

# 槲皮素、芦丁、没食子酸抑制 黄嘌呤氧化酶的活性及动力学特性

陈雨岑, 王莹莹, 杜若童, 赖慧宁, 郭耿成, 吴越, 王一凡, 罗红宇  
(浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 为了解槲皮素、芦丁、没食子酸及其与维生素 C 联用对黄嘌呤氧化酶(XOD)的抑制特性, 本文通过建立黄嘌呤氧化酶体外抑制模型, 以别嘌呤醇为阳性对照, 测定这三种天然化合物在不同浓度下对 XOD 的抑制效果及抑制动力学。结果表明: 三种物质对黄嘌呤氧化酶均有抑制作用, 且具有浓度依赖性, 其抑制效果与结构和本身性质有明显相关性, 抑制作用强弱次序为槲皮素>芦丁>没食子酸, 半抑制浓度  $IC_{50}$  值分别为  $(5.51\pm 0.41) \mu\text{mol/L}$ 、 $(48.66\pm 0.49) \mu\text{mol/L}$ 、 $>200 \mu\text{mol/L}$ ; 单一没食子酸抑制效果较弱, 而没食子酸在维生素 C 的协同下, 对 XOD 的抑制率从 20.17% 提高至 40.96%, 起到提高抑制效果和体系稳定性的双重作用; 以上三种物质对 XOD 的抑制类型属于不同模式的非典型混合抑制剂。本文对研究此类物质的抑制机理和应用有重要意义。

**关键词:** 黄嘌呤氧化酶; 半抑制浓度; 黄酮; 多酚; 米氏方程

文章编号: 1673-9078(2020)12-118-124

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0608

## Inhibitory Effect of Quercetin, Rutin and Gallic Acid on Xanthine Oxidase and Kinetic Characteristics

CHEN Yu-cen, WANG Ying-ying, DU Ruo-tong, LAI Hui-ning, GUO Geng-cheng, WU Yue, WANG Yi-fan,  
LUO Hong-yu

(School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** In order to understand the inhibitory properties of quercetin, rutin, gallic acid and its combination with vitamin C on Xanthine oxidase (XOD), a *vitro* inhibition model of XOD was established to evaluate the inhibitory effect of these three natural compounds on XOD at different concentrations. Allopurinol was used as the positive control. The inhibitory effects and kinetics of these three natural compounds on XOD at different concentrations were detected. The results showed that all the three substances had the inhibitory effect on XOD with concentration dependence, and the inhibitory effect was greatly related to the structure and their nature. The order of inhibition of XOD was as follow: quercetin > rutin > gallic acid. The  $IC_{50}$  values were  $(5.51\pm 0.41) \mu\text{mol/L}$ ,  $(48.66\pm 0.49) \mu\text{mol/L}$  and  $>200 \mu\text{mol/L}$  for the three substances respectively. In this work, the inhibition effect of gallic acid was weak and it was demonstrated that vitamin C could assist gallic acid to participate in the reaction. The inhibition rate increased from 20.17% to 40.96%. It could achieve the dual effect of enhanced inhibition of XOD activity and stability. The types of XOD inhibition by quercetin, rutin, and gallic acid belong to different modes of atypical mixed inhibitors. This work will be of great significance to study the inhibition mechanism and application of these substances.

**Key words:** Xanthine oxidase; semi-inhibitory concentration; flavonoids; polyphenols; Michaelis Menten

引文格式:

陈雨岑,王莹莹,杜若童,等.槲皮素、芦丁、没食子酸抑制黄嘌呤氧化酶的活性及动力学特性[J].现代食品科技,2020,36(12):118-124

CHEN Yu-cen, WANG Ying-ying, DU Ruo-tong, et al. Inhibitory effect of quercetin, rutin and gallic acid on xanthine oxidase and kinetic characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 118-124

收稿日期: 2020-07-01

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目资助 (201910340021); 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 项目 (2019R411018)

作者简介: 陈雨岑 (1999-), 女, 本科生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 王一凡 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学; 共同通讯作者: 罗红宇 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

