

基于响应面耦合遗传算法优化关山樱花黄酮提取工艺及其抗氧化、抗炎作用研究

韩秀枝¹, 曹 源^{1*}, 詹跃勇¹, 秦令祥^{1,2,3}

(1. 漯河食品职业学院, 漯河 462300; 2. 漯河市食品研究院有限公司, 漯河 462300;
3. 河南和生食品有限公司, 漯河 462300)

摘 要: **目的** 优化关山樱花黄酮的提取工艺, 并对其抗氧化、抗炎作用进行研究。**方法** 采用动态高速剪切协同超声辅助提取关山樱花黄酮, 通过响应面法协同遗传算法优化提取工艺参数。同时对 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine, DPPH)自由基和羟基自由基的清除率来评价抗氧化作用, 以对小鼠 RAW264.7 细胞存活率、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)和一氧化氮(NO)含量来评价抗炎作用。**结果** 最佳提取工艺条件为: 剪切转速 14000 r/min、超声功率 450 W、超声时间 30 min, 在此条件下, 关山樱花黄酮得率为 15.91%, 此法的提取效果优于其他 2 种单一的提取方式。关山樱花黄酮对 DPPH 自由基和羟基自由基都有较强的清除作用, 且对 DPPH 自由基、羟基自由基的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为 0.430 mg/mL 和 0.572 mg/mL。关山樱花黄酮能降低小鼠 RAW264.7 细胞存活率及 RAW264.7 细胞释放的 TNF- α 、IL-6 和 NO 的含量, 表明关山樱花黄酮具有一定的抗炎作用。**结论** 该研究获得的关山樱花黄酮具有较强的抗氧化和抗炎作用, 为关山樱花黄酮的开发应用提供了参考。

关键词: 关山樱花; 关山樱花黄酮; 动态高速剪切; 超声波; 遗传算法

Optimization of Kanzan flower flavonoids extraction process based on response surface coupled genetic algorithm methodology and its antioxidant and anti-inflammatory effects

HAN Xiu-Zhi¹, CAO Yuan^{1*}, ZHAN Yue-Yong¹, QIN Ling-Xiang^{1,2,3}

(1. Luohe Vocational College of Food, Luohe 462300, China; 2. Luohe Food Research Institute Co., Ltd., Luohe 462300, China; 3. Henan Hesheng Food Co., Ltd., Luohe 462300, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of Kanzan flower flavonoids and study its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Methods** The dynamic high-speed shear assisted ultrasonic extraction method was used to extract Kanzan flower flavonoids. And the extraction process parameters were optimized using response surface methodology combined with genetic algorithm methodology. At the same time, the antioxidant effect was evaluated by the scavenging rates of 1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine (DPPH) radicals and hydroxyl radicals, the

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(24B630017)、河南省职业院校省级名师培育项目(教职成[2023]14 号)

Fund: Supported by the Key Research Projects in Higher Education Institutions in Henan Province (24B630017), and the Henan Province Vocational College Provincial Famous Teacher Training Project (Jiaozhi Cheng [2023] No.14)

***通信作者:** 曹源, 副教授, 主要研究方向为食品大数据处理及企业管理技术与应用。E-mail: 178601807@qq.com

***Corresponding author:** CAO Yuan, Associate Professor, Intersection of Wenming Road and 107, Yancheng District, Luohe 462300, China. E-mail: 178601807@qq.com

anti-inflammatory effect was evaluated by the survival rate of RAW264.7 cells in mice, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide (NO) content. **Results** The optimum extraction conditions were: Shear speed 14000 r/min, ultrasonic power 450 W, and ultrasonic time 30 minutes. Under these conditions, the yield of *Kanzan* flower flavonoids was 15.91%, and the extraction effect of this method was superior to the other 2 kinds of single extraction methods. *Kanzan* flower flavonoids had strong scavenging ability on DPPH radicals and hydroxyl radicals, and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for DPPH radicals and hydroxyl radicals were 0.430 mg/mL and 0.572 mg/mL, respectively. *Kanzan* flower flavonoids could reduce the survival rate of mouse RAW264.7 cells and the content of TNF- α , IL-6, and NO released by RAW264.7 cells, indicating that it had a certain anti-inflammatory effect. **Conclusion** The obtained *Kanzan* flower flavonoids have strong antioxidant and anti-inflammatory effects, which providing reference for the development and application of *Kanzan* flower flavonoids.

KEY WORDS: *Kanzan* flower; *Kanzan* flower flavonoids; dynamic high-speed shear; ultrasonic; genetic algorithm methodology

0 引 言

关山樱花(*Kanzan* flower), 又称红樱花, 属蔷薇科植物^[1], 广泛种植于我国的四川、山东等地, 叶、花齐开, 人们都很喜爱这种植物^[2]。它既有观赏性还有食用保健价值。研究表明, 樱花具有止咳、润肠的作用, 国家卫健委(2022 年第 1 号)于 2022 年 3 月, 批准关山樱花为新资源食品^[3]。关山樱花含有多种营养成分, 包括黄酮类^[4]、酚类等成分, 其中关山樱花黄酮是关山樱花中含有的一种重要的生物活性成分, 具有抗炎、抑菌、抗氧化等功效^[5-8]。其中, 李乐等^[1]研究了单一的微波辅助法提取关山樱花黄酮的工艺及其抗氧化作用; 李飞阳等^[4]采用 $Al(NO_3)_3$ - $NaNO_2$ - $NaOH$ 显色法测定了关山樱花黄酮的含量, 并研究其对亚硝酸盐的清除作用。目前, 关山樱花的研究主要在种植技术^[9]及观赏性^[10]等方面, 而对它的活性成分研究较少。

常用的植物黄酮提取方法有: 溶剂提取法^[11]、微波辅助法^[12]、超声辅助法^[13]、酶辅助法^[14]、超临界 CO_2 法^[15]等, 这些单一的提取方法都各有优劣, 如溶剂法操作简单、成本低, 但有提取时间长、溶剂消耗大的不足^[16]; 微波辅助法操作简便、提取率高, 但存在提取温度高、功效成分易被破坏的缺点^[17]; 超声辅助法高效、短时, 但对设备要求高^[18]; 酶辅助法条件温和、提取率高, 但对酶的条件要求苛刻^[19]; 超临界 CO_2 法提取时间短、易分离目标产物, 但对设备要求高, 能耗大^[20]。动态高速剪切技术是近年来发展起来的一种新兴提取技术, 它是通过高速旋转的转子在高速运转下, 其底部形成负压, 生成较强的机械剪切和气蚀作用, 促使物料破碎和微粒化, 这种技术具有处理时间短、操作简单的优点^[21-22]; 而超声波技术是利用其空化和机械效应, 破碎植物细胞壁, 具有高效、时间短的优点^[23-24]。二者协同后, 加大了细胞壁的破碎, 更加促使功效成分溶出, 提高得率、缩短时间和节约能耗等优点^[25]。

