

# 红托竹荪菌托黄酮的纯化及其抗氧化与抗疲劳活性研究

邵 哲, 喻治达, 钟袁源\*

(江西中医药大学体育健康学院, 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 研究红托竹荪菌托黄酮的纯化工艺, 及其抗氧化与抗疲劳活性。**方法** 采用大孔树脂法纯化红托竹荪菌托黄酮。以树脂吸附率和解吸率为评价指标, 对红托竹荪菌托黄酮的纯化工艺参数进行优化, 并研究红托竹荪菌托黄酮纯化前后对 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine, DPPH)自由基和羟基(OH)自由基清除能力的影响和对小鼠的抗疲劳效果。**结果** 红托竹荪菌托黄酮的最佳纯化工艺条件为: 吸附条件: 上样液质量浓度 1.2 mg/mL、上样液流速 1.5 mL/min、上样液 pH 为 5, 上样液体积 60 mL; 解吸条件: 乙醇浓度 70%、洗脱流速 1.5 mL/min、洗脱液体积 120 mL, 经 D101 型大孔树脂纯化后, 红托竹荪菌托黄酮提取物中总黄酮的纯度由 14.16%提高到 57.64%, 对 DPPH 自由基和 OH 自由基的半数抑制浓度分别为 0.16 和 0.78 mg/mL; 与粗提物相比, 纯化后的黄酮提取物可明显延长小鼠的负重游泳时间, 减少其运动后血清中血乳酸和血尿素氮的含量。**结论** 红托竹荪菌托黄酮经纯化后具有较好的抗氧化性和抗疲劳活性, 对红托竹荪菌托黄酮资源的开发利用提供理论依据。

**关键词:** 红托竹荪菌托; 黄酮; 纯化工艺; 抗氧化; 抗疲劳

## Study on purification, anti-oxidation and anti-fatigue activity of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata*

SHAO Zhe, YU Zhi-Da, ZHONG Yuan-Yuan\*

(School of Physical Health, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the purification process of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata*, and their antioxidant and anti-fatigue activities. **Methods** The flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* were purified by macroporous resin method. Based on the resin adsorption rate and desorption rate as evaluation indexes, the purification process parameters of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* were optimized, the effects of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* before and after purification on the scavenging capacity of 1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine (DPPH) radical and OH radical were investigated and the anti-fatigue effects on mice were also studied. **Results** The optimum purification parameters of flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* were as follows: Adsorption conditions: The sample mass concentration was 1.2 mg/mL, the flow rate of the sample was 1.5 mL/min, the pH of the sample solution was 5, the volume of the sample solution was 60 mL; desorption

基金项目: 2022 年度江西省中医药管理局科技计划项目(2022B1092)

Fund: Supported by the 2022 Science and Technology Plan Project of Jiangxi Administration of Traditional Chinese Medicine (2022B1092)

\*通信作者: 钟袁源, 硕士, 讲师, 主要研究方向为传统体育养生与健康促进。E-mail: weihhh007@163.com

\*Corresponding author: ZHONG Yuan-Yuan, Master, Lecturer, Jiangxi University of Chinese Medicine, Jiangxi Province, Nanchang 330004, China. E-mail: weihhh007@163.com

conditions: The concentration of ethanol was 70%, the flow rate of the elution solution was 1.5 mL/min, the volume of the elution solution was 120 mL. After purification with D101 macroporous resin, the purity of total flavones in the extract from *Dictyophora rubrovolvata* was increased from 14.16% to 57.64%. The half inhibitory concentration of DPPH radical and OH radical were 0.16 and 0.78 mg/mL, respectively. Compared with the crude extract, the purified extract could obviously prolong the weight-bearing swimming time and decrease the content of blood lactic acid and blood urea nitrogen in post-exercise serum of mice. **Conclusion** The purified flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata* have good anti-oxidation and anti-fatigue activities, which provide a theoretical basis for the development and utilization of the flavonoids from *Dictyophora rubrovolvata*.

**KEY WORDS:** *Dictyophora rubrovolvata*; flavonoids; purification process; anti-oxidation; anti-fatigue activity

## 0 引言

红托竹荪(*Dictyophora rubrovolvata*)属鬼笔菌科竹荪属,是福建、云南、贵州、四川等地主要经济菌种之一<sup>[1]</sup>。红托竹荪由菌托、菌柄和菌盖 3 部分组成,营养丰富,富含多种氨基酸、维生素、纤维素、矿物质以及多糖、黄酮、多酚类等活性物质<sup>[2-4]</sup>。长期食用红托竹荪可以起到保肝、减少腹壁脂肪堆积的作用,同时对高血压、神经衰弱也具有一定的保健作用,红托竹荪菌托重量约占整株鲜重的 40%,而大部分地区在采摘红托竹荪菌柄后将菌托丢弃,造成资源浪费,为了充分利用红托竹荪资源,对废弃物菌托进行研究是非常有必要的。

植物黄酮类物质具有抗氧化、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、皮肤美白、抑菌抗炎<sup>[6]</sup>、抗病毒、抗过敏、祛风湿<sup>[7]</sup>、保健心血管<sup>[8]</sup>、抗疲劳<sup>[9-11]</sup>等诸多功效。目前国内对竹荪的研究基本集中在多糖的开发利用上<sup>[12-14]</sup>,少部分对竹荪黄酮的研究也主要集中在竹荪菌体中黄酮的提取工艺和抗氧化活性。许远等<sup>[15]</sup>、徐美青等<sup>[16]</sup>分别采用超声波辅助提取长裙竹荪总黄酮和竹荪蛋中总黄酮,得到最优工艺条件。吴泉铸<sup>[17]</sup>和许远等<sup>[18]</sup>分别发现竹荪黄酮和长裙竹荪总黄酮具有良好的抗氧化活性。王彦辉等<sup>[19]</sup>发现棘托竹荪孢子具有良好的抗氧化活性可能与样品中黄酮等抗氧化活性成分有关。然而目前对于红托竹荪菌托中黄酮的研究鲜见报道。

