素的同步优化^[7]。本研究用正交设计制定实验方案获取原始数据, 将人工神经网络建模和遗传算法寻优相结合, 进行多西紫杉醇壳聚糖微球制备工艺参数的优化研究, 现报道如下。

1 材料与仪器

壳聚糖(DAC>92%, 黏度55 mPa·s, Sigma-C3646, 批号: 20080602); 多西紫杉醇(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 26070906, 含量>99.3%); 甲醇(Fisher Scientific, 色谱级); 液状石蜡(天津市富宇精细化工有限公司); 25%戊二醛(上海凌峰化学试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯, 超纯水为实验室自制。

LC-20AT 型高效液相色谱仪, SPD-20A 型检测器(日本岛津); LC solution 色谱工作站(日本岛津); BT125D Sartorius 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); XSZ-7G 生物显微镜及枪型夜视摄像机(重庆光学仪器厂); RW20DZM n 强力流线型搅拌机(IKA, 德国); GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 5810 台式高速离心机(EPPENDORF, 德国)。

2 方法和结果

2.1 乳化-化学交联法制备微球

称取壳聚糖粉末0.3 g, 加入3%醋酸溶液至10 g, 溶胀形成壳聚糖醋酸溶液; 称取处方量多西紫杉醇粉末溶于适量无水乙醇中, 超声至完全溶解, 形成多西紫杉醇无水乙醇溶液。将多西紫杉醇无

水乙醇溶液加入壳聚糖醋酸溶液中，搅拌混合均匀，作为水相；称取司盘-80 0.6 g，加入25 mL液状石蜡中，作为油相。高速搅拌下将水相缓慢加至油相中，使其形成稳定的W/O乳剂，再逐渐滴加25%的戊二醛，交联固化3 h，停止搅拌。所得初产品离心分离，异丙醇洗涤2次，将离心液与洗涤液收集为合并液，所得微球置真空干燥器中放置48 h，即得淡棕色微球粉末。

2.2 微球载药量和包封率的测定

精密称取 5 mg 微球于 5 mL 离心管中，加入 0.5 mL 二氯甲烷，涡漩 2 min，再加入纯化水 4.5 mL，涡漩 2 min，3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，滤液作为供试品溶液，进行 HPLC 分析，计算载药量。载药量=(测得的微球内的药量/微球的总量)×100%。

色谱条件：色谱柱为 Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水(68：32)；流速为1.0 mL·min⁻¹；柱温为40 ℃；紫外检测波长为229 nm；进样量为10 μL。多西紫杉醇在0.50~5.03 mg·mL⁻¹内呈良好的线性关系，标准曲线回归方程为： $Y=1.736 \times 10^{-6}X+0.1098$ ， $r=0.9999$ 。

2.3 微球粒径、跨距的测定计算

取微球产品适量，用光学显微镜观察，记数300个以上，计算平均粒径和跨距^[8]。

2.4 实验设计和结果

本研究通过预试验，先进行单因素考察，初步确定了影响微球制备的主要因素水平。选取对

微球性质影响较显著的以下 7 个因素作为考察对象：壳聚糖浓度($X_1/\%$)、乳化剂用量(X_2/g)、油水体积比($X_3/mL:mL$)、药载比($X_4/mg:mg$)、交联剂用量(X_5/mL)、搅拌乳化时间(X_6/min)、搅拌速率($X_7/r \cdot min^{-1}$)，按正交表 $L_{18}(3^7)$ 安排实验，各因素水平安排见表 1。

表 1 正交设计水平因素表

Tab 1 Factor level in orthogonal designing test

水平	因素						
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	2.00	0.40	1.50	50.00	1.50	30	600
2	3.00	0.60	2.50	33.33	2.00	60	900
3	4.00	0.80	3.50	25.00	2.50	90	1 200

多西紫杉醇壳聚糖微球的质量可通过微球的载药量、粒径、跨距等指标来综合衡量，这些指标同等重要，在适宜粒径范围跨距越小越优，载药量越大越优^[9]。采用 Hassan 法，对其进行综合评分，得总评“归一值”(Overall Desirability, OD)^[10]。为避免几何平均值 OD 值多处于零，在各个归一值计算的分子分母项统一加上校正值得 δ (本实验 δ 取 0.2%)，公式如下：①对于越小越好的效应： $d_{\min}=(y_{\max}-y_i+\delta)/(y_{\max}-y_{\min}+\delta)$ ；②对于越大越好的效应： $d_{\max}=(y_i-y_{\min}+\delta)/(y_{\max}-y_{\min}+\delta)$ ；③对于设定在某特定值最佳的效应(本实验最佳平均粒径设定为 8.5 μm)，在此采用公式： $d_o=1/(y_{\max}-y_{\min})^{|y_i-y_o|}$ ；④ $OD=(d_1d_2 \cdots d_n)^{1/n}$ ， $n=7$ ，实验结果见表 2。

