

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80197

冬荪黄酮纯化工艺优化及对小鼠运动耐力的影响

卞文昆

(天津财经大学珠江学院, 天津 301811)

摘要: [目的] 优化冬荪黄酮纯化的最佳工艺并探究其抗疲劳功效, 开发抗疲劳潜在功效产品。[方法] 采用单因素和响应面法优化冬荪黄酮纯化工艺, 并研究经纯化后的冬荪黄酮对小鼠运动耐力的影响。[结果] 与 AB-8 大孔吸附树脂、HP-20 大孔吸附树脂和 D101 大孔吸附树脂相比, 聚乙烯基吡咯烷酮对冬荪黄酮的吸附率最高, 且最优纯化工艺为: 冬荪黄酮粗提取物质量浓度 3.2 g/L、洗脱液乙醇体积分数 56%、洗脱流量 28 mL/min、洗脱体积 2 倍柱体积, 该工艺参数下冬荪黄酮纯度可达 $(92.05 \pm 1.05)\%$, 与冬荪黄酮粗提取物纯度相比提升了近 5 倍。纯化后的冬荪黄酮能够有效延长小鼠负重游泳时长, 降低小鼠血清乳酸、血尿素氮、肌酸激酶、丙二醛和血清尿素含量, 同时提升小鼠血清的乳酸脱氢酶、总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶含量以及肝脏的肝糖原、肌组织肌糖原含量。[结论] 聚乙烯基吡咯烷酮是优异的纯化冬荪黄酮的新型介质, 纯化后的冬荪黄酮可通过改变生化指标、提升糖原储备能力以及抗氧化能力达到缓解疲劳、增强耐力的目的, 冬荪黄酮可以作为一种功能性食品添加剂。

关键词: 冬荪; 黄酮; 纯化; 大孔吸附树脂; 运动耐力

Study on the purification process of flavonoids from *Phallus impudicus* and its effect on exercise endurance in mice

BIAN Wenkun

(Tianjin University of Finance and Economics Pearl River College, Tianjin 301811, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to optimize the purification process of flavonoids from *Phallus impudicus* and explore its anti-fatigue effect, and develop potential anti-fatigue products. [Methods] The purification process of flavonoids from *P. impudicus* was optimized using single factor and response surface methodology, and the effect of purified flavonoids from *P. impudicus* on exercise endurance in mice was studied. [Results] Compared with AB-8, HP-20, and D101, the PVPP had the highest adsorption rate for flavonoids from *P. impudicus*, and the optimal purification process was as follows: the concentration of crude extract of flavonoids from *P. impudicus* was 3.2 g/L, the concentration of ethanol elution solution was 56%, the elution flow rate was 28 mL/min, and the elution volume was 2 times the column volume. Purified flavone, i.e. $(92.05 \pm 1.05)\%$, effectively prolonged the weight-bearing swimming time of mice, reduce the contents of serum lactic acid, blood urea nitrogen, creatine kinase, malonaldehyde and serum urea, and increased the contents of serum lactate dehydrogenase, total antioxidant capacity, glutathione peroxidase, liver glycogen and muscle glycogen in mice. [Conclusion] PVPP was an excellent new medium for purifying flavonoids. Purified flavonoids from *P. impudicus* could alleviate fatigue and enhance endurance by changing biochemical indicators, enhancing glycogen storage capacity, and antioxidant capacity. Flavonoids from *P. impudicus* could be used as a functional food additive.

Keywords: *Phallus impudicus*; flavonoid; purification; macroporous adsorption resin; sports endurance

冬荪 (*Phallus impudicus*) 又名冬荪、竹下菌、无裙荪, 要分布在中国云南、贵州等山林之地^[1-2]。冬荪富含多等, 属于鬼笔科鬼笔属, 是既可食用也可入药的真菌, 主糖、多种氨基酸等活性成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调

基金项目: 天津市社会科学规划项目 (编号: TJTYQN20-006)

通信作者: 卞文昆 (1987—), 男, 天津财经大学珠江学院讲师, 硕士。E-mail: 3534168962@qq.com

收稿日期: 2024-03-05 改回日期: 2024-06-05

引用格式: 卞文昆. 冬荪黄酮纯化工艺优化及对小鼠运动耐力的影响[J]. 食品与机械, 2025, 41(3): 142-150.

Citation: BIAN Wenkun. Study on the purification process of flavonoids from *Phallus impudicus* and its effect on exercise endurance in mice[J]. Food & Machinery, 2025, 41(3): 142-150.

节、抑菌防腐等功效^[3-8]。目前对冬荪的研究多集中在形态特征、栽培基质、生长条件、化学成分等方向,亟待开展应用功效研究^[8-9]。

黄酮是由两个具有酚羟基的苯环形成的一系列化合物,其母核为2-苯基色原酮,具有抑菌、降血压、抗氧化等重要药用价值。目前对冬荪黄酮的研究甚少,郑秀艳等^[9]曾报道了冬荪菌托中含有约1.45 mg/g类黄酮,其具有一定的抗氧化能力,目前还未见冬荪黄酮纯化工艺以及其他功能特性的研究报道。

天然植物成分复杂,黄酮经提取后均需要进行纯化,目前国内外主要使用大孔吸附树脂(如AB-8、HP-20和D101等)、有机溶剂萃取、高速逆流色谱分离等方法进行纯化^[10-16]。蔡珊^[13]使用AB-8大孔吸附树脂纯度白茅根黄酮,可将黄酮纯度提高至(64.2±1.5)%;Cui等^[14]使用HPD-500纯化大麻纤维黄酮,仅将其纯度提高至8.36%。大孔树脂方法吸附性不专一,很难得到纯度较高的黄酮化合物,因此也有学者采用两种树脂法进行纯化。于凤等^[16]将AB-8大孔吸附树脂和HPD600树脂联合纯化白子菜黄酮,将其纯度提高至70.63%,但此法仍未将黄酮纯度提高至90%以上。卢连香等^[12]使用正丁醇溶剂纯化甘蔗叶总黄酮,可将黄酮纯度提高至40.50%,但溶剂法专属性不强,且废弃的有机溶剂容易造成污染。Zhou等^[15]使用高速逆流色谱纯化木蝴蝶黄酮可得到纯度在95%以上的黄酮单体,但此法对设备要求很高,效率较低,不适合工业化使用。而聚乙烯基吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVPP)羰基之间的氢键、吡咯烷酮中的共轭π键可选择性地与黄酮的顺位环重叠相结合,排除其他酚类、多糖类、生物碱等物质的干扰,可用于纯化黄酮,目前仅在竹叶黄酮上有所研究,可得到纯度90%以上的竹叶黄酮^[17],其是否可用于冬荪黄酮纯化仍待研究。目前还未见冬荪黄酮的抗疲劳研究。小鼠运动疲劳模型主要有负重游泳、爬杆、跑台、前肢握力以及转棒等,其中负重游泳模型是目前最常用的抗疲劳模型之一^[18-19]。研究拟通过对AB-8大孔吸附树脂、HP-20大孔吸附树脂和D101大孔吸附树脂与PVPP纯化冬荪黄酮的比较,以确证PVPP的纯化效果。采用响应面优化法优化PVPP纯化冬荪黄酮的工艺条件,并通过纯化后冬荪黄酮对小鼠运动耐力的影响评价其抗疲劳活性,以期冬荪黄酮的纯化工艺及开发利用提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