对食用菌中的黄酮类化合物进行分离纯化的常用方法是溶剂萃取法和大孔树脂法等<sup>[20]</sup>,但溶剂萃取法纯化的黄酮类化合物率较低,且需较多化学试剂,易对环境造成污染。大孔树脂法则具有设备简单、树脂可回收和操作简便等优点,已广泛应用在植物黄酮提取物的纯化中<sup>[21]</sup>。因此,本研究通过采用 D101 大孔树脂对红托竹荪菌托黄酮进行纯化,并研究其抗氧化活性和对小鼠的抗疲劳活性,以期对红托竹荪菌托黄酮资源的开发和利用提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

红托竹荪菌托购于贵州金蟾大山生物科技有限公司,

50°C烘至恒重后粉碎成粉末,过 100 目筛。

无水乙醇、硝酸铝、过氧化氢(分析纯,天津大茂试剂厂);亚硝酸钠(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司);氢氧化钠(分析纯,广州文瑞科技有限公司);D101 大孔吸附树脂(天津浩聚树脂科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)(纯度 ≥ 96%,上海麦克林生化科技有限公司);维生素 C (vitamin C, VC)(纯度 ≥ 99.7%,天津市新精细化工开发中心);硫酸亚铁(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水杨酸(分析纯,上海展云化工有限公司);血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒、血乳酸(blood lactic acid, BLA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

36 只(20±2) g 雄性健康小鼠(江西中医药大学,许可证号 SCXK(赣)2018-0003,动物实验经本院伦理委员会批准通过)。

### 1.2 仪器与设备

AY120 型电子分析天平(精度 0.0001 g,日本岛津公司);RE-2000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TDL-5-A 低速台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂);SHZDIII 循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限公司);UVT5500TC 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);DZKW-D-4 恒温水浴锅(河南郑州南北仪器设备有限公司);LGJ-30BP 冷冻干燥机(北京奥特佳美冻干机有限公司);KQ-100VDB 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);SHA-C 数显恒温振荡器(金坛华峰仪器有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 红托竹荪菌托黄酮粗提物的制备方法

称取 5 g 红托竹荪菌托样品粉末于锥形瓶中,加入 100 mL 80% (V:V)乙醇溶液,充分混合均匀后,密封浸泡 24 h。于 300 W 超声波下提取 1 h,离心(转速 3000 r/min, 10 min)取上清液,沉淀物按照上述操作重复两次,收集上清液经旋转蒸发器浓缩,将浓缩液冷冻干燥后得到黄酮粗提物。

#### 1.3.2 红托竹荪菌托黄酮含量的测定方法

参考王玲玲<sup>[22]</sup>的方法采用 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 比色法测定红托

竹荪菌托黄酮的含量。

### 1.3.3 静态吸附-解吸动力学

称取 1.0 g 预处理后(预处理方法参考王广慧等<sup>[23]</sup>的方法)的 D101 大孔树脂于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 1.2 mg/mL 红托竹荪菌托黄酮粗提物溶液, 在转速 100 r/min 温度 25°C 的条件下振荡, 每 2 h 检测一次溶液中总黄酮浓度直至黄酮浓度不变, 计算 D101 树脂的吸附率。将吸附后的液体倒掉, 用蒸馏水冲洗树脂至上清液不浑浊, 加入 70% 乙醇 50 mL, 在同样转速和温度下进行振荡, 每 2 h 测定一次溶液中的总黄酮浓度, 计算树脂的解吸率。

### 1.3.4 动态吸附-洗脱条件优化

#### (1) 吸附条件对吸附率的影响

称取 10.0 g 预处理过的 D101 大孔树脂, 湿法装入 15 mm×200 mm 的玻璃柱。分别选择上样液浓度(0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL)、上样液流速(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min)、上样液 pH(3、4、5、6、7)进行单因素实验, 考察其对 D101 吸附树脂吸附率的影响。当其中一项因素改变时, 其他因素恒定, 实验重复 3 次, 结果取 3 次实验的平均值。

#### (2) 洗脱条件对解吸率的影响

分别选择乙醇浓度(40%、50%、60%、70%、80%)、洗脱流速(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min)和洗脱液体积(80、100、120、140、160 mL)进行单因素实验, 研究其对 D101 吸附树脂解吸率的影响, 当其中一项因素改变时, 其他因素恒定, 实验重复 3 次, 结果取 3 次实验的平均值。

### 1.3.5 D101 大孔树脂分离纯化红托竹荪菌托黄酮的验证实验

在最佳工艺条件下, 采用 D101 大孔树脂纯化红托竹荪菌托黄酮, 将得到的纯化后的提取液进行验证实验, 测得总黄酮的浓度, 进而得到提取液中黄酮的质量。将纯化后的提取液在恒温干燥箱中烘至恒重后, 计算黄酮的纯度。实验重复 3 次, 结果取 3 次实验的平均值。

### 1.3.6 红托竹荪菌托黄酮抗氧化能力的测定

#### (1) 清除 DPPH 自由基能力的测定

参照李媛<sup>[24]</sup>的测定蓝莓渣中总黄酮清除 DPPH 自由基能力的方法进行测定。分别考察不同浓度的红托竹荪菌托黄酮的粗提物、纯化物及 VC 对 DPPH 自由基的清除能力