响应面法, 作为一种统计方法, 具有很高的实验点选择条件, 选不好会造成优化结果很难获得^[26]。遗传算法是一种数学算法, 主要是在全局进行随机搜索, 以获得最优解。它通过模拟生物的进化过程而形成^[27], 其具有全局优化、仿真稳定性好、高效、速度快的优点^[28], 能得到较好的预测和优化效果, 在生物活性物质提取方面具有很大潜力^[29]。将响应面法与遗传算法耦合起来, 既能弥补响应面法的缺陷, 又能发挥遗传算法在全局优化中的优势^[27]。

基于此, 为了解决上述问题, 本研究把动态高速剪切技术与超声辅助法联合使用, 利用协同效应来提取关山樱花黄酮, 通过响应面法耦合遗传算法优化其提取工艺, 并对比不同提取方式对关山樱花黄酮得率的影响, 以期确定最佳提取工艺条件, 同时研究其生物活性, 为关山樱花的进一步精深加工及开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

SPF 级雄性昆明小鼠, 河南斯克贝斯生物科技有限公司[许可证号: SCXK(豫)-2020-0005]。

关山樱花(亳州市广源堂药业有限公司); 芦丁标准品(纯度 $\geq 98\%$, 合肥博美生物科技有限公司); 硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠(分析纯, 天津祥瑞鑫化工有限公司); 维生素 C (vitamin C, VC, 广西南宁市硼能化学有限公司); 1,1-二苯基-2-苦基肼 (1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine, DPPH)(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 小鼠巨噬细胞 RAW264.7、噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]溶液(5 mg/mL)(武汉普诺赛生命科技有限公司); 胎牛血清(江苏科晶生物科技有限公司); 1640 培养基(山东格研生物技术有限公司); 二甲基亚砜(纯度 99.9%, 上海皓鸿生物医药科技有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)[纯度 98%, 金克隆

(北京)生物技术有限公司]; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]; 一氧化氮(NO)检测试剂盒(杭州联科美讯生物医药技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

GS-1 型高速剪切机(沧州鑫科建筑仪器有限公司); ZH-30L 型超声波清洗机[中环北方(北京)仪器仪表有限公司]; KHC200-FAT 型电子天平(精度 0.1 mg, 上海凯鸿称重设备有限公司); YXQ-75S 型立式压力蒸汽灭菌器(金博仕苏州生物技术有限公司); WF-10B 型万能粉碎机(南京凯奥机械有限公司); RE-501 旋转蒸发器(上海科兴仪器有限公司); UV756 紫外可见分光光度计(青岛智汇谷信息有限公司); HD-E804 真空干燥箱(昆山海达精密仪器有限公司); DNG-9140 型鼓风干燥箱(上海铂温仪器有限公司); D180 型 CO₂ 细胞培养箱(瑞沃德生命科技有限公司); KH22R 型高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); PT-3502B 型酶标仪(北京普天新桥技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 关山樱花的前处理

将关山樱花, 清洗干净, 沥水, 放于干燥箱中, 55℃ 烘干, 取出经粉碎机粉碎 10 min, 经 40 目筛分, 得关山樱花粉, 备用。

1.3.2 动态高速剪切协同超声辅助提取关山樱花黄酮

称取一定质量的关山樱花粉→加入一定比例 60%的乙醇溶[液料液比 1:30 (g/mL)]→放入动态高速剪切机中处理 2 min(一定的剪切转速)→然后料液再放入超声波清洗机中超声辅助提取(一定的提取条件)→然后提取液离心分离(6000 r/min, 15 min)→上清液减压浓缩→真空干燥→即得关山樱花黄酮。

1.3.3 关山樱花黄酮得率的测定

参考薛婧等^[30]的方法, 采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色法, 通过芦丁标准曲线和回归方程, 测定并计算关山樱花黄酮得率。关山樱花黄酮得率按式(1)计算:

$$\text{关山樱花黄酮得率}/\% = \frac{C \times V \times n}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中, C-样品质量浓度, mg/mL; V-样品提取液体积, mL; n-稀释倍数; m-提取原料质量, g。

1.3.4 实验设计

(1)单因素实验

准确称取 10.0 g 关山樱花粉, 采用 60%乙醇溶液按照料液比 1:30 g/mL, 依据 1.3.2 的方法进行提取。根据预实验, 选择: 剪切转速(10000、12000、14000、16000 和 18000 r/min)、超声功率(100、200、300、400 和 500 W)、超声时间(20、30、40、50 和 60 min), 在高速剪切处理 2 min, 提取温度

50℃条件下, 研究上述 3 个因素不同水平对关山樱花黄酮得率的影响, 每组实验平行 3 次。

(2)响应面实验

在单因素实验基础上, 选择显著影响因素为自变量, 以关山樱花黄酮得率为响应值, 进行响应面实验。因素与水平见表 1。

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface experiment

水平	因素		
	A(剪切转速)/(r/min)	B(超声功率)/W	C(超声时间)/min
-1	12000	300	30
0	14000	400	40
1	16000	500	50

(3)遗传算法实验

遗传算法是一种非线性优化算法和反复迭代的过程, 遵循优胜劣汰的原则, 适应度低的个体遗传下一代较少, 同时发送变异, 在庞大的后代群体中, 最后获得若干个最优解, 使预测值、优化值与真值无限接近。利用响应面模型当作遗传算法的适应度函数, 对关山樱花黄酮提取工艺进行优化。遗传算法的基本流程如图 1。