冬荪:采摘于贵州省雷山县,清水清洗后,60℃烘干,高速研磨机粉碎后过60目筛网备用;

芦丁标准品:成都超九八生物科技有限公司;

AB-8大孔吸附树脂(AB-8)、HP-20大孔吸附树脂(HP-20)、聚乙烯基吡咯烷酮(PVPP)、D101大孔吸附树脂(D101):上海源叶生物科技有限公司;

肌酸激酶(CK)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、乳酸(LA)试剂盒、小鼠肝糖原(LG)试剂盒、小鼠肌糖原(MG)试剂盒:北京盒子生物科技有限公司;

总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、血尿素氮(BUN)试剂盒:合肥莱尔生物科技有限公司;

血清尿素(BU)测试盒:上海复星长征医学科学有限公司;

无水乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为国产分析纯;

昆明SPF雄性小鼠:许可证号为SYXK(津)2020-0010,体重20~25 g,200只,天津医科大学医药实验动物科学部。

1.2 试验设备

精密天平:MCE36200S-2CCN-O型,北京盛昌达仪器仪表有限公司;

四孔数显电热恒温水浴锅:HH-4S型,深圳市莱特仪器设备有限公司;

加速溶剂萃取仪:Aseeker-600型,上海科哲生化科技有限公司;

多功能酶标仪:SpectraMax Mini型,美谷分子仪器(上海)有限公司;

旋转蒸发器:Organomation RC600型,上海时滨电子科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 冬荪黄酮提取 称取40 g冬荪与同质量的硅藻土混合置于加速溶剂萃取仪中,在设定提取压力10 MPa,提取温度73℃下使用40%乙醇溶液提取7 min,反复提取两次,合并提取液,过滤后的上清液在0.1 MPa 40℃下旋蒸至膏状物时停止,得冬荪黄酮粗提取物,参照文献^[11]测定其黄酮含量为(15.74±0.23)%。

1.3.2 大孔树脂筛选 用10%乙醇水溶液将冬荪黄酮粗提取物配制成5 g/L,取50 mL冬荪黄酮粗提取物置于250 mL三角瓶中,分别加入10 g预处理好的AB-8、HP-20、PVPP和D101,于25℃、100 r/min摇床中振荡吸附24 h,过滤取上清液测定黄酮含量,按式(1)计算各大孔树脂的吸附率。

$$c_1 = \frac{k_1 \times v_1 \times p_1 - h_1 \times v_2}{k_1 \times v_1 \times p_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c_1 ——吸附率,%;

k_1 ——冬荪黄酮粗提取物质量浓度,mg/mL;

h_1 ——上清液黄酮含量,mg;

v_1 ——冬荪黄酮粗提取物体积,mL;

v_2 ——上清液体积,mL;

p_1 ——冬荪黄酮粗提取物黄酮纯度,%。

取上述过滤得到的树脂置于250 mL三角瓶中,用去离

子水洗 3 次后加入 50 mL 70% 乙醇水溶液后置于 25 ℃、100 r/min 摇床中振荡解析 24 h, 过滤取上清液测定其黄酮含量, 按式(2)计算各大孔树脂的冬荜黄酮回收率。

$$c_2 = \frac{h_1}{k_1 \times v_1 \times p_1 \times c_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

c_2 ——回收率, %;

c_1 ——吸附率, %;

k_1 ——冬荜黄酮粗提取物质量浓度, mg/mL;

h_1 ——上清液黄酮含量, mg;

v_1 ——冬荜黄酮粗提取物体积, mL;

p_1 ——冬荜黄酮粗提取物黄酮纯度, %。

1.3.3 冬荜黄酮纯化工艺优化 根据大孔树脂筛选试验结果, 选择 PVPP 进行试验。选择径高比为 1:19 的层析柱进行装填, 装填体积为 750 mL。取 1 000 mL 4 g/L 冬荜黄酮粗提取物以 12.5 mL/min 流量进行上样, 上样结束后分别使用 2 倍柱体积的去离子水和 10% 乙醇以 12.5 mL/min 流量进行清洗, 再使用 70% 乙醇以 25 mL/min 流量洗脱 3 倍柱体积, 收集洗脱液, 在 0.1 MPa 40 ℃ 下, 旋蒸至膏状物时停止, 将膏状物转移至平皿上, 在 0.1 MPa 40 ℃ 真空干燥至恒重即为精制冬荜黄酮, 称取 100 mg 精制冬荜黄酮, 用 10% 乙醇水溶液复溶为 100 mg/L, 取 1.0 mL 100 mg/L 精制冬荜黄酮溶液参照文献[9]测定其黄酮质量浓度, 按式(3)计算冬荜黄酮纯度。

$$p_2 = \frac{h_2 \times v_3}{m_1} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

p_2 ——纯度, %;

h_2 ——精制冬荜黄酮溶液中黄酮质量浓度, mg/mL;

v_3 ——精制冬荜黄酮溶液体积, mL;

m_1 ——精制冬荜黄酮提取物质量, mg。

(1) 单因素试验: 固定冬荜黄酮粗提取物质量浓度 4 g/L, 洗脱液乙醇体积分数 70%, 洗脱流量 25 mL/min 和洗脱体积 3 倍柱体积时, 分别进行冬荜黄酮粗提取物质量浓度(1, 2, 3, 4, 5 g/L)、洗脱液乙醇体积分数(40%, 50%, 60%, 70%, 80%)、洗脱流量(12.5, 25.0, 37.5, 50.0, 62.5 mL/min)和洗脱体积(1, 2, 3, 4, 5 倍柱体积)研究, 确认收集到的冬荜黄酮纯度。