#### (2) 清除 OH 自由基能力的测定

参照孙琼<sup>[25]</sup>的测定杏鲍菇黄酮对 OH 自由基清除能力的方法进行测定。分别考察不同浓度的红托竹荪菌托黄酮的粗提物、纯化物及 VC 对 OH 自由基的清除能力。

### 1.3.7 小鼠抗疲劳活性的测定方法

#### (1) 实验分组

36 只健康小鼠在经实验室环境下喂养一周后, 将其每组各 12 只随机分为 3 组, 即为空白对照组、红托竹荪菌托黄酮粗提物组和纯化物组。分别按照 100 mg/(kg·d)的

剂量给小鼠灌服红托竹荪菌托黄酮液, 对照组灌服等量蒸馏水, 每日早上 9 点对各组小鼠进行灌胃处理, 实验周期为 30 d。

#### (2) 负重游泳实验

小鼠末次灌胃 30 min 后, 分别将 3 组小鼠各取 6 只, 在其尾根部绑定其体重 5% 的铅块, 置小鼠于规格为 50 cm×50 cm×40 cm 的游泳箱中进行负重实验, 水深 35 cm, 水温保持在(30±1)°C。记录小鼠开始入水至沉没水底 10 s 无法浮出水面的时间, 即为游泳时间。

#### (3) 血清生化指标的测定

将各组剩下的 6 只小鼠进行 90 min 无负重游泳实验。游泳结束后取出擦净, 休息 30 min 后于眼眶处取血, 进行采血并离心制备血清样品, 测出 BUN 和 BLA 水平<sup>[26]</sup>。

## 1.4 数据处理

所有实验重复测定 3 次, 结果表示为平均值±标准偏差。实验数据采用 Excel 2016、正交设计助手 IIv3.1 和 SPSS 17.0 软件进行分析, 对实验数据进行方差分析的置信水平 95%。

## 2 结果与分析

### 2.1 静态吸附-解吸动力学结果

研究在 0~10 h 内吸附时间和解吸时间对大孔树脂静态吸附和解吸的影响(图 1)。大孔树脂对样品液黄酮的吸附率在前 2 h 内快速升高, 在 4 h 后吸附速率逐渐变缓最终达到平衡, 说明 D101 大孔树脂在 4 h 时已经饱和。这可能是由于一方面在初始吸附时, 树脂表面的吸附位点相对充足, 另一方面样品液中黄酮浓度相对较高, 所以树脂吸附速度较快。但随着时间的延长, 大孔树脂表面的吸附位点逐渐趋于饱和, 另外, 黄酮进入树脂内部阻力增大, 使得吸附速率变缓, 最终达到平衡<sup>[27-28]</sup>。D101 大孔树脂在 0~4 h 内解吸速率快速升高, 实现快速解吸, 但 4 h 之后, 解吸速率逐渐变小, 解吸率增加缓慢, 在 6 h 后达到解吸平衡。

### 2.2 动态吸附-洗脱条件优化结果

#### 2.2.1 吸附条件对吸附率的影响

##### (1) 上样液浓度对吸附率的影响

保持 pH 为 5, 上样液流速为 1.0 mL/min, 上样量 60 mL 的条件不变, 在 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 间变化不同上样液质量浓度时, 研究吸附率的变化趋势。当上样液浓度升高时, 吸附率先升高后降低, 当上样液质量浓度为 1.2 mg/mL 时, 吸附率达到最大。这可能是因为当上样液质量浓度较低时, 树脂不能完全吸附, 且会延长黄酮的分离纯化时间, 降低纯化效率; 当上样液质量浓度过高时, 上样液中与黄酮竞争树脂吸附点的杂质将增多, 使得黄酮的吸附率下降, 另外, 上样液质量浓度太高还会增加溶液

的黏度, 导致黄酮不能完全被吸附<sup>[29]</sup>, 故 1.2 mg/mL 为最佳上样液质量浓度。

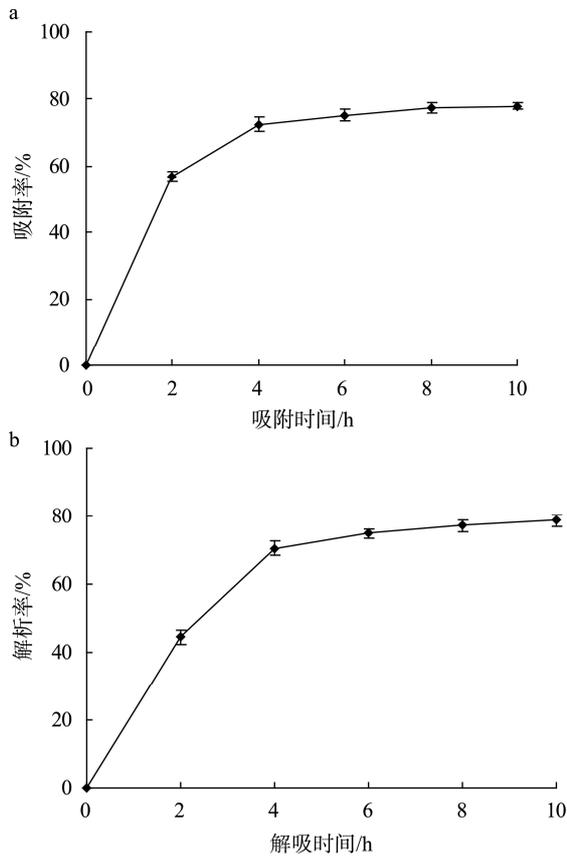


图 1 静态吸附-解吸动力学曲线

Fig.1 Static adsorption-desorption kinetic curves

### (2) 上样流速对吸附率的影响

研究不同的上样液流速(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min)对吸附率的影响, 其中保持 pH 为 5, 上样液质量浓度 1.2 mg/mL, 上样量 60 mL 不变。随着上样液流速的增加, 树脂对黄酮的吸附率先升高后降低, 在上样液流速为 1.5 mL/min 时达到最大。这可能是因为流速较慢时, 黄酮能充分接触树脂表面, 有助于被吸附到树脂内部, 从而提高吸附率; 而当流速过快时, 黄酮与树脂接触时间短使得未被充分吸附就随溶液流出, 也有可能是流速过大导致大孔吸附树脂不稳定, 被吸附的黄酮又重新被解吸下来<sup>[30]</sup>, 因此选择 1.5 mL/min 为最佳上样液流速。