表 2 实验安排表及结果

Tab 2 Experiment design and results

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	载药量/%	粒径/μm	跨距	OD
1	2.00	0.40	1.50	50.00	1.50	30	600	24.83	5.45	1.01	0.161 8
2	2.00	0.60	2.50	33.33	2.00	60	900	17.35	4.99	1.01	0.113 3
3	2.00	0.80	3.50	25.00	2.50	90	1 200	8.80	5.78	1.41	0.005 2
4	3.00	0.40	1.50	33.33	2.00	90	1 200	19.63	7.72	1.15	0.433 9
5	3.00	0.60	2.50	25.00	2.50	30	600	11.05	5.17	1.21	0.069 1
6	3.00	0.80	3.50	50.00	1.50	60	900	33.77	6.08	1.01	0.247 1
7	4.00	0.40	2.50	50.00	2.50	60	1 200	22.96	7.30	1.01	0.414 3
8	4.00	0.60	3.50	33.33	1.50	90	600	7.28	7.95	0.88	0.060 0
9	4.00	0.80	1.50	25.00	2.00	30	900	9.38	7.08	0.87	0.205 0
10	2.00	0.40	3.50	25.00	2.00	60	600	14.29	6.05	1.01	0.156 4
11	2.00	0.60	1.50	50.00	2.50	90	900	32.29	5.67	0.67	0.244 7
12	2.00	0.80	2.50	33.33	1.50	30	1 200	21.87	4.27	1.01	0.105 8
13	3.00	0.40	2.50	25.00	1.50	90	900	25.23	8.48	1.01	0.489 5
14	3.00	0.60	3.50	50.00	2.00	30	1 200	33.37	4.41	1.01	0.132 2
15	3.00	0.80	1.50	33.33	2.50	60	600	15.58	7.14	0.58	0.386 7
16	4.00	0.40	3.50	33.33	2.50	30	900	17.81	7.80	1.39	0.199 9
17	4.00	0.60	1.50	25.00	1.50	60	1 200	15.20	7.77	1.15	0.387 0
18	4.00	0.80	2.50	50.00	2.00	90	600	23.82	3.55	1.35	0.056 5

2.5 神经网络建模

2.5.1 BP 神经网络模型建立 人工神经网络, 是以实验数据为基础, 经过有限次迭代计算而获得的一个反映实验数据内在规律的数学模型, 特别适合于研究复杂非线性系统的特性。BP 神经网络是最具代表性的误差反向传播的多层前馈式网络^[11], 已经证明具有三层结构的单隐层 BP 网络能够逼近任何有理函数, 并且非线性映射能力较强^[12]。因此, 本研究采用三层 BP 人工神经网络建模以建立存在于实验数据间的函数关系, 示意图见图 1。

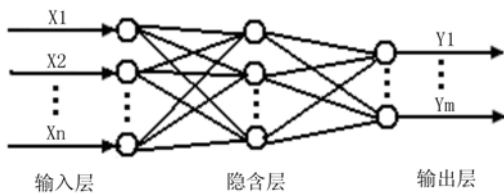


图 1 含一个隐含层的 BP 神经网络模型结构示意图
Fig 1 Delineation of structure of a back-propagation artificial neural network model with one hidden layer

2.5.2 训练和检验样本采集和选择 本研究采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排 7 因素 3 水平的实验, 得到

表 3 第 13 个实际样本产生的 8 个虚拟样本
Tab 3 Virtual samples from the 13th sample

No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	3.01	0.401	2.505	25.05	1.503	90.2	901.8
2	3.01	0.401	2.505	24.96	1.497	89.8	898.4
3	3.01	0.399	2.496	25.05	1.503	89.8	898.4
4	3.01	0.399	2.496	24.96	1.497	90.2	901.8
5	2.99	0.401	2.496	25.05	1.497	90.2	898.4
6	2.99	0.401	2.496	24.96	1.503	89.8	901.8
7	2.99	0.399	2.505	25.05	1.497	89.8	901.8
8	2.99	0.399	2.505	24.96	1.503	90.2	898.4