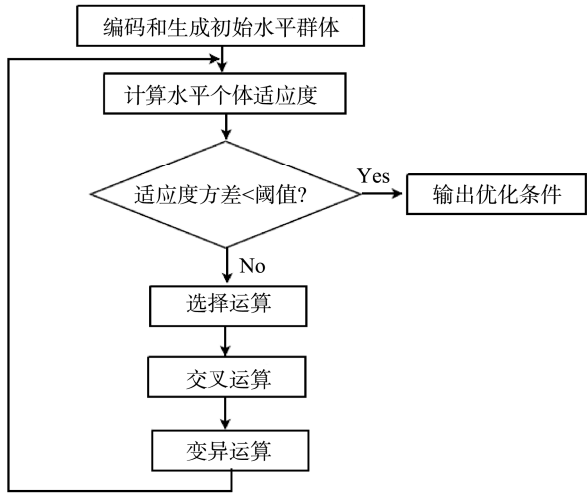


图1 遗传算法流程图

Fig.1 Flowchart of genetic algorithm methodology

本研究以响应面模型为遗传算法的适应度函数, 对提取工艺进行优化。选择一个高斯变异函数, 并向每个个体的每个向量添加一个随机数, 使用秩-量函数根据原始分数对个体拟合。选择随机均匀函数和分散交叉函数进行优化, 采用遗传算法软件优化提取条件。

关山樱花黄酮得率的目标函数如式(2)所示:

$$\text{Maximize } y=f(x); X_i^L \leq X_i \leq X_i^U, i=1,2,\dots,n \quad (2)$$

式中, $f(x)$ -目标函数; x -输入向量; y -关山樱花黄酮得率, %;

X_i^L 和 X_i^U 是 X_i 的上下边界。

遗传算法的约束条件: 选择各因素水平的上下限, 关山樱花黄酮最优的约束条件如式(3)。

$$\begin{cases} 12000 \text{ r/min} \leq X_1 \leq 16000 \text{ r/min} \\ 300 \text{ W} \leq X_2 \leq 500 \text{ W} \\ 30 \text{ min} \leq X_3 \leq 50 \text{ min} \end{cases} \quad (3)$$

1.3.5 不同提取方法的对比实验

为研究动态高速剪切协同超声辅助提取的有效性, 进行了 3 种提取方式的对比实验。其中, 动态高速剪切提取的条件为: 剪切转速 14000 r/min, 高速剪切提取 2 min; 超声提取的条件为: 超声功率 400 W、超声时间 40 min; 动态高速剪切协同超声辅助提取的提取条件为: 剪切转速 14000 r/min、高速剪切提取 2 min, 超声波功率 400 W、超声时间 40 min。以上 3 种方式提取关山樱花黄酮的提取溶剂为: 60%乙醇溶液、料液比 1:30 (g/mL)、提取温度为 50°C。提取后按照 1.3.3 方法测定并计算关山樱花黄酮得率。

1.3.6 关山樱花黄酮的体外抗氧化活性研究

(1) 关山樱花黄酮对 DPPH 自由基清除能力的测定

参照胡建燃等^[31]采用的微孔板法检测 DPPH 自由基清除能力, 于波长 517 nm 处其 OD 值。计算公式如(4)所示:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(\frac{1 - (\text{OD}_1 - \text{OD}_2)}{\text{OD}_3} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中, OD_1 —样品组; OD_2 —样品+乙醇组; OD_3 —DPPH+乙醇组。

(2) 关山樱花黄酮对羟基自由基清除能力的测定

将关山樱花黄酮配制以下质量浓度的溶液: 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mg/mL。以 VC 溶液作为阳性对照组, 于波长 550 nm 处按照说明书要求测其 OD 值。计算公式如(5)所示:

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \frac{\text{OD}_4 - \text{OD}_5}{\text{OD}_4} \times 100\% \quad (5)$$

式中, OD_4 —对照组; OD_5 —测定组。

1.3.7 关山樱花黄酮的体外抗炎活性研究

(1) MTT 实验

在 10%胎牛血清的 1640 培养基中, 接种小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 并于培养箱中培养其至对数生长期(培养条件: 温度 37°C、湿度 90%、CO₂ 浓度 5%), 接种于 96 孔板(细胞密度 4000 个/孔), 继续培养 24 h 后弃去培养基, 加入含不同浓度的关山樱花黄酮的细胞培养基, 继续在 37°C、5% CO₂、90%湿度的培养箱中培养 48 h 后弃去培养基, 每孔中加入 10 μ L MTT 溶液(终质量浓度为 0.5 mg/mL), 在相同条件的培养箱中继续培养 4 h。吸取孔中全部上清液, 防止单层细胞破裂, 每孔加入 100 μ L 的二甲基亚砜溶液, 将板子放在振荡器上以 300 r/min 振荡 10 min 使蓝紫色结晶甲臞全部溶

解, 用酶标仪在 570 nm 处测量吸光度, 计算细胞的存活率。

(2) TNF- α 、IL-6 和 NO 含量的测定

采用地塞米松和不同质量浓度(0.01、0.02、0.04、0.08 mg/mL)的关山樱花黄酮处理 LPS (1 μ g/mL)刺激的巨噬细胞, 其中只用 LPS 刺激的设为 LPS 组, 另设空白对照组(不做任何刺激和处理), 培养细胞 48 h 后, 分别收集培养液, 按照试剂盒说明书上的步骤进行操作, 检测培养基中 TNF- α 、IL-6 和 NO 含量。

1.4 数据处理

数据采用 Design-Expert 12 和 Matlab R2018 遗传算法软件进行统计分析, 每组实验平行 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 剪切转速对关山樱花黄酮得率的影响

随着剪切转速的增加, 关山樱花黄酮得率先升高后降低。当剪切转速为 14000 r/min 时, 关山樱花黄酮得率达到最大值 15.86%。这是由于, 剪切转速的增加, 增大了料液中的剪切作用和气蚀作用^[25], 利于细胞的破碎, 黄酮溶出增多, 得率升高; 当剪切转速超过 14000 r/min 后, 过大的转速会导致料液升温, 黄酮活性部分失活, 得率下降。与彭小燕等^[32]的研究趋势类似。因此, 最终选剪切转速为 14000 r/min。

2.1.2 超声功率对关山樱花黄酮得率的影响

关山樱花黄酮得率随超声功率的增大先升高再降低。400 W 时达到最大值 15.89%。这是因为超声功率增大, 它的空化、机械作用增强, 增大的细胞破壁的程度和数量, 黄酮溶出增多^[33], 得率上升; 当大于 400 W 后, 黄酮结构被过大的超声作用破坏^[34], 得率降低。与黎莉等^[33]研究结果相似。因此, 最终选 400 W 为超声功率。

2.1.3 超声时间对关山樱花黄酮得率的影响

随着超声时间的延长, 关山樱花黄酮得率先升高后降低。在超声时间 40 min 时, 黄酮得率达到最大值 15.87%, 再继续增加超声时间, 得率反而降低。这是由于, 延长超声时间, 超声的振动、空化作用会加剧破碎关山樱花的细胞壁, 使其内部的黄酮溶出, 得率升高^[35]; 但过长的超声时间, 会破坏黄酮的部分结构和活性^[36], 降低得率。与韦福忠^[37]的结果相当。因此, 最终确定超声时间为 40 min。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 回归方程的建立