### (3) 上样液 pH 对吸附率的影响

研究不同上样液 pH 对吸附率的影响, 保持上样液浓度 1.2 mg/mL, 上样液流速 1.5 mL/min, 上样量 60 mL 不变。树脂对黄酮的吸附率随 pH 的增大先升高后降低, 在 pH 为 5 时, 吸附率达到最大。当 pH 在 3~5 之间时吸附率升高, 可能是因为在强酸环境下, 黄酮类化合物形成烺盐, 影响吸附效果; 而在弱酸条件下, 黄酮能保持分子状态可

以形成氢键, 有利于与树脂结合, 提高吸附率; 而当溶液 pH 大于 5 时, 黄酮分子羟基离子化, 导致其与树脂之间的相互作用力下降, 从而使得吸附率降低<sup>[31]</sup>, 故 pH 为 5 时是最佳上样液 pH。

基于动态吸附的单因素实验考察结果, A 为上样液质量浓度(1.0、1.2、1.4 mg/mL)、B 为上样液流速(1.0、1.5、2.0 mL/min)、C 为上样液 pH(4、5、6), 红托竹荪菌托黄酮的吸附率为评价值, 设计  $L_9(3^4)$  的正交实验, 因素水平设计表和结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 吸附正交实验结果  
Table 1 Results of adsorption orthogonal test

实验号	A	B	C	吸附率/%
1	1	1	1	70.11
2	1	2	2	78.62
3	1	3	3	68.85
4	2	1	2	78.82
5	2	2	3	73.64
6	2	3	1	70.35
7	3	1	3	70.22
8	3	2	1	71.98
9	3	3	2	73.15
$k_1$	72.527	73.050	70.813	
$k_2$	74.270	74.747	76.863	
$k_3$	71.783	70.783	70.903	
R	2.487	3.964	6.050	

表 2 吸附正交实验方差分析

Table 2 Analysis of variance of adsorption orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F	显著性
A	9.775	2	6.760	
B	23.724	2	16.407	
C	72.132	2	49.884	*
误差	1.45	2		

注: \*表示有显著性差异( $P < 0.05$ )。

由正交实验和方差分析结果可知, 上样液 pH 对树脂的吸附率有显著差异( $P < 0.05$ ), 上样液质量浓度和上样液流速对树脂的吸附率差异不显著( $P > 0.05$ )。最佳吸附工艺为:  $A_2B_2C_2$ , 即上样液质量浓度为 1.2 mg/mL、上样流速为 1.5 mL/min, 上样液 pH 为 5。影响树脂吸附率的因素依次为: 上样液的 pH > 上样液流速 > 上样液浓度。

### 2.2.2 洗脱条件对解吸率的影响

#### (1) 乙醇浓度对解吸率的影响

研究乙醇浓度对大孔吸附树脂的解吸率的影响, 其中, 保持洗脱流速 1.0 mL/min, 洗脱体积 120 mL 不变。当乙醇浓度在 40%~70%时, 大孔吸附树脂的解吸率逐渐

增大, 当乙醇浓度达到 70% 时解吸率最大。这是因为当乙醇浓度逐渐增大, 乙醇分子的极性与黄酮分子的极性逐渐接近, 溶剂分子与大孔吸附树脂形成氢键作用, 黄酮类化合物分子被置换下来, 因此黄酮的解吸率呈显著上升趋势。而当乙醇浓度超过 70%, 解吸率快速下降, 可能是因为乙醇浓度过高导致更多的醇溶性杂质洗脱下来<sup>[24]</sup>, 不利于红托竹荪菌托黄酮的解吸, 故选择乙醇浓度为 70% 最佳。

### (2) 洗脱流速对解吸率的影响

保持乙醇浓度 70%, 洗脱体积 120 mL 不变, 考察在 0.5~2.5 mL/min 间不同的洗脱流速对树脂的解吸率的影响。洗脱流速低于 1.5 mL/min 时, 解吸率逐渐增大, 而当洗脱流速快于 1.5 mL/min 时, 树脂解吸率下降。这是由于当洗脱液流速过快时, 洗脱剂乙醇与树脂接触时间过短, 无法充分将树脂中的黄酮置换出来, 因此解吸率较低, 所以确定洗脱流速为 1.5 mL/min。

### (3) 洗脱液体积对解吸率的影响

乙醇浓度 70%, 洗脱流速为 1.5 mL/min 的条件下, 考察洗脱液体积在 80~160 mL 之间变化时, 树脂解吸率的变化趋势。树脂解吸率随着洗脱液的体积增加而逐渐增大, 在 120 mL 时达到最大值, 洗脱液体积在 120 mL 之后, 解吸率的基本无变化, 说明树脂中的黄酮已基本被洗脱出来, 因此确定最佳洗脱液体积为 120 mL。

基于动态洗脱的单因素实验考察结果,  $H$  为乙醇浓度 (60%、70%、80%)、 $G$  为洗脱流速 (1.0、1.5、2.0 mL/min)、 $K$  为洗脱液体积 (100、120、140 mL), 红托竹荪菌托黄酮的解吸率为评价值, 设计  $L_9(3^4)$  的正交实验, 因素水平设计表和结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 3 解吸正交实验结果  
Table 3 Results of desorption orthogonal test