黄嘌呤氧化酶(XOD)是尿酸生成的关键酶,与高尿酸血症的发生有关。该酶在人体内可催化次黄嘌呤氧化为黄嘌呤,再进一步或直接催化黄嘌呤氧化为尿酸。其同型二聚体具有对称的结构域,每一种都含有一个C端钼蛋白(Mo)结构域,包括四个氧化还原中心、一个中心黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅因子和一个具有两个铁硫中心的N-端结构域<sup>[1]</sup>。XOD对黄嘌呤和氧的催化作用是一种双底物酶促反应。当黄嘌呤在XOD的Mo中心氧化时,底物氧在FAD中心与转移的电子发生还原,生成超氧阴离子( $\cdot O_2^-$ )或过氧化氢( $H_2O_2$ )<sup>[2]</sup>。

黄嘌呤氧化酶抑制剂通过抑制XOD活性,切断尿酸生成途径,从而降低尿酸水平。Yan<sup>[3]</sup>等通过圆二色谱法和分子对接表明木犀草素与XOD活性部位的氨基酸残基相互作用,改变酶的二级结构,进而抑制黄嘌呤氧化酶活性;多酚、类黄酮化合物属于天然产物,广泛存在于蔬菜、水果、茶叶等各种食品和植物中,近年来发现许多类黄酮化合物可作为潜在的XOD抑制剂<sup>[4-8]</sup>。比如Cos P. Y等<sup>[9]</sup>研究了黄酮结构与抑制活性的关系,发现部分黄酮类化合物具有清除超氧化物抑制XOD的作用;De S.M.R.等<sup>[10]</sup>研究醇提取物得到的芦丁、芹黄素和羽扇豆醇与酶的配位结构为-OH和-C=O处,均有较好的XOD活性抑制能力;有研究表明没食子酸为极性物质,对黄嘌呤氧化酶抑制作用较弱,而没食子酸酯对XOD抑制效果更佳<sup>[11]</sup>。

但大多数研究都集中在对XOD的抑制效果和作用机理的探讨上,极少有对酶抑制类型的研究,可能与天然提取物非单一成分,不适用于作为抑制类型的研究体系有关。有报道槲皮素、芦丁用于小鼠实验显示其具有抗痛风作用<sup>[12]</sup>,但也未对它们的酶促动力学进行研究;少数有涉及这方面的报道<sup>[13]</sup>也缺乏结合抑制特性和机理的分析。然而酶促动力学研究有利于针对、高效地筛选酶抑制剂和揭示作用机理。本文通过建立体外酶抑制模型考察天然活性物质槲皮素、芦丁、没食子酸对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及抑制类型,

并探讨维生素C对没食子酸抑制XOD活性的协同作用。本研究通过酶促动力学分析进一步探讨黄酮多酚类化合物对XOD的抑制机理,为痛风疾病的防治提供方向和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

材料:槲皮素( $\geq 95\%$ )、芦丁( $\geq 95\%$ )、没食子酸( $\geq 95\%$ )、黄嘌呤( $\geq 99\%$ ),维生素C、NaOH、 $NaH_2PO_4$ 等为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。黄嘌呤氧化酶(5 U/0.5 mL),美国Sigma公司。

仪器:QUINTIX35-1CN电子天平,德国赛多利斯 Sartorius公司;Tecan Spark多功能酶标仪,瑞士Männedorf公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 黄嘌呤氧化酶活性抑制的体外模型建立

按参考文献<sup>[14]</sup>中方法稍作修改,具体如下:将磷酸盐缓冲液、黄嘌呤氧化酶溶液,依次加入96孔板,常温反应30 min,加入不同浓度黄嘌呤,加入量见表1,反应体系总体积200  $\mu L$ 。启动反应后,在290 nm处每隔20 s读数1次,记录吸光度,直至吸光值基本不变。每组平行设置3个复孔。