(2) 优化试验: 根据单因素试验结果, 采用响应面设计方法对上述 4 个因素进行优化试验, 以确认最佳优化工艺参数。

1.3.4 冬荜黄酮对小鼠运动耐力的影响

(1) 小鼠负重游泳试验: 采用小鼠负重自身体重 5% 铅块游泳试验研究冬荜黄酮对小鼠运动耐力的影响。将小鼠适应性饲养几天后进行游泳训练, 淘汰不会游泳的小鼠, 将小鼠随机分为 K 组、P 组、LCF 组、MCF 组、CF 组、LPCF 组、MPCF 组和 PCF 组, 每组各 10 只, 饲养 30 d。K 组正常饲养 30 d 且每日灌胃 1.0 mL 生理盐水后不进行负

重游泳试验; P 组正常饲养 30 d 且每日灌胃 1.0 mL 生理盐水, 末次灌胃 30 min 后进行负重游泳, 以小鼠 10 s 无法浮出水面的时间记为小鼠运动耐力时间; LCF 组、MCF 组和 CF 组除正常每日饲养饲料外, 每日分别灌胃 1.0 mL 50, 100, 200 mg/kg 冬荜黄酮粗提取物, 末次灌胃 30 min 进行负重游泳计算小鼠运动耐力时间; LPCF 组、MPCF 组和 PCF 组除正常每日饲养饲料外, 每日灌胃 1.0 mL 50, 100, 200 mg/kg 纯化后的冬荜黄酮, 末次灌胃 30 min 进行负重游泳计算小鼠运动耐力时间。

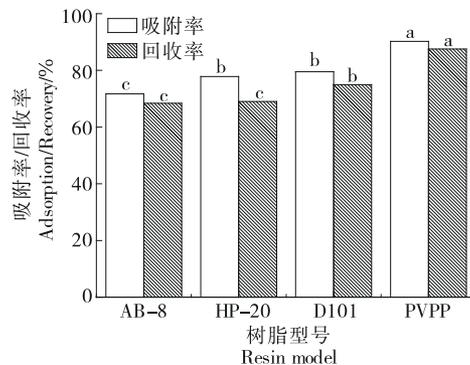
(2) 冬荜黄酮对小鼠生化指标的影响: 小鼠处死后取眼球血清, 参照产品说明书测定 CK 和 LDH 酶活性、BUN、BU 和 LA 含量; 同时参照产品说明书测定 T-AOC、GSH-Px 活性及 MDA 含量; 取小鼠肝脏和肱二头肌, 参照产品说明书测定小鼠 LG 和 MG 含量。

1.3.5 数据处理 数据统计分析使用 SPSS 22.0 进行, 显著性分析使用方差分析中 LSD 法进行, $P < 0.05$ 为差异显著。响应面优化使用 Design-Expert 8.0.6 进行。

2 结果与分析

2.1 冬荜黄酮纯化大孔树脂筛选

由图 1 可知, 在冬荜黄酮吸附率上, PVPP 吸附率最高, D101 和 HP-20 吸附率次之且无显著差异 ($P > 0.05$), AB-8 吸附率最差。这是由于黄酮物质极性偏弱, 根据相似相吸原理非极性的 PVPP、D101 和 HP-20 更容易吸附黄酮, 弱极性的 AB-8 效果较差, 与郭建峰等^[20]报道的结果一致。PVPP、D101 和 HP-2 的冬荜黄酮吸附率均无法达到 100%, 是由于冬荜黄酮粗提取物有酚酸、多糖等物质也容易被大孔树脂吸附, 与黄酮形成竞争, 导致部分黄酮无法结合到大孔树脂上, 但 PVPP 羰基之间的氢键、吡咯烷酮中的 π 键易与黄酮类物质的顺位环相结合, 因此 PVPP 效果优于其他^[17]。在冬荜黄酮回收率上, PVPP 回收率最高, D101 次之, HP-20 和 AB-8 最差且无显著差异 ($P > 0.05$), 这可能与乙醇、黄酮和大孔树脂之间的结合力有



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 不同型号树脂对黄酮吸附率和回收率的影响
Figure 1 Effects of different types of resins on the adsorption and recovery of flavonoids

关。综合不同树脂对冬荪黄酮的吸附率和回收率, PVPP 效果最优, 说明 PVPP 可以较好地吸附和解析黄酮, 后续选择 PVPP 进行纯度优化试验。

2.2 冬荪黄酮纯化单因素试验

2.2.1 冬荪黄酮粗提取物质量浓度对冬荪黄酮纯化效果的影响 如图 2 所示, 随着冬荪黄酮粗提取物上样质量浓度的增大, 黄酮纯度无显著性变化 ($P > 0.05$), 当冬荪黄酮粗提取物质量浓度达到 3 g/L 时, 黄酮纯度达到 $(88.08 \pm 1.95)\%$, 而后随着冬荪黄酮粗提取物上样质量浓度继续增大, 黄酮纯度呈下降趋势, 这是由于冬荪黄酮粗提取物上样质量浓度较低时, 大孔树脂能够吸附较多的黄酮化合物且树脂的吸附作用没有饱和, 导致黄酮纯度不变, 但冬荪黄酮粗提取物上样质量浓度过高时, 大孔树脂吸附饱和, 有较多的黄酮未被吸附, 因而在洗杂过程中被清洗下来, 导致其纯度下降^[21]。故在后续优化试验中该因素选择 2, 3, 4 g/L 3 个水平。

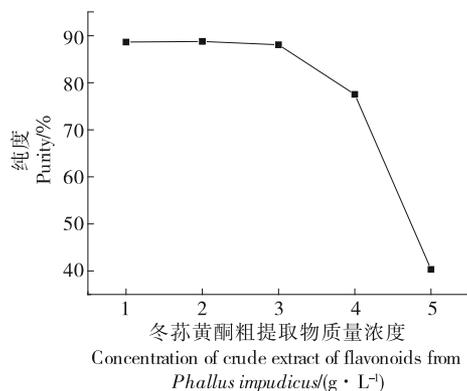


图 2 冬荪黄酮粗提取物质量浓度对黄酮纯度的影响

Figure 2 Effects of concentration of crude extract of flavonoids from *Phallus impudicus* on flavonoid purity rate

2.2.2 洗脱液乙醇体积分数对冬荪黄酮纯化效果的影响 如图 3 所示, 随着洗脱液乙醇体积分数的增大, 冬荪黄酮纯度增大, 当洗脱液乙醇体积分数达到 60% 时, 黄酮纯度达到 $(84.82 \pm 1.61)\%$, 而后随着洗脱液乙醇体积分数继续增大, 黄酮纯度呈下降趋势, 这是由于洗脱液乙醇体积分数较低时, 乙醇溶液的极性较低不足以将结合的冬荪黄酮完全洗脱下来, 而随着洗脱液乙醇体积分数的增大其极性越大, 洗脱能力越强, 但其极性过大时, 可以将结合的一些杂质洗脱下来导致其纯度下降^[20-21]。故在后续优化试验中该因素选择 50%, 60%, 70% 3 个水平。