实验号	$H$	$G$	$K$	解吸率/%
1	1	1	1	72.65
2	1	2	2	75.34
3	1	3	3	59.17
4	2	1	2	76.53
5	2	2	3	81.21
6	2	3	1	59.98
7	3	1	3	57.14
8	3	2	1	55.62
9	3	3	2	47.32
$k_1$	69.053	68.773	62.750	
$k_2$	72.573	70.723	66.397	
$k_3$	53.360	55.490	65.840	
$R$	19.213	15.233	3.647	

表 4 解吸正交实验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	$F$	显著性
$H$	627.823	2	32.370	*
$G$	412.304	2	21.258	*
$K$	23.156	2	1.194	
误差	19.39	2		

注: \*表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

由正交实验和方差分析结果可知, 乙醇浓度和洗脱流速对树脂的解吸率均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。洗脱液体积对树脂的解吸率差异不显著 ( $P > 0.05$ )。最佳吸附工艺为:  $H_2G_2K_2$ , 即乙醇浓度 70%、洗脱流速为 1.5 mL/min, 洗脱液体积为 120 mL。影响树脂吸附率的因素依次为: 乙醇浓度 > 洗脱流速 > 洗脱液体积。

## 2.3 验证实验

根据正交实验优化得到的纯化工艺结果为: 上样液浓度为 1.2 mg/mL、上样液流速为 1.5 mL/min、上样液 pH 为 5, 上样液体积 60 mL, 乙醇浓度为 70%, 洗脱流速为 1.5 mL/min, 洗脱液体积为 120 mL。在此工艺条件下, 采用 D101 大孔树脂纯化红托竹荪菌托黄酮, 大孔树脂对样品液黄酮的吸附率为  $80.95\% \pm 0.15\%$ , 解吸率为  $81.24\% \pm 0.21\%$ , 与正交实验结果相符。分别对粗提物和纯化物的黄酮含量进行测定, 发现红托竹荪菌托黄酮提取物中总黄酮的纯度由 14.16% 提高到 57.64%, 说明 D101 大孔树脂纯化红托竹荪菌托黄酮的效果良好。

## 2.4 红托竹荪菌托黄酮抗氧化能力的结果

图 2 所示为 VC、黄酮粗提物和纯化物分别对 DPPH 自由基清除能力和 OH 自由基清除能力的影响。由图 2 可知, VC、黄酮粗提物和纯化物均随浓度的增大, 对两种自由基清除率也增大, 且黄酮粗提物和纯化物变化趋势基本呈线性关系。但在各物质质量浓度下, 黄酮粗提物和纯化物对 DPPH 自由基清除率和 OH 自由基清除率均不及 VC, 说明红托竹荪菌托黄酮提取物对 DPPH 自由基和 OH 自由基具有一定的清除能力, 但不及 VC。

根据图 2 中黄酮粗提物和纯化物对两种自由基清除能力的数值, 分别对其进行线性拟合得到线性方程, 并计算其对应的半数抑制率 (half maximal inhibitory,  $IC_{50}$ ) 值 (表 5)。 $IC_{50}$  表示自由基清除率达到 50% 时, 红托竹荪菌托黄酮提取物或纯化物的浓度, 当  $IC_{50}$  值越小时, 表示其抗氧化活性越强。红托竹荪菌托黄酮粗提物和纯化物清除 DPPH 自由基对应的  $IC_{50}$  值分别为 0.20 和 0.16 mg/mL, 清除 OH 自由基对应的  $IC_{50}$  值分别为 1.02 和 0.78 mg/mL, 说明红托竹荪菌托黄酮粗提物经过 D101 树脂纯化后, 消除了蛋白质和糖类等大分子物质, 从而使得黄酮的纯度增加, 抗氧化活性增强, 推测黄酮为红托竹荪菌托发挥抗氧化活性的主要成分。

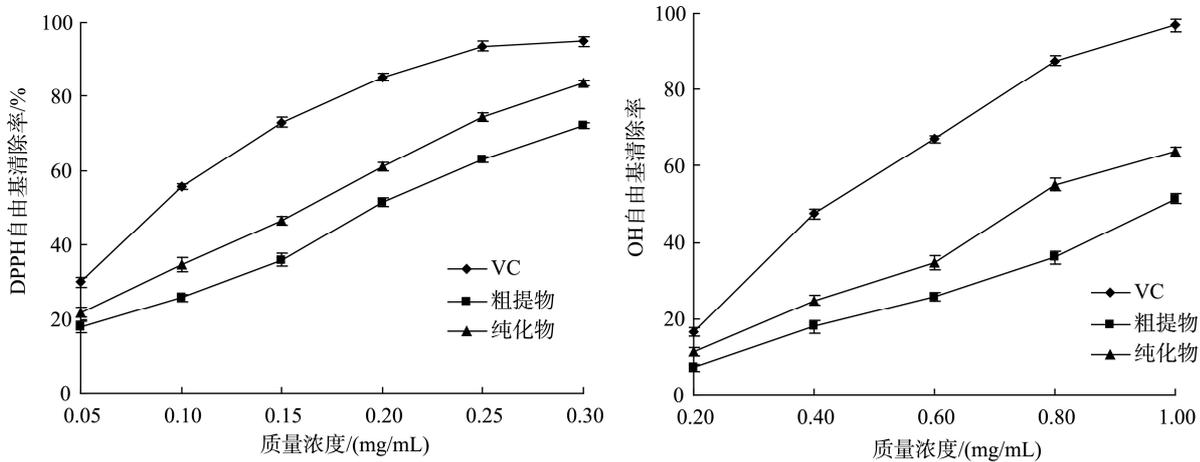


图 2 VC、黄酮粗提物和纯化物对两类自由基清除能力的影响

Fig.2 Effects of VC, crude extract and purified extract on scavenging ability of 2 kinds of radicals