根据单因素结果, 选取剪切转速(A)、超声功率(B)和超声时间(C)进行响应面分析。实验方案与结果见表 2。

由表 2 的数据拟合, 得到回归方程为: $Y=15.87+0.3638A+0.3513B+0.9975C+0.1275AB+0.335AC+0.31BC-2.39A^2-1.71B^2-2.33C^2$ 。

表 2 响应面实验方案及结果
Table 2 Response surface test design and results

实验号	因素			关山樱花黄 酮得率/%
	A	B	C	
1	-1	-1	0	11.17
2	1	-1	0	11.68
3	-1	1	0	11.59
4	1	1	0	12.61
5	-1	0	-1	10.13
6	1	0	-1	10.15
7	-1	0	1	11.47
8	1	0	1	12.83
9	0	-1	-1	10.78
10	0	1	-1	10.89
11	0	-1	1	12.14
12	0	1	1	13.49
13	0	0	0	15.86
14	0	0	0	15.87
15	0	0	0	15.88
16	0	0	0	15.89
17	0	0	0	15.85

2.2.2 方差分析

由表 3 分析可知, 该实验模型极显著($P<0.0001$); 失拟项不显著($P=0.0529>0.05$), 说明该模型拟合度较好, 误差小; 模型回归系数 $R^2=0.9999$ 。因此, 该模型可用于其提取工艺条件的优化。由显著性分析可知, 一次项、二次项和交互项均极显著($P<0.01$)。根据 F 大小, $F(X_1)=1283.05$, $F(X_2)=1196.38$, $F(X_3)=9648.55$, 各因素影响大小顺序为: $C>A>B$ 。

2.2.3 响应面图分析

由图 2 可知, 剪切转速(A)与超声功率(B)、剪切转速(A)与超声时间(C)、超声功率(B)与超声时间(C)这 3 组的响应

面均较陡峭, 等高线椭圆度均较小, 说明其都有显著的交互作用($P<0.05$), 这与方差分析结果一致。

表 3 响应面模型方差分析结果
Table 3 Analysis of variance results of response surface model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	77.0700	9	8.5600	10379.18	<0.0001
A	1.0600	1	1.0600	1283.05	<0.0001
B	0.9870	1	0.9870	1196.38	<0.0001
C	7.9600	1	7.9600	9648.55	<0.0001
AB	0.0650	1	0.0650	78.82	<0.0001
AC	0.4489	1	0.4489	544.12	<0.0001
BC	0.3844	1	0.3844	465.94	<0.0001
A ²	24.1300	1	24.1300	29244.22	<0.0001
B ²	12.3700	1	12.3700	14989.16	<0.0001
C ²	22.8800	1	22.8800	27737.04	<0.0001
残差	0.0058	7	0.0008		
失拟项	0.0048	3	0.0016	6.37	0.0529
纯误差	0.0010	4	0.0030		
总和	77.0700	16			
R ²	0.9999				
R ² _{Adj}	0.9998				

2.3 遗传算法优化关山樱花黄酮提取工艺参数实验结果

采用遗传算法软件优化提取工艺, 结果见图 3。由图 3 可知, 在运算迭代 135 次, 得率达到最大值, 此时剪切转速、超声功率、超声时间编码分别为-0.9775、0.49、0, 对应因素水平分别为 13955 r/min、449 W、30 min, 此时, 所得关山樱花黄酮理论得率为 15.98%。

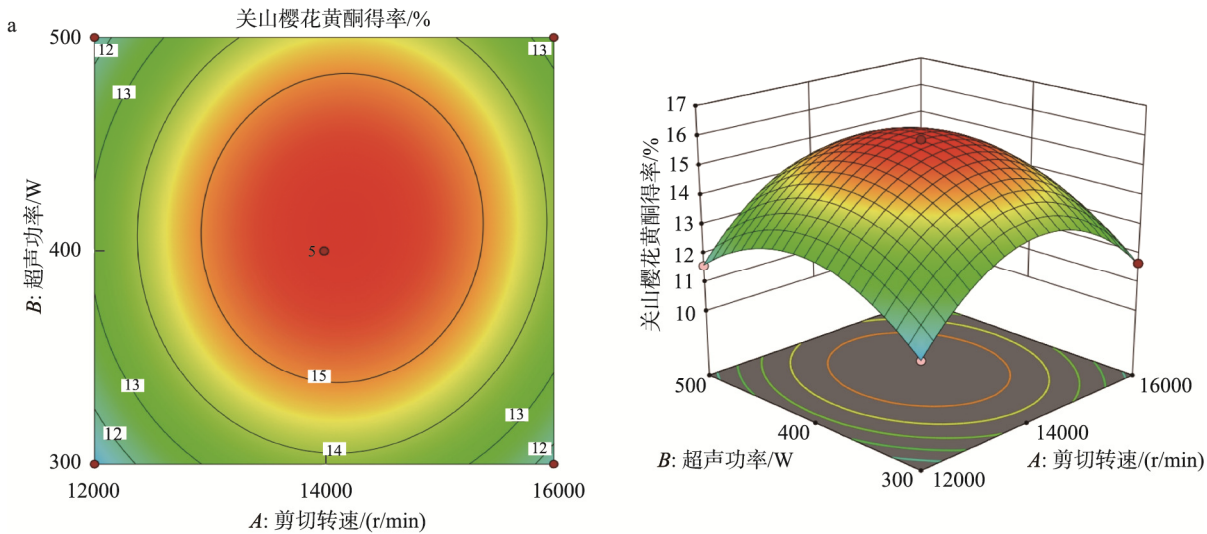


图2 各因素交互作用的响应面与等高线图
Fig.2 Response surface and contour maps of interaction of various factors