#### 1.2.2 样品对黄嘌呤氧化酶抑制活性的研究

将50  $\mu L$ 的各浓度样品和50  $\mu L$ 的100 U/L黄嘌呤氧化酶溶液反应30 min后,同1.2.1方法开始反应,记录吸光度A,磷酸缓冲液作为阴性对照,别嘌呤醇作为阳性对照。酶抑制实验具体测定方案见表1,设置空白组是排除试剂本身对实验的干扰。

由此,样品对黄嘌呤氧化酶的抑制率可用下列公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0 - A_1}\right) \times 100\%$$

表1 XOD活性测定方案

Table 1 XOD activity determination scheme

组别	磷酸缓冲液/ $\mu L$	黄嘌呤氧化酶/ $\mu L$	黄嘌呤/ $\mu L$	样品/(别嘌呤醇/ $\mu L$ )
阴性对照实验组 A <sub>0</sub>	50	50	100	0
阴性对照空白组 A <sub>1</sub>	100	0	100	0
样品/阳性实验组 A <sub>i</sub>	0	50	100	50
样品/阳性空白组 A <sub>j</sub>	50	0	100	50

#### 1.2.3 样品对XOD的抑制类型研究

利用所建立的体外模型,确定XOD的终浓度为25 U/L,测定酶促反应动力学相关参数,根据Michaelis-Menten方程<sup>[15]</sup>,以Lineweaver-Burk双倒数方程作图,

分析不同浓度样品,不同底物浓度对反应速率的影响,最终判断槲皮素、芦丁、没食子酸对XOD抑制作用的可逆性及其可逆抑制反应类型。

#### 1.2.4 IC<sub>50</sub>值的计算

IC<sub>50</sub> 值可以量化样品对 XOD 的抑制能力, 故本文根据酶抑制剂的浓度和平均抑制率来计算抑制剂对酶的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 1.2.5 数据处理

试验所得数据使用 Microsoft Excel 和 Origin 软件进行数据处理和作图, 采用 SPSS Statistics 软件计算 IC<sub>50</sub> 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶促反应体系的优化

#### 2.1.1 底物黄嘌呤浓度与反应进度的关系

反应体系的组成可对酶促反应速率产生影响, 因此, 设置酶浓度为 25 U/L, 考察反应体系中黄嘌呤浓度分别为 75、100、150、200 μmol/L 时的反应速率, 结果见图 1。各组吸光度值(与尿酸生成量正相关)均随反应的进行不断增大, 直至反应完全到达平衡, 此时吸光度不再变化; 且黄嘌呤浓度越高, 反应达到平衡所需时间越长; 在反应前 5 min, 各组吸光度值与反应时间呈线性关系, 说明在该酶浓度下底物过量, 反应匀速进行, 故将这段时间反应速度作为初始反应速率。其中 75 μmol/L 黄嘌呤可在 10 min 内完成反应, 比其它浓度下的反应时间都短。

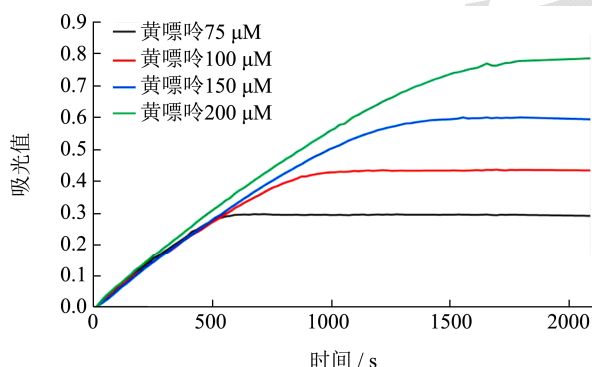


图 1 对照组底物浓度与吸光度变化关系

Fig.1 The relationship between substrate concentration and absorbance in control group