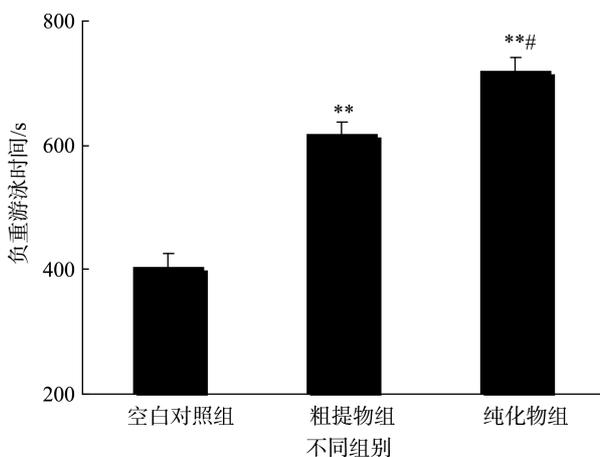
表 5 黄酮粗提物和纯化物对两类自由基清除的线性方程和  $IC_{50}$  值Table 5 Effects of crude extract and purified extract on linear equations and  $IC_{50}$  values of 2 kinds of radicals

样品	DPPH 自由基清除能力			OH 自由基清除能力		
	线性方程	$r^2$	$IC_{50}/(mg/mL)$	线性方程	$r^2$	$IC_{50}/(mg/mL)$
粗提物	$Y=227.26X+4.63$	0.9922	0.20	$Y=53.30X-4.28$	0.9860	1.02
纯化物	$Y=252.49X+9.54$	0.9972	0.16	$Y=67.35X-2.42$	0.9859	0.78

## 2.5 红托竹荪菌托黄酮的抗疲劳活性

### 2.5.1 红托竹荪菌托黄酮对小鼠负重游泳时间的影响

负重游泳实验是检测抗疲劳活性的重要手段之一<sup>[32]</sup>。红托竹荪菌托黄酮对小鼠负重游泳时间的影响如图 3 所示。分析发现,小鼠经红托竹荪菌托黄酮灌服 30 d 后,可显著提高小鼠运动能力。与空白对照组相比,粗提物组和纯化物组均能极显著提高小鼠的负重游泳时间( $P<0.01$ );表明红托竹荪菌托黄酮提取物有利于缓解小鼠的疲劳状



注:与空白对照组相比,\*\*表示极显著差异( $P<0.01$ );与粗提物组相比,#表示显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 红托竹荪菌托黄酮对小鼠负重游泳时间的影响

Fig.3 Effects of *Dictyophora rubrovolvata* flavonoids on weight-bearing swimming time in mice

态。与红托竹荪菌托黄酮粗提物组相比,纯化物组小鼠的平均负重游泳时间差异较显著( $P<0.05$ ),说明了红托竹荪菌托黄酮纯化物可进一步提高小鼠的抗疲劳耐性,表明红托竹荪菌托黄酮提取物可能是抗疲劳活性的主要成分。

### 2.5.2 红托竹荪菌托黄酮对小鼠血清生化指标的影响

机体剧烈运动时主要的能量来源是糖原,在厌氧条件下葡萄糖转化产生 BLA,机体运动能力下降,当机体葡萄糖消耗殆尽时,蛋白质与氨基酸开始逐渐分解供能,蛋白质代谢的最终产物是 BUN,导致血清中 BUN 含量升高,BLA 和 BUN 的含量升高均表示机体疲劳<sup>[33-36]</sup>。表 6 显示了各组小鼠负重游泳 90 min 后血清中 BUN 和 BLA 的水平。结果显示,与空白对照组相比,灌服粗提物的红托竹荪菌托黄酮的小鼠血清 BUN 和 BLA 含量降低较显著( $P<0.05$ ),纯化物组小鼠血清 BUN 和 BLA 含量降低极显著( $P<0.01$ )。因此,可进一步说明红托竹荪菌托黄酮提取物可降低小鼠机体代谢产物的积累,进而缓解运动疲劳。

表 6 红托竹荪菌托黄酮对小鼠血清生化指标的影响

Table 6 Effect of *Dictyophora rubrovolvata* flavonoids on serum biochemical indexes in mice

组别	BUN/(mmol/L)	BLA/(mmol/L)
空白对照组	9.47±0.24	11.61±0.35
粗提物组	8.01±0.32*	10.22±0.28*
纯化物组	7.09±0.23**	9.23±0.26**

注:与空白对照组相比,\*表示有显著性差异( $P<0.05$ ),\*\*表示有极显著性差异( $P<0.01$ )。

### 3 结 论

本研究以红托竹荪菌托为原料, 探讨了 D101 大孔树脂纯化红托竹荪菌托黄酮的最佳工艺条件。经正交实验得到最佳吸附条件为: 上样液浓度 1.2 mg/mL、上样液流速 1.5 mL/min、上样液 pH 为 5 和上样液体积 60 mL; 最佳解吸条件为: 乙醇浓度 70%、洗脱流速 1.5 mL/min 和洗脱液体积 120 mL; 验证结果显示, 经树脂纯化后, 红托竹荪菌托黄酮提取物中总黄酮含量由 14.16% 提高到 57.64%。红托竹荪菌托黄酮纯化物对 DPPH 自由基和 OH 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.16、0.78 mg/mL, 经纯化后其抗氧化活性得到进一步提高; 另外, 对小鼠抗疲劳活性的研究结果显示, 与粗提物相比, 纯化物可明显延长小鼠的负重游泳时间, 降低其运动后血清中 BLA 和 BUN 的含量, 有效提高小鼠的抗疲劳能力。可见, 对红托竹荪菌托黄酮的纯化, 研究其抗氧化活性和抗疲劳活性, 为红托竹荪菌托黄酮资源的深加工开发利用提供了理论依据。但大孔树脂在分离黄酮类化合物过程中, 可能也吸附了糖类、酚类等其他化合物, 因此在后续研究中还需对黄酮类化合物进行色谱分析, 还可以对其不同极性部位进一步分离纯化, 以获得更为可靠的抗氧化成分和抗疲劳成分, 此外还需对红托竹荪菌托黄酮抗疲劳机制进一步探索。