对于一定数量的样本, 随机选取若干训练样本和检验样本, 网络训练检测结果往往不理想。根据影响因素的分析, 由内插外推原则^[13], 假设 $p=[k|\max(x_i)k \text{ 或 } k|\max(y_i)k,$

$k=1,2,\dots,np]$ 和 $q=[k|\min(x_j)k \text{ 或 } k|\min(y_j)k,$
 $k=1,2,\dots,np]$, 其中, $i=1,2,\dots,n_{in}, j=1,2,\dots,n_{out}$ 。

若记 p 和 q 的并集为 $S=p \cup q = \{k:(k \in p) \vee (k \in q)\}$, 那么检验样本 k , 应该满足 $k \notin S$, 这样就可以保证检验样本的子空间包容于训练样本的子空间之内, 避免了外推现象。

2.5.3 网络训练和预测 根据内插外推原则, 在

了如表 2 所示的 18 个基本样本数据。但是, 为了建立可信的神经网络模型, 需要大量样本数据进行训练, 为此引入了虚拟样本^[13-15]。即在实际的生产实验过程中, 由于原料、操作条件、测量仪器本身等的限制, 各输入变量的值和实际值必然会有微小的误差, 这种误差是正常的, 不可避免的, 那么在此误差范围内的输入值应该对应相同的输出值。这样, 对网络的输入分别按 $\pm \Delta i$, $i=1,2,3,\dots,7$ 波动, 进行搭配。这样, 每个实际输入样本就可以产生 2^7 个虚拟样本, 18 个基本实验样本数据可以产生 9×2^7 个虚拟样本。根据正交实验设计的原则, 18×2^7 个虚拟样本没有必要全部参与训练。采用 $L_8(2^7)$ 正交设计实验表, 只需对每一个实际样本产生 8 个虚拟样本就可以代表全部 2^7 个虚拟样本^[13]。如表 3 为 OD 值最高的第 13 个实际样本产生的 8 个虚拟样本。这样, 本研究的 18 个实际实验样本加上各自的虚拟样本, 使参加神经网络训练和检验的样本达到 162 个, 加大了训练样本空间的样本密度, 强化了训练过程中的记忆效果, 致使在实际样本的附近区域不会产生大的波动。

上述采集的样本中, 避开综合评分最低和最高的第 3、13 组实验样本和虚拟样本, 在其余 16 组中任选各组的 2 个样本, 共计 32 个样本作为人工神经网络的检验样本, 其余则作为人工神经网络的训练样本, 应用 MATLAB 软件进行人工神经网络的训练和预测。其中, 设定 BP 人工神经网络训练循环次数 `net.trainParam.epochs` 为 100, 训练误差目标 `net.trainParam.goal` 为 0.000 000 3, 学习率 `net.trainParam.lr` 为 0.1, 训练过程和结果见图 2。由结果可见, 经过 9 次训练后, 网络误差达到了设定的最小值。

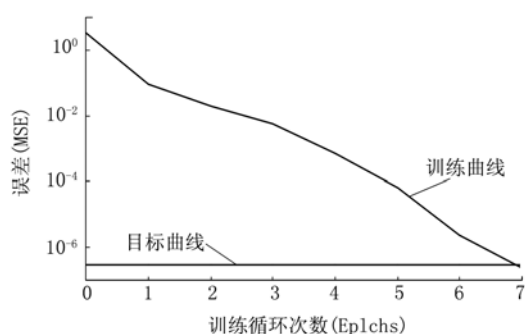


图2 BP 人工神经网络的训练过程

Fig 2 Training process for BP artificial neural networks

网络训练完毕, 用检验样本检验训练效果, 结果见图 3。由结果可知, BP 人工神经网络的预测输出与测试值非常接近。

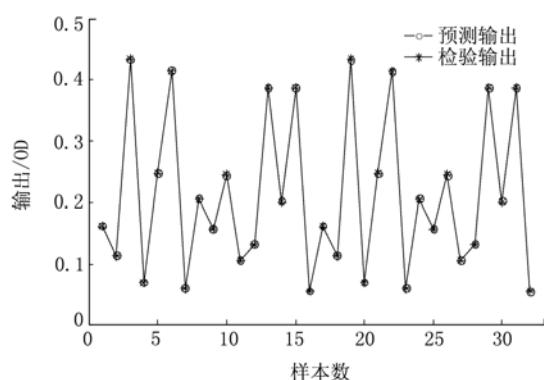


图3 BP 人工神经网络的预测输出

Fig 3 Test output of BP artificial neural networks

BP 人工神经网络的预测输出与测试值的百分误差, 结果见图 4。由结果可知, 该神经网络模型的预测误差小于 0.025%, 表明用 BP 人工神经网络建立了非常准确的微球制备工艺参数与其评价指标之间关系的模型。