2.2.3 洗脱流量对冬荪黄酮纯化效果的影响 如图 4 所示, 随着洗脱流量的增大, 冬荪黄酮纯度增大, 当洗脱流量达到 25 mL/min 时, 黄酮纯度达到 $(77.52 \pm 1.52)\%$, 而后随着洗脱流量继续增大, 黄酮纯度呈下降趋势, 这是由于洗脱流量较低时, 洗脱液乙醇与大孔树脂结合时间过

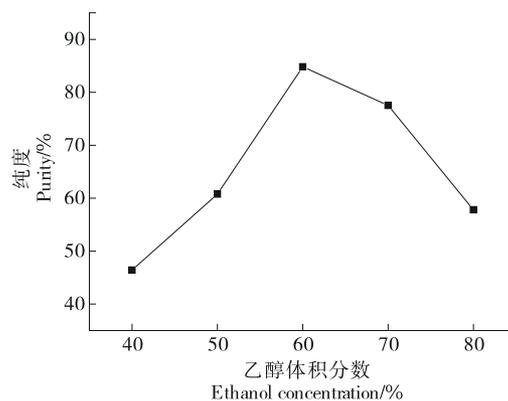


图 3 洗脱液乙醇体积分数对黄酮纯度的影响

Figure 3 Effects of ethanol eluent concentration on flavonoid purity rate

长导致杂质被洗脱下来而影响黄酮的纯度^[22], 而洗脱流量过大会导致洗脱液乙醇接触时间过短导致其不足以将黄酮洗脱下来影响其纯度, 且过高的流量会导致大孔树脂压力过大, 导致树脂柱塌陷影响黄酮的纯度^[17,21]。故在后续优化试验中该因素选择 12.5, 25.0, 32.5 mL/min 3 个水平。

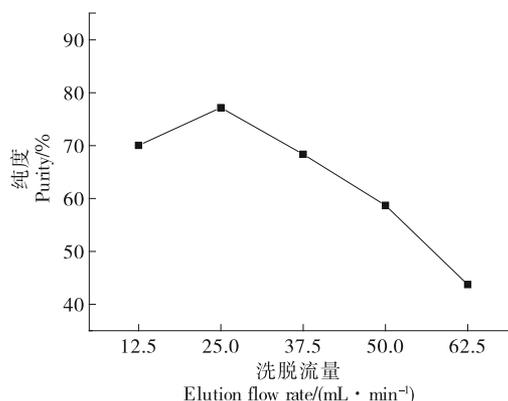


图 4 洗脱流量对黄酮纯度的影响

Figure 4 Effects of elution flow rate on flavonoid purity rate

2.2.4 洗脱体积对冬荪黄酮纯化效果的影响 如图 5 所示, 随着洗脱体积的增大, 冬荪黄酮纯度增大, 当洗脱体积达到 2 倍柱体积时, 黄酮纯度达到 $(77.52 \pm 1.52)\%$, 而后随着洗脱体积继续增大, 黄酮纯度呈下降趋势, 这是由于洗脱体积较低时, 洗脱液乙醇与大孔树脂结合时间过短不足以将所有的黄酮置换下来导致纯度较低, 而过高的洗脱体积会将除黄酮外的其他杂质洗脱下来也会导致其纯度降低。故在后续优化试验中该因素选择 1, 2, 3 倍柱体积 3 个水平。

2.3 冬荪黄酮纯化优化试验

采用响应面优化法对上述单因素进行优化, 响应面优化试验因素水平表见表 1, 试验设计及结果如表 2、表 3

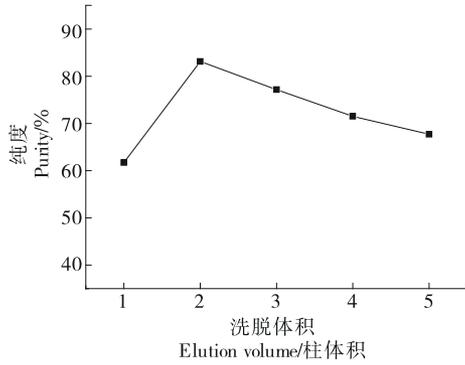


图 5 洗脱体积对黄酮纯度的影响

Figure 5 Effects of elution volume on flavonoid purity rate

所示,可计算出单因素对黄酮纯度的理论模型方程为:

$$Y=91.15+1.04A-4.43B+3.51C+3.73D-2.28AB-2.55AC-0.96AD+0.70BC+6.08BD+2.70CD-6.36A^2-5.28B^2-5.14C^2-7.33D^2。 \quad (4)$$

表 1 响应面优化因素水平

Table 1 Response surface optimization factor level

水平	A 冬荪黄酮粗提物质量浓度/ (g·L ⁻¹)	B 洗脱液乙醇体积分数/%	C 洗脱流量/ (mL·min ⁻¹)	D 洗脱体积/ 倍柱体积
-1	2	50	12.5	1
0	3	60	25.0	2
1	4	70	37.5	3

由表 3 可知,模型 $P<0.0001$ 极显著,失拟项 $P=0.2619$ 不显著, $R^2=0.9816$, $CV=1.70\%$,说明该模型可用于分析预测冬荪黄酮纯度。根据方差分析可知,洗脱液乙醇体积分数、洗脱流量和洗脱体积对黄酮纯度影响极显著,冬荪黄酮粗提取物浓度对黄酮纯度影响显著。4 个因素相互作用中,洗脱液乙醇体积分数和洗脱流量、冬荪黄酮粗提取物质量浓度和洗脱体积交互作用不显著,其余因素间交互作用极显著。由图 6~图 11 可知,冬荪黄酮粗提取物质量浓度和洗脱液乙醇体积分数、冬荪黄酮粗提取物质量浓度和洗脱流量、洗脱液乙醇体积分数和洗脱流量、洗脱流量和洗脱体积交互作用显著。

黄酮纯度的理论模型方程可以预测出冬荪黄酮粗提取物质量浓度为 3.25 g/L、洗脱液乙醇体积分数为 56.25%、洗脱流量为 28.63 mL/min、洗脱体积为 2.14 倍柱体积时,冬荪黄酮纯度最高,为 92.62%,但考虑到实际工作的便捷性,将参数调整为冬荪黄酮粗提取物质量浓度为 3.2 g/L、洗脱液乙醇体积分数为 56%、洗脱流量为 28 mL/min、洗脱体积为 2 倍柱体积,在此工艺参数下进行 3 次验证实验,得冬荪黄酮纯度 $(92.05 \pm 1.05)\%$,与理论最大值差异不足 3%,说明工艺参数可靠稳定。