### 参考文献

- [1] 常佳驹, 庄永亮, 尚小丽, 等. 红托竹荪(*Dictyophora rubrovolvata*)菌托中营养品质的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 408-410.  
CHANG JJ, ZHUANG YL, SHANG XL, et al. Study on nutritional characteristics of the volva of *Dictyophora rubrovolvata* [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(11): 408-410.
- [2] 罗丽平, 李冰晶, 赵景芳, 等. 贵州不同地区红托竹荪不同部位的营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2022, 41(8): 60-64.  
LUO LP, LI BJ, ZHAO JF, et al. Analysis of nutritional components in different parts of *Dictyophora rubrovolvata* from different areas of Guizhou [J]. Edible Fungi China, 2022, 41(8): 60-64.
- [3] 饶先军, 汪立成, 刘春梅, 等. 红托竹荪中营养成分的测定与研究[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(2): 78-80.  
RAO XJ, WANG LC, LIU CM, et al. Determination and study of nutrient on longnet *Stinkhorn* [J]. Food Ferment Technol, 2013, 49(2): 78-80.
- [4] 王蓓蓓. 红托竹荪多糖的分离纯化、结构分析及其生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.  
WANG BB. Study on the isolation, purification, structure, antioxidation and antibacteria of polysaccharide from *Dictyophora rubrovolvata* [D]. Xi'an: Shanxi Normal University, 2012.
- [5] 韩乐, 韩伟, 张美彦. 金针菇子实体有机溶剂提取物的生物活性[J]. 菌物学报, 2016, 35(2): 178-187.  
HAN L, HAN W, ZHANG MY. Biological activities of organic solvent extracts from fruiting bodies of *Flammulina velutipes* [J]. Mycosystema, 2016, 35(2): 178-187.
- [6] 郑必胜, 魏瑞敬, 郭朝万, 等. 木棉花黄酮的大孔树脂纯化及其祛痰功效分析[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2022, 50(4): 119-128.  
ZHENG BS, WEI RJ, GUO CW, et al. Purification of Kapok flavonoids by macroporous resin and its anti-acne efficacy [J]. J South China Univ Technol (Nat Sci Ed), 2022, 50(4): 119-128.
- [7] 管俊. 桑寄生总黄酮祛风湿功效物质及归经研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.  
GUAN J. Study on the Anti-rheumatism effective chemicals and meridian tropism of the total flavonoids of *Herba Taxill*. [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2017.
- [8] 张浣悠, 邓秩童, 黄嘉泳, 等. 山楂黄酮的保健功效及提取工艺研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(12): 212-217.  
ZHANG HY, DENG ZT, HUANG JY, et al. Research progress on the health benefits and extraction techniques of flavonoids from Hawthorn [J]. Food Res Dev, 2021, 42(12): 212-217.
- [9] 王奇, 冯大志, 查恩辉, 等. 水飞蓟果托黄酮对小鼠抗疲劳功效的研究[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 229-234.  
WANG Q, FENG DZ, ZHA ENH, et al. Anti-Fatigue effect of total flavonoids from *silybum marianum* L. fruit receptacle in mice [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(7): 229-234.
- [10] 王利玲. 黄柳菇总黄酮对过度运动训练的影响研究[J]. 中国食用菌, 2020, 39(8): 62-64.  
WANG LL. Study on the effect of total flavonoids of *Pholiota adiposa* on overtraining [J]. Edible Fungi China, 2020, 39(8): 62-64.
- [11] 毕洁, 于丽娜, 王明清, 等. 花生壳黄酮的提取纯化工艺[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(5): 933-941.  
BI J, YU LN, WANG MQ, et al. Extraction and purification of flavonoids from peanut shell [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2021, 43(5): 933-941.
- [12] 敖珍. 红托竹荪菌托多糖中试提取工艺及其体外抗氧化活性的研究[D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2022.  
AO Z. Study on extraction technology and antioxidant activity of polysaccharide from the volva of *Dictyophora rubrovolvata* in vitro [D]. Guiyang: Guizhou Minzu University, 2022.
- [13] 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): 4374-4382.  
ZHENG XY, HUANG L, WANG P, et al. Evaluation of nutritional values and antioxidant capacities of *Dictyophora rubrovolvata* volva and *Phallus impudicus* L. volva [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(13): 4374-4382.
- [14] 徐耀. 红托竹荪不同部位多糖提取及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 350-352, 368.  
XU Y. Extraction technology and antioxidant activity of polysaccharides of different parts of *Dictyophora rubrovolvata* in vitro [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(24): 350-352, 368.
- [15] 许远, 魏和平, 吴彦. 响应面优化长裙竹荪总黄酮提取工艺研究[J]. 长江大学学报(自科版), 2015, 12(15): 67-73.  
XU Y, WEI HP, WU Y. Study on optimization of extraction of total flavonoids from *Dictyophora indusiata* by response surface methodology [J]. J Yangtze Univ (Nat Sci Ed), 2015, 12(15): 67-73.
- [16] 徐美青, 叶秀萍, 徐建恩. 竹荪总黄酮提取工艺的优化实验[J]. 食药用菌, 2020, 28(5): 306-308, 313.  
XU MQ, YE XP, XU JEN. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Dictyophora* [J]. Edible Med Mushrooms, 2020, 28(5): 306-308, 313.
- [17] 吴泉锦. 竹荪乙醇提取物抗氧化活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.