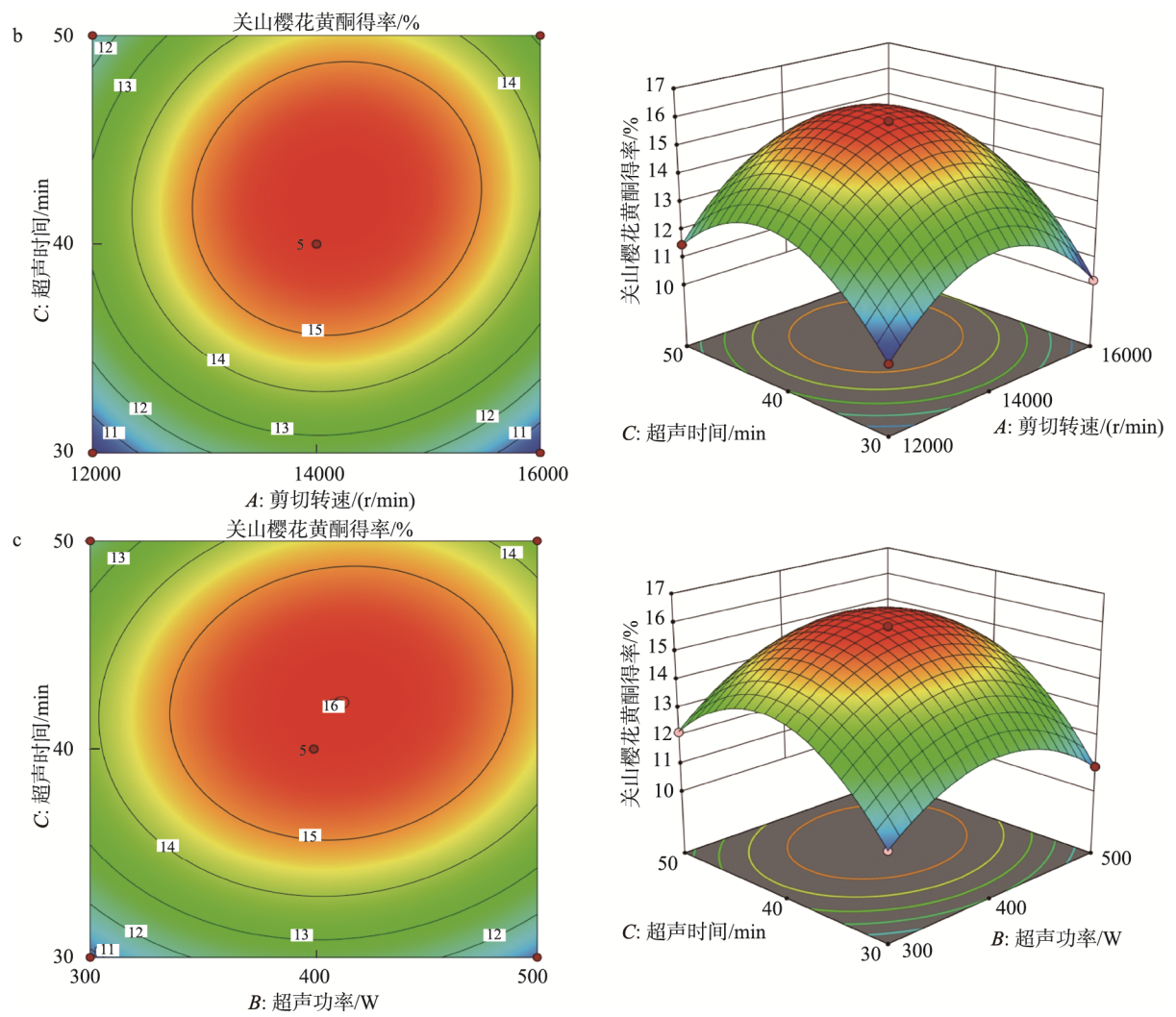


图2(续) 各因素交互作用的响应面与等高线图
Fig.2 Response surface and contour maps of interaction of various factors

2.4 验证实验

采用响应面耦合遗传算法优化提取工艺参数为: 剪切转速 13955 r/min、超声功率 449 W、超声时间 30 min, 在此条件下, 关山樱花黄酮得率的理论值为 15.98%。考虑实际, 修正参数为: 剪切转速 14000 r/min、超声功率 450 W、超声时间 30 min, 在此条件进行 3 次平行实验, 所得关山樱花黄酮得率的平均值为 15.91%, 与理论值相对误差是 0.43%, 表明此法能较好地模拟和预测关山樱花黄酮得率, 进一步证明该方法优化关山樱花黄酮提取工艺参数可行。

2.5 不同提取方式提取关山樱花黄酮得率的对比实验结果

为了研究动态高速剪切协同超声辅助提取的有效性, 进行了 3 种提取方式的对比实验。根据预实验, 设计了表 4 的实验条件, 研究其对关山樱花黄酮得率的影响。

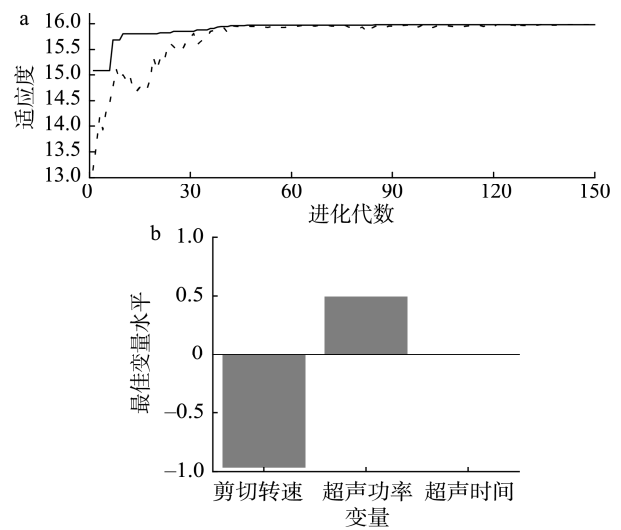


图3 遗传算法优化结果
Fig.3 Results optimized by genetic algorithm methodology

表 4 不同提取方式对关山樱花黄酮得率的影响
Table 4 Effect of different extraction methods on the yield of Kanzan flower flavonoids

提取方式	剪切 转速/(r/min)	剪切 时间/min	提取 时间/min	超声 功率/W	提取 温度/℃	料液比 (g/mL)	关山樱花 黄酮得率/%
动态高速剪切法	14000	2	40	/	50	1:30	9.86±0.39
超声辅助法	/	/	40	400	50	1:30	11.37±0.26
动态高速剪切协 同超声辅助法	14000	/	40	400	50	1:30	15.91±0.47 ^{ab}

注：与高速剪切法相比，^a表示具有显著性差异($P<0.05$)；与超声辅助法相比，^b表示具有显著性差异($P<0.05$)；/表示无此项。

由表 4 可知，动态高速剪切协同超声辅助法提取与 2 种单一提取方法相比，协同法提取所得黄酮得率最高为 (15.91±0.47)%，说明此法提取效果优于其他 2 种单一提取法。