表 2 Box-Behnken 试验设计及试验结果

Table 2 Box-Behnken test design and results

试验号	A	B	C	D	Y 黄酮纯度/%
1	0	0	0	0	90.38
2	0	0	0	0	91.51
3	1	0	0	1	83.96
4	0	0	0	0	91.33
5	0	1	0	1	82.48
6	0	1	1	0	80.88
7	0	0	-1	1	75.76
8	0	0	0	0	91.39
9	-1	-1	0	0	80.89
10	-1	0	0	1	81.66
11	0	-1	0	1	79.89
12	0	0	-1	-1	75.00
13	1	0	-1	0	79.53
14	0	-1	-1	0	82.01
15	1	0	0	-1	75.22
16	1	1	0	0	73.83
17	-1	1	0	0	77.51
18	1	-1	0	0	86.32
19	0	0	0	0	91.16
20	1	0	1	0	80.65
21	0	-1	1	0	88.56
22	-1	0	1	0	84.61
23	0	-1	0	-1	86.50
24	-1	0	-1	0	73.28
25	0	1	-1	0	71.51
26	0	0	1	-1	76.46
27	-1	0	0	-1	69.06
28	0	1	0	-1	64.78
29	0	0	1	1	88.03

2.4 冬荪黄酮对小鼠运动耐力的影响

2.4.1 冬荪黄酮对小鼠负重游泳时间的影响 如图 12 所示,与 P 组对比,LCF、MCF、CF 和 LPCF 组小鼠负重游泳时间有所延长,但不存在显著性差异;MPCF 组小鼠负重游泳时间显著延长 ($P<0.05$),PCF 组小鼠负重游泳时间极显著延长 ($P<0.01$);与 CF 组对比,MPCF 组小鼠负重游泳时间显著延长 ($P<0.05$),PCF 组小鼠负重游泳时间也极显著延长 ($P<0.01$)。说明经 PVPP 洗脱纯化后的冬荪黄酮能够增强机体耐力,提升抗疲劳能力。

2.4.2 冬荪黄酮对小鼠生化指标的影响 如表 4 所示,与 K 组比较,P 组的 LA、LDH、BUN、CK 和 BU 均极显著性变化 ($P<0.01$),说明负重游泳对小鼠造成了一定程度的损伤;与 P 组比较,LCF 和 MCF 组所有指标均无显著性变化,CF 组的 LA、BUN 和 BU 均无显著性变化,LDH 和 CK

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	P值	显著性
模型	1 419.28	14	101.38	53.30	<0.000 1	极显著
A	13.02	1	13.02	6.85	0.020 3	显著
B	235.68	1	235.68	123.92	<0.000 1	极显著
C	147.70	1	147.70	77.66	<0.000 1	极显著
D	166.96	1	166.95	87.79	<0.000 1	极显著
AB	20.75	1	20.75	10.91	0.005 2	极显著
AC	26.06	1	26.06	13.70	0.002 4	极显著
AD	3.73	1	3.72	1.96	0.183 4	不显著
BC	1.99	1	1.99	1.05	0.323 9	不显著
BD	147.74	1	147.74	77.68	<0.000 1	极显著
CD	29.21	1	29.21	15.36	0.001 5	极显著
A ²	262.47	1	262.47	138.01	<0.000 1	极显著
B ²	180.91	1	180.91	95.12	<0.000 1	极显著
C ²	171.45	1	171.45	90.15	<0.000 1	极显著
D ²	348.15	1	348.15	183.06	<0.000 1	极显著
残差	12.52	14	0.89			
失拟项	10.44	10	1.04	2.01	0.261 9	不显著
误差项	0.81	4	0.20			

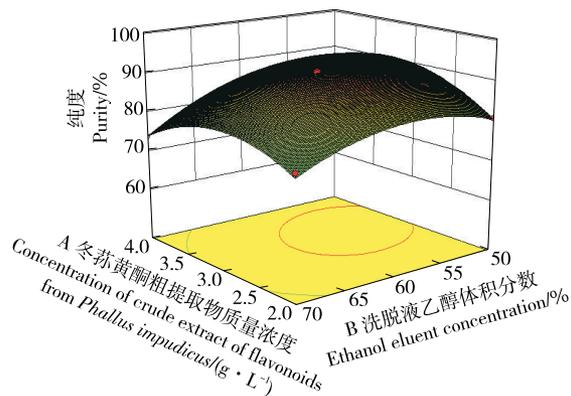


图 6 冬荜黄酮粗提取物质量浓度和洗脱液乙醇体积分数的响应面图

Figure 6 Response surface of the effect of concentration of crude extract of flavonoids from *P. impudicus* and ethanol eluent concentration on flavonoid purity rate

均具有显著性变化 ($P < 0.05$), LPCF 组的 LA 和 BU 均无显著性变化, LDH、BUN 和 CK 均显著性变化 ($P < 0.05$), MPCF 组的 LA 和 BU 均显著性变化 ($P < 0.05$), LDH、BUN 和 CK 均极显著性变化 ($P < 0.01$), PCF 组的 LA、LDH、BUN、CK 和 BU 均极显著性变化 ($P < 0.01$), 说明冬荜黄酮粗提取物在一定剂量下可能有一定的抗疲劳效果, 而纯化后的冬荜黄酮在中剂量下具有一定的抗疲劳

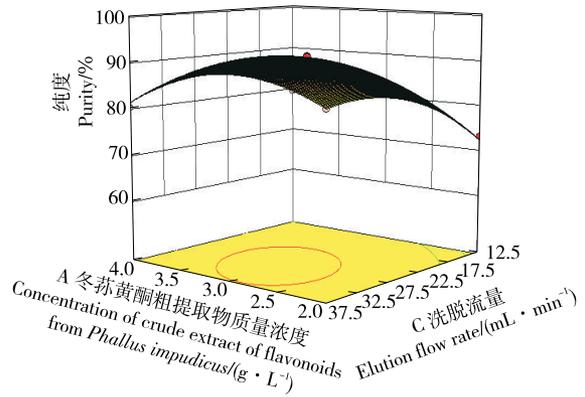


图 7 冬荜黄酮粗提取物质量浓度和洗脱流量的响应面图
Figure 7 Response surface of the effect of concentration of crude extract of flavonoids from *P. impudicus* and elution flow rate on flavonoid purity rate