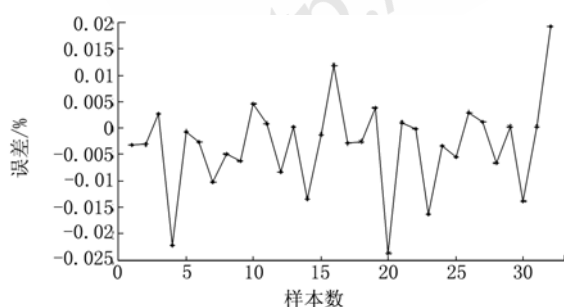


图4 BP 人工神经网络预测误差

Fig 4 Error of BP artificial neural networks

2.6 工艺参数的遗传算法优化

由于人工神经网络建立的是黑箱模型, 无法

用数学方法求最优解, 而遗传算法寻优无需目标函数具备明确的数学表达式, 所以可以用来进行优化计算^[12], 其步骤如下: ①编码, 随机产生 1 个初始种群; ②解码, 将编码后的个体转换成问题空间的决策变量, 并求得个体的适应值; ③按照个体适应值的大小, 从种群中选出适应值较大的一些个体构成交配池; ④由交叉和变异这 2 个遗传算子对交配池中的个体进行操作, 并形成新一代的种群; ⑤反复执行上述步骤②~④, 直至满足收敛判据为止^[16-17]。

本研究应用 MATLAB 软件, 将人工神经网络建模和遗传算法结合来实现多西紫杉醇壳聚糖微球制备工艺参数的多指标同步优化。寻优过程中, 取最大进化代数 maxgen 为 200, 种群大小 sizepop 为 5, 交叉概率 pcross 为 0.6, 变异概率 pmutation 0.2, 在这些参数下运行得到每代种群最优适应度和平均适应度及其变化如图 5 所示。

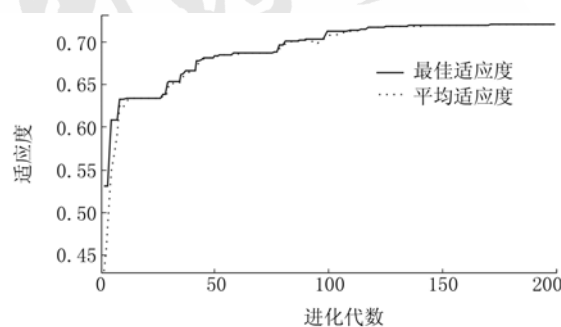


图5 遗传算法寻优轨迹适应度变化曲线

Fig 5 Optimized fitness curve of genetic algorithm

随着进化代数增大, 种群的平均适应度和最优适应度均呈现曲折上升的趋势。最后, 平均适应度向最优适应度方向靠拢, 种群平均适应度趋于平稳状态。表明此时群体中对应于最大适应度 (0.720 5) 的个体已经达到该优化算法的最优解, 优化结果是: 壳聚糖浓度 3.730 8%、乳化剂用量 0.500 4 g、油水体积比 1.843 3、药载比 25.027 7、交联剂用量 2.246 5 mL、搅拌乳化时间 63.419 1 min、搅拌速率 611.922 8 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 多指标优化预测结果是: 微球的载药量 43.653 8%、粒径 8.168 5 μm 、跨距 0.594 0。参照优化工艺参数(即壳聚糖浓度 3.5%、乳化剂用量 0.50 g、油水体积 2.0、药载比 25.0、交联剂用量 2.0 mL、搅拌乳化时间 65 min、搅拌速率 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)制备 3 批微球, 结果见表 4。

表 4 根据优化参数制备微球的载药量、平均粒径、跨距的实测值、预测值及偏差($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 4 Observed and predicted values, bias of drug loading, mean diameter and span of docetaxel chitosan microspheres prepared according to the optimal experimental conditions ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