2.6 关山樱花黄酮的抗氧化活性

2.6.1 关山樱花黄酮的 DPPH 自由基清除能力

由图 4 可知，关山樱花黄酮和 VC 对 DPPH 自由基的清除率随质量浓度的增加均增强。当质量浓度为 1.0 mg/mL 时，其清除率分别是 81.58%和 96.23%，关山樱花黄酮比 VC 稍低， IC_{50} 分别为 0.430 mg/mL 和 0.179 mg/mL。表明关山樱花黄酮清除 DPPH 自由基较好，此结果与邵哲等^[38]的研究结果相一致。

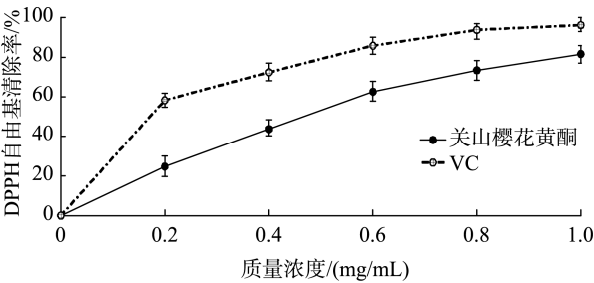


图4 关山樱花黄酮对DPPH自由基的清除能力

Fig.4 Scavenging abilities of Kanzan flower flavonoids to DPPH radicals

2.6.2 关山樱花黄酮的羟基自由基清除能力

由图 5 可知，关山樱花黄酮和 VC 对羟基自由基清除率随浓度的增加而增强。当质量浓度为 1.0 mg/mL 时，其清除率分别是 72.69%和 95.82%，关山樱花黄酮比同浓度的 VC 略低， IC_{50} 分别为 0.572 mg/mL 和 0.292 mg/mL。表明关山樱花黄酮具有较强的羟基自由基清除能力，这与刘俊泽等^[39]的研究结果相一致。

2.7 关山樱花黄酮的抗炎活性分析

2.7.1 关山樱花黄酮对 RAW264.7 细胞的毒性作用

由图 6 可知，当关山樱花黄酮质量浓度高于 0.08 mg/mL 时，细胞存活率急速下降，低于 90%，说明关山樱花黄

酮在质量浓度不超过 0.08 mg/mL 时，对小鼠巨噬细胞无毒性。

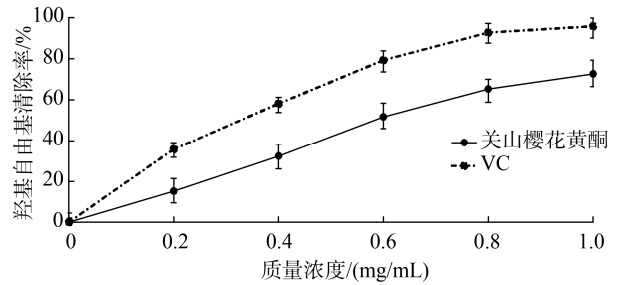


图5 关山樱花黄酮对羟基自由基的清除能力

Fig.5 Scavenging abilities of Kanzan flower flavonoids to hydroxyl radicals

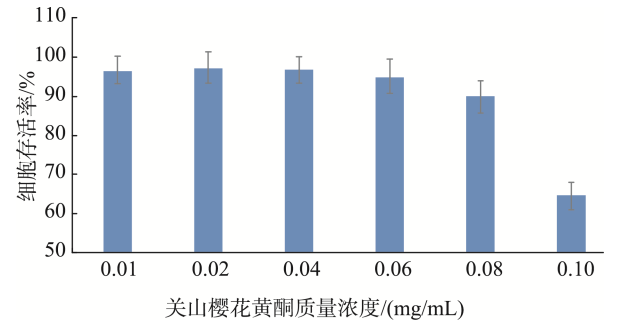


图6 关山樱花黄酮对RAW264.7 细胞存活率的影响

Fig.6 Effects of Kanzan flower flavonoids on the survival rate of RAW264.7 cells

2.7.2 关山樱花黄酮对 RAW264.7 细胞释放促炎症因子的影响

由表 5 可知，与空白对照组相比，单独使用 LPS 处理后的小鼠 RAW264.7 细胞释放的 TNF- α 、IL-6 和 NO 含量明显增加($P<0.01$)，加入地塞米松和关山樱花黄酮后小鼠 RAW264.7 细胞释放的 TNF- α 、IL-6 和 NO 含量明显低于 LPS 组($P<0.05$, $P<0.01$)，且当关山樱花黄酮质量浓度达到 0.08 mg/mL 时，抑制效果最好，说明关山樱花黄酮和地塞米松都具有抗炎活性。

表 5 关山樱花黄酮对 RAW264.7 细胞释放促炎症因子的影响

Table 5 Effects of Kanzan flower flavonoids on the release of pro-inflammatory factors in RAW264.7 cells

组别	TNF- α /(pg/L)	IL-6/(pg/L)	NO/(μ mol/L)
空白对照组	46.95 $\pm$ 8.59	48.56 $\pm$ 6.64	5.76 $\pm$ 0.02
LPS 组	756.58 $\pm$ 10.45 ^{##}	283.39 $\pm$ 10.51 ^{##}	39.23 $\pm$ 0.09 ^{##}
地塞米松组	95.68 $\pm$ 9.87 ^{**}	62.38 $\pm$ 7.25 ^{**}	8.79 $\pm$ 0.03 ^{**}
0.01 mg/mL	645.85 $\pm$ 28.78 [*]	236.87 $\pm$ 10.25 [*]	32.42 $\pm$ 0.08 [*]
0.02 mg/mL	448.63 $\pm$ 12.52 ^{**}	158.68 $\pm$ 11.25 ^{**}	25.27 $\pm$ 0.05 ^{**}
0.04 mg/mL	225.78 $\pm$ 11.28 ^{**}	112.14 $\pm$ 7.35 ^{**}	16.29 $\pm$ 0.06 ^{**}
0.08 mg/mL	102.82 $\pm$ 10.23 ^{**}	67.48 $\pm$ 8.02 ^{**}	12.14 $\pm$ 0.04 ^{**}

注: 与空白对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与模型组(LPS 组)相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

3 结 论

本研究采用动态高速剪切协同超声辅助提取关山樱花黄酮, 并经响应面协同遗传算法优化提取工艺, 确定了最佳提取工艺参数为: 剪切转速 14000 r/min、超声功率 450 W、超声时间 30 min, 在此条件下, 关山樱花黄酮得率为 15.91%, 此法的提取效果优于其他 2 种单一的提取方式。关山樱花黄酮对 DPPH 自由基和羟基自由基都有较强的清除作用, 且对两者的 IC₅₀ 为 0.430 mg/mL 和 0.572 mg/mL。关山樱花黄酮的抗炎实验结果表明: 关山樱花黄酮能降低小鼠 RAW264.7 细胞存活率及 RAW264.7 细胞释放的 TNF- α 、IL-6 和 NO 含量, 表明其有一定的抗炎作用。本研究可为关山樱花黄酮提取及产品开发提供参考依据。

参考文献

[1] 李乐, 杨兵, 郭泽美, 等. 关山樱花总黄酮的微波提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(8): 126–131.
LI L, YANG B, GUO ZM, *et al.* Optimization of microwave extraction of total flavonoids from Kanzan flower and its antioxidant activity [J]. Chin Food Addit, 2023, 34(8): 126–131.