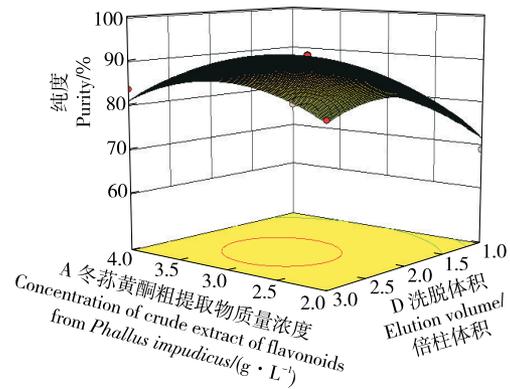


图 8 冬荜黄酮粗提取物质量浓度和洗脱体积的响应面图
Figure 8 Response surface of the effect of concentration of crude extract of flavonoids from *P. impudicus* and elution volume on flavonoid purity rate

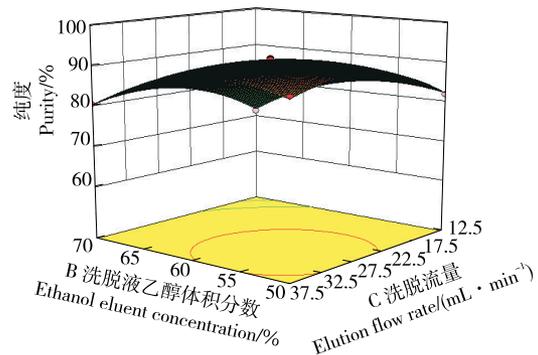


图 9 洗脱液乙醇体积分数和洗脱流量的响应面图
Figure 9 Response surface of the effect of ethanol eluent concentration and elution flow rate on flavonoid purity rate

效果; 与 CF 组比较, LPCF 组的各项指标均无显著性变化, MPCF 组的 LA、BUN、CK 和 BU 均显著性变化 ($P <$

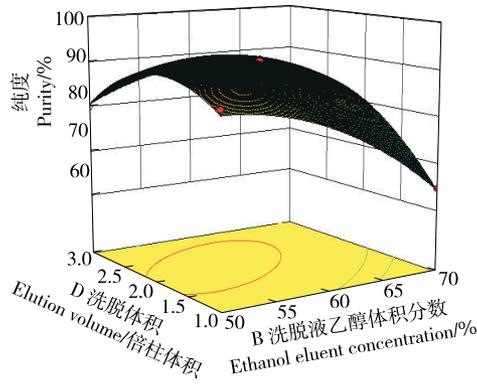


图 10 洗脱液乙醇体积分数和洗脱体积的响应面图
Figure 10 Response surface of the effect of ethanol eluent concentration and elution volume on flavonoid purity rate

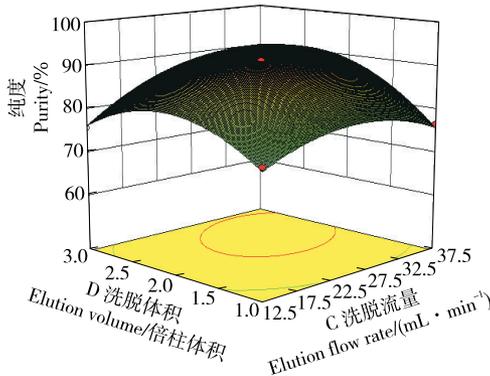


图 11 洗脱流量和洗脱体积的响应面图
Figure 11 Response surface of the effect of elution flow rate and elution volume on flavonoid purity rate

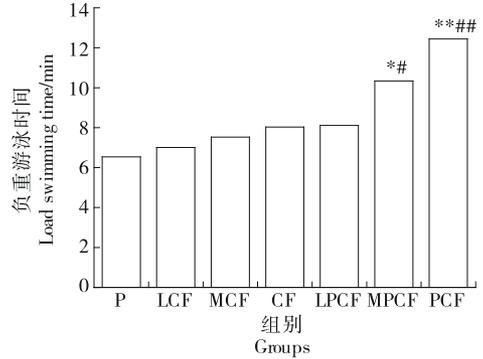
0.05), LDH 极显著性变化 ($P < 0.01$), PCF 组的 LA、LDH、BUN、CK 和 BU 均极显著性变化 ($P < 0.01$), 说明纯化后的冬荜黄酮在中剂量下的抗疲劳效果优于高剂量下的。

表 4 冬荜黄酮对小鼠生化指标的影响[†]

Table 4 Effect of flavonoids from *P. impudicus* on the biochemical indicators in mice

组别	LA/(mmol·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	BU/(mmol·L ⁻¹)
K 组	8.35 ± 0.35	1 266.30 ± 25.76	8.32 ± 0.29	216.14 ± 12.74	7.98 ± 0.19
P 组	10.94 ± 0.47 ^{△△}	582.25 ± 19.47 ^{△△}	11.06 ± 0.38 ^{△△}	352.71 ± 13.12 ^{△△}	10.43 ± 0.25 ^{△△}
LCF 组	10.86 ± 0.38	600.33 ± 19.98	10.87 ± 0.25	342.69 ± 13.42	10.28 ± 0.22
MCF 组	10.52 ± 0.33	646.52 ± 20.61	10.57 ± 0.23	328.37 ± 12.96	10.02 ± 0.19
CF 组	10.14 ± 0.30	683.96 ± 21.17 [*]	10.28 ± 0.22	316.47 ± 13.20 [*]	9.82 ± 0.23
LPCF 组	9.98 ± 0.32	696.64 ± 22.01 [*]	9.74 ± 0.26 [*]	299.30 ± 12.67 [*]	9.63 ± 0.20
MPCF 组	9.49 ± 0.30 ^{*#}	895.26 ± 24.13 ^{***}	9.16 ± 0.20 ^{***}	271.74 ± 13.01 ^{***}	9.09 ± 0.21 ^{*#}
PCF 组	9.11 ± 0.28 ^{***}	1 073.48 ± 23.57 ^{***}	8.75 ± 0.23 ^{***}	246.42 ± 12.82 ^{***}	8.74 ± 0.22 ^{***}

[†] 与 K 组相较, △△ 表示极显著性差异 ($P < 0.01$); 与 P 组相较, * 表示显著性差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著性差异 ($P < 0.01$); 与 CF 组相较, # 表示显著性差异 ($P < 0.05$), ## 表示极显著性差异 ($P < 0.01$)。