- WU XQ. Study on antioxidant activity of ethanol extract of *Dictyophora* [J]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2014.
- [18] 许远, 魏和平, 操璟璟. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取长裙竹荪总黄酮的工艺优化及抗氧化研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 204–210.
- XU Y, WEI HP, CAO JJ. Study on optimization of extraction of total flavonoids from *Dictyophora indusiata* Fisch. by supercritical CO<sub>2</sub> and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(12): 204–210.
- [19] 王彦辉, 林陈强, 邱宏端, 等. 棘托竹荪孢子粉抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(11): 1576–1581.
- WANG YH, LIN CQ, QIU HD, et al. Studies on antioxidant activities of *Dictyophora echinvolvata* spore [J]. Nat Prod Res Dev, 2013, 25(11): 1576–1581.
- [20] 宫雪, 张博, 辛广, 等. 食用菌中黄酮类物质的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2821–2827.
- GONG X, ZHANG B, XIN G, et al. Research progress of flavonoids in edible fungi [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2821–2827.
- [21] 王晓娅, 苏建青, 褚秀玲. 大孔树脂分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(0): 208–212.
- WANG XY, SU JQ, CHU XL. Research progress on separation and purification of flavonoids compounds by macroporous resin [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(8): 208–212.
- [22] 王玲玲. 辣木叶黄酮的提取纯化及抗疲劳活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- WANG LL. Extraction and purification of flavonoids from *Moringa oleifera* Lam. leaves and their anti-fatigue activity [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [23] 王广慧, 于德涵, 黎莉. 超声波辅助高压法提取金针菇黄酮的纯化及活性测定[J]. 东北农业科学, 2021, 46(3): 100–105.
- WANG GH, YU DH, LI L. Purification and activity determination of flavonoids from *Flammulina velutipes* extracted by ultrasonic assisted high pressure method [J]. J Northeast Agric Sci, 2021, 46(3): 100–105.
- [24] 李媛. 蓝莓渣中总黄酮的提取纯化及抗氧化性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- LI Y. Extraction and purification of total flavonoids from blueberry residue and study on their antioxidant properties [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020.
- [25] 孙琼. 杏鲍菇黄酮类化合物提纯及抗氧化活性研究[D]. 太原: 山西师范大学, 2015.
- SUN Q. Study on extraction and purification process of flavonoids from *Pleurotus eryngii* and its antioxidant activities [D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2015.
- [26] WANG J, LI SS, FAN YY, et al. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 421–423.
- [27] 晏俊玲, 樊扬, 秦川, 等. 苦竹笋总黄酮大孔树脂纯化工艺及其体外抗炎活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 184–192.
- YAN JL, FAN Y, QIN C, et al. Purification of total flavonoids from bamboo shoots of *Pleioblastus amarus* with macroporous resin and its anti-inflammation activity [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(23): 184–192.
- [28] 杨果, 李臣. 西番莲果皮黄酮纯化及其抗氧化与抗运动疲劳活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 72–80.
- YANG G, LI C. Purification and activity of antioxidation and resisting exercise fatigue of flavonoids from peel of passion fruit [J]. China Food Addit, 2022, 33(4): 72–80.
- [29] 王广慧, 谭吉丽, 杜艳超, 等. ADS-8 型大孔吸附树脂纯化金针菇总黄酮工艺的优化及活性测定[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(18): 112–115, 120.
- WANG GH, TAN JL, DU YC, et al. Optimization and activity determination of total flavonoids from *Flammulina velutipes* purified by ADS-8 macroporous adsorption resin [J]. Hubei Agric Sci, 2020, 59(18): 112–115, 120.
- [30] 张雨欣. 软枣猕猴桃茎黄酮的提取、纯化及其片剂的制备[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2022.
- ZHANG YX. Extraction and purification of flavonoids from *Actinidia Arguta* stems and preparation of tablets [D]. Shenyang: Liaoning University, 2022.
- [31] LI ZQ, ZHAO ZY, ZHOU ZQ. Simultaneous separation and purification of five polymethoxylated flavones from “Dahongpao” tangerine (*Citrus tangerina* Tanaka) using macroporous adsorptive resins combined with prep-HPLC [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2660.
- [32] YUAN T, WU D, SUN K, et al. Anti-fatigue activity of aqueous extracts of *Sonchus arvensis* L. in exercise trained mice [J]. Molecules, 2019, 24(6): 1168.
- [33] YANG S, LIAN JH, WANG LY, et al. The anti-fatigue and anti-anoxia effects of *Tremella* extract [J]. Saud J Biol Sci, 2019, 26(8): 2052–2056.
- [34] YOU LJ, ZHAO MM, REGENSTEIN J M, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. Food Chem, 2011, 124(1): 188–194.
- [35] CAIRNS SP. Lactic acid and exercise performance [J]. Sports Med, 2006, 36(4): 279–291.
- [36] KIM NH, MOON PD, PAK SC, et al. Anti-fatigue effect of *Zizania caudiflora* (*Turczaninow*) Nakai [J]. Am J Chin Med, 2012, 40(1): 111–120.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介

邵哲, 硕士, 讲师, 主要研究方向为中国传统体育养生与健康促进, 运动营养。  
E-mail: jipfei1989@163.com

钟袁源, 硕士, 讲师, 主要研究方向为传统体育养生与健康促进。  
E-mail: weihh007@163.com