[2] 李清光, 环飞, 汤晓青, 等. 关山樱花对 SD 大鼠的致畸作用研究[J]. 毒理学杂志, 2022, 36(2): 186–189.
LI QG, HUAN F, TANG XQ, *et al.* Study on the teratogenic effect of Kanzan flower on SD rats [J]. J Toxicol, 2022, 36(2): 186–189.

[3] 蒋宇利. 可食的关山樱花[J]. 食品与生活, 2023, (4): 76–77.
JIANG YL. Edible Kanzan flower [J]. Food Life, 2023, (4): 76–77.

[4] 李飞阳, 姚文红, 孙立梅, 等. 关山樱花总黄酮含量测定及其亚硝酸盐清除作用[J]. 山东农业科学, 2016, 48(10): 140–144.
LI FY, YAO WH, SUN LM, *et al.* Determination of total flavonoid content in Kanzan flower and its nitrite scavenging effect [J]. J Shandong Agric Sci, 2016, 48 (10): 140–144.

[5] 柳新红, 孙中帅, 蒋冬月, 等. 我国樱花产业主要问题的思考[J]. 浙江林业科技, 2018, 38 (6): 77–82.
LIU XH, SUN ZS, JIANG DY, *et al.* Reflections on the main issues of China's cherry blossom industry [J]. Zhejiang Forest Sci Technol, 2018, 38(6): 77–82.

[6] WANG Y, LI W, XU S, *et al.* Protective skin aging effects of cherry blossom extract (*Prunus yedoensis*) on oxidative stress and apoptosis in UVB-irradiated HaCaT cells [J]. Cytotechnology, 2019, 71(2): 475–487.

[7] 徐广新, 倪翊, 杨仁荣, 等. 樱花提取物对酸奶发酵特性的影响[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 25–27.
XU GX, NI H, YANG RQ, *et al.* The effect of cherry blossom extract on the fermentation characteristics of yogurt [J]. Food Ind, 2019, 40(1):

25–27.

[8] ZHANG YQ, GUAN L, ZHONG ZY, *et al.* The antiinflammatory effect of cherry blossom extract (*Prunus yedoensis*) used in soothing skincare product [J]. Int J Cosmet Sci, 2014, 36(6): 527–530.

[9] 张灵灵, 蒋细旺. 樱花‘关山’嫩枝扦插繁殖技术[J]. 福建林业科技, 2016, 43(4): 130–134.
ZHANG LL, JIANG XW. The propagation technique of cherry blossom ‘Guanshan’ tender branch cutting [J]. Fujian Forest Sci Technol, 2016, 43(4): 130–134.

[10] 菜菜子. 樱花烂漫时邂逅中国最美的春天[J]. 环球人文地理, 2022, (3): 78–91.
CAI CZ. Cherry blossoms a spring photography across the country [J]. Global Human Geography, 2022, (3): 78–91.

[11] 赵二劳, 刘乐, 杨洁, 等. 丁香黄酮提取工艺及其生物活性的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(3): 195–197.
ZHAO ERL, LIU L, YANG J, *et al.* Research progress on extraction technology and bioactivity of flavonoids from clove [J]. China Cond, 2021, 46(3): 195–197.

[12] OOMEN WW, BEGINES P, MUSTAFA NR, *et al.* Natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids of *Scutellaria baicalensis* as a replacement for conventional organic solvents [J]. Molecules, 2020, 25(3): 617–621.

[13] SU H, ZHANG Y, LI X, *et al.* Optimization of extraction of total flavonoids from herba blumeae ripariae using response surface methodology [J]. Med Plant, 2020, 11(2): 73–76.

[14] ZHANG M, MA W, WANG C, *et al.* Optimization of enzyme-assisted extraction and purification of flavonoids from *Pinus koraiensis* nutcoated film and antioxidant activity evaluation [J]. Molecules, 2021, 26(7): 1950.

[15] OUEÐRAOGO JCW, DICKO C, KINI FB, *et al.* Enhanced extraction of flavonoids from *Odontonema strictum* leaves with antioxidant activity using supercritical carbon dioxide fluid combined with ethanol [J]. J Super Fluid, 2018, 131: 66–71.

[16] 王玲玲, 边祥雨, 高蔚娜, 等. 植物类黄酮提取纯化技术研究进展[J]. 营养, 2019, 41(6): 606–610.
WANG LL, BIAN XY, GAO WN, *et al.* Advances in extraction and purification techniques for flavonoids in plants [J]. Nutrition, 2019, 41(6): 606–610.

[17] 付荣霞, 周学永, 李航, 等. 藜麦黄酮类化合物的提取及测定方法研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(10): 195–196, 200.
FU RX, ZHOU XY, LI H, *et al.* Research progress of extraction and determination methods for flavonoids compounds in Quinoa [J]. China Cond, 2019, 44(10): 195–196, 200.

[18] 廖建庆, 王涵, 虞贵财. 超声波辅助花生壳中提取黄酮工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(3): 142–147.
LIAO JQ, WANG H, YU GC. Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from peanut shells [J]. J Chin Cereal Oils Ass, 2022, 37(3): 142–147.

[19] 宋林晓, 邵娟娟. 黄酮类化合物提取方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(1): 21–22.