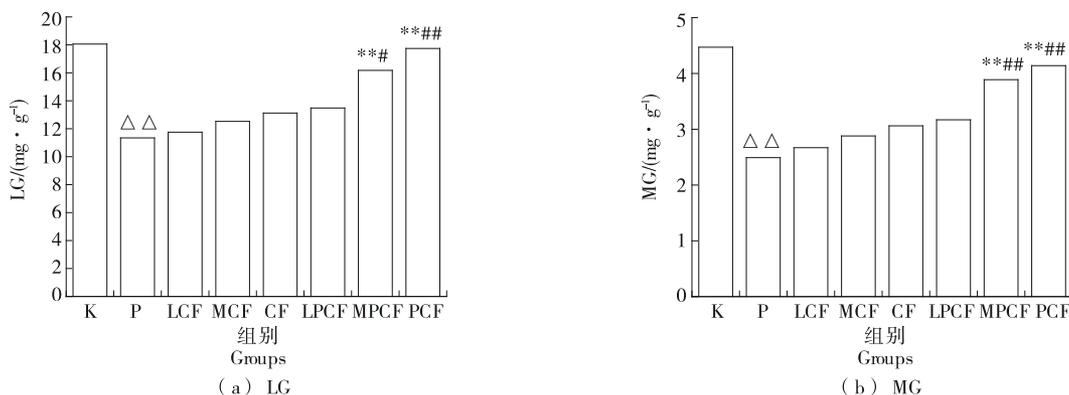


与 P 组相较, * 表示显著性差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著性差异 ($P < 0.01$); 与 CF 组相较, # 表示显著性差异 ($P < 0.05$), ## 表示极显著性差异 ($P < 0.01$)

图 12 冬荜黄酮对小鼠负重游泳时间的影响
Figure 12 Effects of flavonoids from *P. impudicus* on weight-bearing swimming time in mice

经 PVPP 洗脱纯化后的冬荜黄酮能够有效降低血清中 LA、BUN、CK 和 BU 含量, 同时升高 LDH 含量, 从而缓解运动疲劳对机体的损伤。

2.4.3 冬荜黄酮对小鼠糖原储备的影响 如图 13 所示, 与 K 组比较, P 组的 LG 和 MG 均极显著性变化 ($P < 0.01$), 说明负重游泳使小鼠损耗了大量糖原; 与 P 组比较, LCF、MCF、CF 和 LPCF 组的 LG 和 MG 均无显著性变化, MPCF 和 PCF 组的 LG 和 MG 均极显著性变化 ($P < 0.01$); 与 CF 组比较, LPCF 组的 LG 和 MG 均无显著性变化, MPCF 组的 LG 显著性变化 ($P < 0.05$), MG 极显著性变化 ($P < 0.01$), PCF 组的 LG 和 MG 均极显著性变化 ($P < 0.01$), 纯化后的冬荜黄酮在中高剂量下可调节糖原储备量, 其效果优于冬荜黄酮粗提取物, 说明经 PVPP 纯化后的冬荜黄酮能够有效提高小鼠的糖原储备量, 提升小鼠耐力。



与K组相较,△△表示极显著性差异($P<0.01$);与P组相较,**表示极显著性差异($P<0.01$);与CF组相较,#表示显著性差异($P<0.05$),##表示极显著性差异($P<0.01$)

图 13 冬荜黄酮对小鼠糖原储备的影响

Figure 13 Effects of flavonoids from *P. impudicus* on glycogen reserve in mice

2.4.4 冬荜黄酮对小鼠抗氧化能力的影响 如表5所示,与K组比较,P组的T-AOC、GSH-Px和MDA均极显著性变化($P<0.01$),说明负重游泳使小鼠产生氧化应激反应;与P组比较,LCF和MCF组所有指标均无显著性变化,CF组的T-AOC变化无明显差异,GSH-Px和MDA显著性变化($P<0.05$),说明高剂量的冬荜黄酮粗提取物具有一定的提高机体抗氧化能力作用;LPCF组的T-AOC变化无明显差异,GSH-Px和MDA均显著性变化($P<0.05$),MPCF组的T-AOC显著性变化($P<0.05$),GSH-Px和MDA均极显著性变化($P<0.01$),PCF组的T-AOC、GSH-Px和MDA均极显著性变化($P<0.01$),说明纯化后的冬荜黄酮具有一定的提高机体抗氧化能力作用;与CF组比较,LPCF组的T-AOC、GSH-Px和MDA均无明显变化,MPCF组的

T-AOC和MDA均显著性变化($P<0.05$),GSH-Px极显著性变化($P<0.01$),PCF组的T-AOC、GSH-Px和MDA均极显著性变化($P<0.01$),说明纯化后的冬荜黄酮提高机体抗氧化能力优于冬荜黄酮粗提取物。经PVPP洗脱纯化后的冬荜黄酮能够有效抑制机体氧化应激反应,缓解机体疲劳,提升小鼠运动耐力。

3 结论

聚乙烯吡咯烷酮对冬荜黄酮的吸附率最高,其是一种优异的黄酮纯化材料。最优纯化工艺为:冬荜黄酮粗提取物质量浓度3.2 g/L、洗脱液乙醇体积分数56%、洗脱流量28 mL/min、洗脱体积2倍柱体积,在此工艺参数下可得冬荜黄酮纯度(92.05 ± 1.05)%,与冬荜黄酮粗提取物相比提升了近5倍。小鼠运动耐力影响的结果表明:服用纯化后的冬荜黄酮的小鼠的负重游泳时间极显著性延长,可降低小鼠血清的乳酸、血尿素氮、肌酸激酶、丙二醛和血清尿素含量,同时升高小鼠血清的乳酸脱氢酶、总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶含量以及肝脏的小鼠肝糖原、肌组织小鼠肌糖原含量。冬荜黄酮可以通过改变生化指标、提升糖原储备能力以及提高抗氧化能力达到缓解疲劳、增强耐力的目的。冬荜黄酮具有抗疲劳活性,后续还应采用实时荧光定量核酸扩增检测系统和蛋白质印迹法对抗疲劳相关通路进行分析,研究其抗疲劳机制。冬荜黄酮是由多个单一黄酮组成的,也应采用偏最小二乘回归分析法对冬荜黄酮与抗疲劳进行分析,以得到关键抗疲劳活性成分。

表 5 冬荜黄酮对小鼠抗氧化能力的影响

Table 5 Effect of flavonoids from *P. impudicus* on the antioxidant capacity in mice

组别	T-AOC/ ($U \cdot mL^{-1}$)	GSH-Px/ ($U \cdot mL^{-1}$)	MDA/ ($nmol \cdot mL^{-1}$)
K组	7.13 ± 0.31	384.79 ± 18.21	$3.78 \pm 0.16^{**}$
P组	$4.34 \pm 0.21^{\triangle\triangle}$	$221.54 \pm 14.78^{\triangle\triangle}$	$8.63 \pm 0.26^{\triangle\triangle}$
LCF组	4.55 ± 0.19	239.85 ± 15.22	8.01 ± 0.24
MCF组	4.79 ± 0.24	258.74 ± 15.19	7.76 ± 0.21
CF组	4.96 ± 0.27	$277.37 \pm 15.52^*$	$6.57 \pm 0.22^*$
LPCF组	5.58 ± 0.25	$293.45 \pm 15.71^*$	$6.11 \pm 0.20^*$
MPCF组	$6.21 \pm 0.27^{*#}$	$324.65 \pm 15.33^{***}$	$5.35 \pm 0.25^{**}$
PCF组	$6.88 \pm 0.29^{**##}$	$347.41 \pm 15.24^{***}$	$4.25 \pm 0.21^{***}$

† 与K组相较,△△表示极显著性差异($P<0.01$);与P组相较,*表示显著性差异($P<0.05$),**表示极显著性差异($P<0.01$);与CF组相较,#表示显著性差异($P<0.05$),##表示极显著性差异($P<0.01$)。

参考文献

[1] 王彩云, 侯俊, 王永, 等. 白鬼笔研究进展[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(9): 44-48.
WANG C Y, HOU J, WANG Y, et al. Research advance in *Phallus impudicus*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(9): 44-48.