评价目标	预测值	实测值	偏差/%
载药量/%	43.653 8	41.73±1.78	4.41
平均粒径/ μm	8.168 5	8.37±0.68	-2.43
跨距	0.594	0.60±0.06	-0.74

注: 偏差(%)=(预测值-实测值)/预测值×100 %
Note: Bias(%)=(predicted values-observed values)/predicted values ×100%

可见, 实验数据与优化结果吻合。证明采用 BP 人工神经网络建模和遗传算法寻优, 实现多西紫杉醇壳聚糖微球的制备工艺参数优化可行。

3 讨论

影响多西紫杉醇壳聚糖微球制备的工艺参数与多个评价指标之间呈现非常复杂的非线性关系。本研究利用 MATLAB 软件, 依据工艺参数与评价指标之间的对应关系建立了 BP 人工神经网络模型, 且训练后网络模型的预测值与实验值相对误差很小。再结合遗传算法, 实现了复杂制备工艺参数与多指标的同步优化。

本研究表明, 人工神经网络结合遗传算法是解决工艺参数优化问题的一种有效手段, 可作为解决制剂生产实践过程中存在的多维非线性系统多目标同步优化问题的一种较为有效的参考方法。

REFERENCES

[1] SALOUSTROS E, GEORGOULIAS V. Docetaxel in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(8): 1207-1222.
[2] SALOUSTROS E, MAVROUDIS D, GEORGOULIAS V. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer [J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(15): 2603-2616.
[3] BAKER J, AJANI J, SCOTTE F, et al. Docetaxel-related side effects and their management [J]. Eur J Oncol Nurs, 2008,

12(3): 253-268.
[4] TU Z W, TAO Y F, DONG J, et al. Cytotoxic drugs and its anti-angiogenesis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 618-622.
[5] PING Q N. Modern Pharmaceutics(现代药剂学) [M]. Beijing: Chin Med Sci Press, 1998:652.
[6] ZHANG Z F, ZHOU J P, HUO M R. Chitosan microspheres drug delivery systems [J]. Prog Charm Sci(药学进展), 2006, 30(6): 261-266.
[7] SU Q, XU X H, WU M, et al. The application of artificial neural networks in pharmaceutical research [J]. J Chengdu Med Coll(成都医学院学报), 2007, 2(1): 67-70.
[8] LU B. New Techniques and New Dosage Forms of Drugs(药物新剂型和新技术) [M]. Vol 2. Beijing: People's Med Pub House, 2005: 276-278.
[9] WEI Y, LUO J Y. Preparation of TPP granules using multi-target orthogonal experiment and full probability scores [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1999, 24(5): 23-25.
[10] WU W, CUI G H, LU B. Optimization of multiple variables: application of central composite design and overall desirability [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2000, 35(8):530-533.
[11] XU D, WU Z. Based on MATLAB 6.X system analysis and design-neural networks(基于 MATLAB 6.X 的系统分析与设计—神经网络) [M]. Xi'an: Xi'an Electronic Science and Technology University Press, 2004: 4-24.
[12] MIN X L, LIU G H. The combination of artificial neural network and genetic algorithm applied to modeling and optimization [J]. Appl Res Computers(计算机应用研究), 2002, 19(1): 79-80.
[13] HE X R, CHEN B Z, ZHAO X G, et al. Study on improving testing results of BP neural networks [J]. J Tsinghua Univ (Sci Tech) (清华大学学报: 自然科学版), 1995, 35(3): 31-36.
[14] WANG W D, ZHENG Y J, YANG J Y. Optimizing regularized discriminant analysis in virtual training samples [J]. J Computer-aided Design Computer Graphics(计算机辅助设计与图形学学报), 2006, 18(9): 1327-1331.
[15] WANG W D, YANG J Y. Quadrotic discriminant analysis method based on virtual training sample [J]. Acta Automatica Sini(自动化学), 2008, 34(4): 400-407.
[16] LIU G H, MIN X L, LI W C. A genetic algorithm in MATLAB [J]. Appl Res Computers(计算机应用研究), 2001, 18(8): 80-82.
[17] LIANG K, XIA D C. Genetic algorithm programming by Matlab and optimizing problem solving [J]. Computer Knowledge and Technology(电脑知识与技术), 2007, 3(4): 1049-1051.