- SONG XL, SHAO JJ. Research progress on extraction methods of flavonoids [J]. J Cere Oils, 2020, 33(1): 21–22.
- [20] 徐赫, 李荣华, 夏岩石, 等. 黄酮类化合物提取、分离纯化方法研究现状及展望[J]. 应用化工, 2021, 50(6): 1677–1682.
- XU H, LI RH, XIA YS, *et al.* Research status and prospect of extraction and purification methods of flavonoids [J]. Appl Chem Ind, 2021, 50(6): 1677–1682.
- [21] 郑慧, 夏欣, 何奕洁, 等. 高剪切乳化技术辅助提取荷叶水不溶性膳食纤维工艺优化及其物性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33: 275–281.
- ZHENG H, XIA X, HE YJ, *et al.* Optimization of high shear emulsification assisted extraction of insoluble dietary fiber from lotus leaf and its physical properties [J]. Nat Prod Res Dev, 2021, 33: 275–281.
- [22] 符群, 王梦丽, 李卉, 等. 高速剪切-超声联合提取鸡树条荚蒾果降血糖成分的工艺[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 157–164.
- FU Q, WANG ML, LI H, *et al.* High-speed shear-ultrasonic combination extraction of hypoglycemic components from the fruits of *Viburnum sargentii* koehne [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(11): 157–164.
- [23] WANG K, LI M, WEN X, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of okra (*Abelmo-schus esculentus* (L.) Moench) polysaccharides based on response surface methodology and antioxidant activity [J]. Int J Biol Macromolecul, 2018, 114: 1056.
- [24] 程佳. 玉米须提取物降血糖活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- CHENG J. Study on hypoglycemic activity of corn silk extract [D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [25] 赵云韵, 杨心怡, 王申萌, 等. 超声波协同高剪切法高效提取树莓果渣黄酮及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2019, 35(5): 220–227.
- ZHAO YY, YANG XY, WANG SM, *et al.* Efficient extraction of flavonoids from *Rubus idaeus* residue by ultrasonic wave combined with high shear method and its inhibition of α -glucosidase [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(5): 220–227.
- [26] 李栋, 薛端婷. 响应面耦合遗传算法优化超声辅助复合酶提取红枣多糖工艺[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(6): 96–103.
- LI D, XUE RT. Optimization of ultrasonic-assisted complex enzyme extraction polysaccharides from jujube by response surface methodology coupled with genetic algorithm [J]. Food Res Dev, 2021, 42(6): 96–103.
- [27] 谷红, 尹本林, 袁建全, 等. 响应面耦合遗传算法优化超声-酶辅助提取金银花绿原酸工艺及其抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(9): 70–78.
- GU H, YIN BL, YUAN JQ, *et al.* Optimization of ultrasonic-enzyme assisted extraction of chlorogenic acid from honeysuckle by response surface methodology coupled genetic algorithm and its antioxidant activity [J]. Storage Process, 2021, 21(9): 70–78.
- [28] 李娜, 王晶, 苏玲, 等. 遗传算法优化超声辅助双水相提取小球藻多糖工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(12): 43–52.
- LI N, WANG J, SU L, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of *Chlorella* polysaccharide by genetic algorithm [J]. Chin Food Addit, 2021, 32(12): 43–52.
- [29] 尹乐斌, 邓鹏, 何平, 等. 基于遗传算法-神经网络及响应面法优化龙牙百合总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 105–113.
- YIN LB, DENG P, HE P, *et al.* Optimization of total flavonoid extraction from *Lilium brownii* based on genetic algorithm-neural network and response surface methodology [J]. Food Res Dev, 2021, 42(7): 105–113.
- [30] 薛婧, 胡金丽, 宋洋波, 等. 黄国梨总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(1): 92–96.
- XUE J, HU JL, SONG YB, *et al.* Study on extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Pyrus bretschneideri* Rehd [J]. J Cere Oils, 2023, 36(1): 92–96.
- [31] 胡建燃, 李平, 赵红梅, 等. 柴胡总黄酮的体外抗炎及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, (9): 82–88.
- HU JR, LI P, ZHAO HM, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of total flavonoids from *Radix bupleuri* [J]. Chin Food Addit, 2023, (9): 82–88.
- [32] 彭小燕, 蔡香珍, 叶丹榕, 等. 高速剪切辅助碱法从龙眼核中提取淀粉的研究[J]. 农产品加工, 2019, 7: 27–30.
- PENG XY, CAI XZ, YE DR, *et al.* Study of starch extraction from longyan nucleus by high speed shearing assisted alkaline method [J]. Farm Prod Process, 2019, 7: 27–30.
- [33] 黎莉, 于德涵, 苏适, 等. 离子液体-超声波协同法提取黑豆异黄酮及抗氧化性研究[J]. 广州化工, 2020, 48(12): 73–76.
- LI L, YU DH, SU S, *et al.* Study on the extraction of isoflavone from black soybean by ionic liquid ultrasonic assisted method and its antioxidant activity [J]. Guangzhou Chem Ind, 2020, 48(12): 73–76.
- [34] 王小佳, 于有伟, 崔美林, 等. 低共熔溶剂协同超声波提取红枣中总黄酮的研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(1): 36–39.
- WANG XJ, YU YW, CUI ML, *et al.* Study on extraction of total flavonoids from red jujube by deep eutectic solvent and ultrasonic wave [J]. China Cond, 2022, 47(1): 36–39.
- [35] 付佳乐, 耿直. 绿色低共熔溶剂提取黄酮类化合物的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(7): 8–12.
- FU JL, GENG Z. Research progress in the extraction of flavonoids using green low eutectic solvents [J]. Chem Biol, 2022, 39(7): 8–12.
- [36] SHANG XC, DOU YQ, ZHANG YJ, *et al.* Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts [J]. Ind Crop Prod, 2019, 140: 111724.
- [37] 韦福忠. 超声辅助低共熔溶剂提取诺丽果渣黄酮及抗小鼠运动疲劳研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 105–113.
- WEI FZ. Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Noni pomace* by deep eutectic solvents and its antifatigue in mice [J]. Chin Food Addit, 2023, 34(3): 105–113.
- [38] 邵哲, 喻治达, 钟袁源. 红托竹荪菌托黄酮的纯化及其抗氧化与抗疲劳活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 315–322.
- SHAO Z, YU ZD, ZHONG YY. Study on purification, anti-oxidation and anti-fatigue activity of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(1): 315–322.
- [39] 刘俊泽, 朱德龙, 王仁广, 等. 超声波法提取淡豆豉总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2176–2183.
- LIU JZ, ZHU DL, WANG RG, *et al.* Study on optimization of ultrasonic extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Sojae semen praeparatum* [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(7): 2176–2183.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



韩秀枝, 副教授, 主要研究方向为食品大数据应用创新技术。
E-mail: 94656133@qq.com



曹源, 副教授, 主要研究方向为食品大数据处理及企业管理技术与应用。
E-mail: 178601807@qq.com