- [2] PREMYSLAW S, NATALIYA S, ANASTASIYA S, et al. Risk of wild fungi treatment failure: *Phallus impudicus*-induced telomere damage triggers p21/p53 and p16-dependent cell cycle arrest and may contribute to male fertility reduction *in vitro*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111782.
- [3] KADUKOVE E, TEPPINSKAYA T, SUSHKO S, et al. Extract of *Phallus impudicus* as an additional component in cancer treatment[J]. Siberian Oncology Journal, 2010, 4: 25-29.
- [4] GUPTA A, SHINDE B. Immunopharmacological evaluation of *Phallus impudicus* against specific protein antigen[J]. Medicine, 2016, 4: 55-59.
- [5] YOON K, LEE T. Antioxidant, anti-cholinesterase, and inflammation inhibitory activities of fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *Impudicus* L[J]. Journal of Mushroom, 2019, 17(3): 152-161.
- [6] 张爽. 棘托竹荪与白鬼笔抑菌防腐作用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015: 1-7.
ZHANG S. Study on the antimicrobial preservative effect of *Dictyophora echinovlvata* and *Phallus impudicus*[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture & Forestry University, 2015: 1-7.
- [7] 张松, 黄万兵, 刘宏宇, 等. 冬荪液体深层培养不同时期胞外代谢物研究[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(2): 14-22, 29.
ZHANG S, HUANG W B, LIU H Y, et al. Study on extracellular metabolites of *Phallus dongsun* in different periods of submerged fermentation[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2021, 57(2): 14-22, 29.
- [8] 首坤秀, 王山立, 林灵, 等. 冬荪及其蛋托的成分分析和抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(2): 264-271.
SHOU K X, WANG S L, LIN L, et al. Study on the component analysis and antioxidant activity of *Phallus impudicus* and egg tray[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(2): 264-271.
- [9] 郑秀艳, 黄磊, 王培, 等. 红托竹荪菌托和冬荪菌托的营养价值评价及抗氧化能力分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4 374-4 382.
ZHENG X Y, HUANG L, WANG P, et al. Evaluation of nutritional values and antioxidant capacities of *Dictyophora rubrovalvata* volva and *Phallus impudicus* L. volva[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(13): 4 374-4 382.
- [10] SERGIO L, CRISTINA P, FRANCISC P. Flavonoids: overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques[J]. Plants, 2023, 12(14): 2 732.
- [11] CHEN S, WANG X J, CHENG Y, et al. A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids[J]. Molecules, 2023, 28(13): 4 982.
- [12] 卢连香, 丁世磊, 杨方方, 等. 甘蔗叶总黄酮超声辅助离子液体提取工艺及其纯化研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(14): 95-99.
LU L X, DING S L, YANG F F, et al. Ultrasonic-assisted ionic liquid extraction and purification of total flavonoids from sugarcane leaves[J]. Feed Research, 2022, 45(14): 95-99.
- [13] 蔡珊. 白茅根黄酮纯化工艺及抗运动疲劳作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(9): 66-73.
- CAI S. Purification of flavonoids from *Rhizoma imperatae* and its anti-fatigue activity[J]. China Food Additives, 2023, 34(9): 66-73.
- [14] CUI Q L, LI J W, YU C W. Extraction and purification of total flavonoids from cannabis sativa fibers and their evaluation for antioxidant and antibacterial activities[J]. Textile Research Journal, 2023, 93(1/2): 56-69.
- [15] ZHOU Y, SHAN H, LÜ H T. Application of preparative high-speed countercurrent chromatography for the separation and purification of three flavonoids from *Oroxylum indicum*[J]. Biomedical Chromatography, 2023, 37(4): e5579.
- [16] 于凤, 许凯歌, 许秋双, 等. 大孔吸附树脂分离纯化白子菜总黄酮工艺优化[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2 827-2 831.
YU F, XU K G, XU Q S, et al. Optimization of isolation and purification process for *Gynura divaricate* total flavonoids by macroporous adsorption resin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(9): 2 827-2 831.
- [17] QIAN J Q, ZHU H X, ZHANG J L, et al. Separation and purification of bamboo leaf flavones by polyvinylpyrrolidone adsorption[J]. Journal of Chromatographic Science, 2023, 61(9): 885-891.
- [18] 董静茹, 莫君明, 王升. 鹰嘴豆多肽抗疲劳活性[J]. 食品与机械, 2023, 39(3): 142-146.
DONG J R, MO J M, WANG S. Study on the anti-fatigue activity of chickpea peptide[J]. Food & Machinery, 2023, 39(3): 142-146.
- [19] 王泽星. 复方多维辅酶 Q10 泡腾片对力竭运动训练小鼠的抗疲劳作用及机制研究[D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2022: 32.
WANG Z X. Study on the anti-fatigue effect and mechanism of compound multivitamin coenzyme Q10 effervescent tablets on exhaustive exercise training mice[D]. Qinhuangdao: Yanshan University, 2022: 32.
- [20] 郭建峰, 郗浩然, 王芳, 等. 沙棘叶黄酮的提取纯化及组成分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 189-198.
GUO J F, QIE H R, WANG F, et al. Extraction, purification and composition analysis of flavonoids from sea buckthorn leaves[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 189-198.
- [21] 李奕. 大孔树脂纯化囊荷黄酮提取物及其对小鼠运动性疲劳的影响[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(7): 64-70.
LI Y. Purification of total flavonoids extract from *Zingiber mioga* (Thunb.) Rosc by macroporous resin and its effect on exercise fatigue of mice[J]. Storage and Process, 2021, 21(7): 64-70.
- [22] WANG X H, WANG J P. Ultrasonic-assisted extraction and enrichment of the flavonoids from *Salicornia europaea* leaves using macroporous resins and response surface methodology [J]. Chemical Papers, 2023, 77(5): 2 769-2 781.