#### 2.1.2 黄嘌呤浓度对样品抑制 XOD 的影响

设置各组样品浓度均为 50 μmol/L, 考察不同样品对酶的抑制作用与底物浓度的关系, 结果如图 2 所示。由图可知, 槲皮素、芦丁、没食子酸的抑制效果随黄嘌呤浓度的增大均呈下降趋势, 但下降程度略有不同, 而阳性对照别嘌呤醇能保持稳定良好的抑制效果。这可能是由于三种抑制剂与黄嘌呤和酶的反应存在竞争关系, 在底物浓度较高的时, 有利于黄嘌呤与 XOD 结合反应生成尿酸, 导致抑制剂与酶的亲和能力下降, 从而导致抑制率下降<sup>[6]</sup>。综上, 后续实验确定

底物黄嘌呤的浓度为 75 μmol/L。

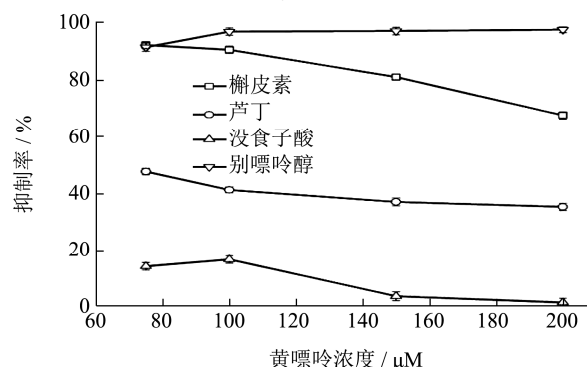


图 2 XOD 抑制活性与底物浓度的量效关系

Fig.2 The dose-effect relationship between XOD inhibitory activity and substrate concentration

### 2.2 槲皮素、芦丁、没食子酸对黄嘌呤氧化酶的抑制效果

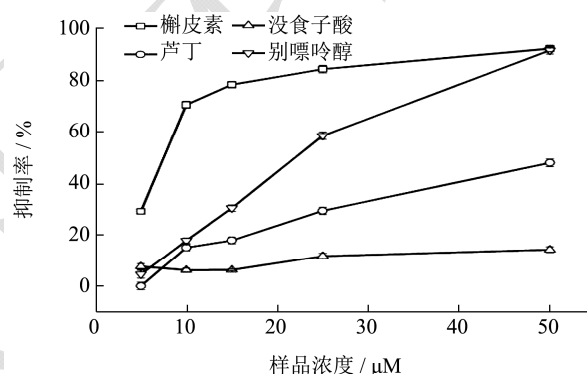


图 3 样品浓度与 XOD 酶抑制率的量效关系

Fig.3 The dose-effect relationship between sample concentration and XOD enzyme inhibition rate

设置槲皮素、芦丁、没食子酸浓度分别为 5、10、15、25、50 μmol/L, 以探究样品浓度对 XOD 的抑制效果, 以别嘌呤醇为阳性对照, 结果如图 3。由图 3 可知, 三种天然化合物对黄嘌呤氧化酶均有抑制效果, 且具有浓度依赖性, 其中槲皮素在高于 10 μmol/L 的浓度下抑制率可到达 70%以上, 优于同浓度的阳性对照别嘌呤醇, 当浓度达到 50 μmol/L 时, 两者抑制效果基本相同; 芦丁对 XOD 的抑制效果明显, 但低于槲皮素和阳性对照, 而没食子酸在实验的浓度范围内抑制率为 15%~20%。

槲皮素与芦丁同属于黄酮类化合物, 结构如图 4a 和图 4b, 试验显示相同摩尔浓度的这两种物质, 槲皮素对黄嘌呤氧化酶活性的抑制更加有效, 有研究发现 C-5 和 C-7 上的羟基以及 C-2 和 C-3 之间的双键对黄嘌呤氧化酶的高抑制活性至关重要<sup>[17]</sup>, 这就解释了槲皮素高抑制率的原因。Zhao J 等<sup>[18]</sup>发现黄酮类化合物

的核心碳支架C-3和C-7经糖基化后增大了分子体积, 阻断酶活性位点的进入, 导致芦丁的抑制效果显著降低, 这可能就是其抑制能力不如槲皮素的原因。

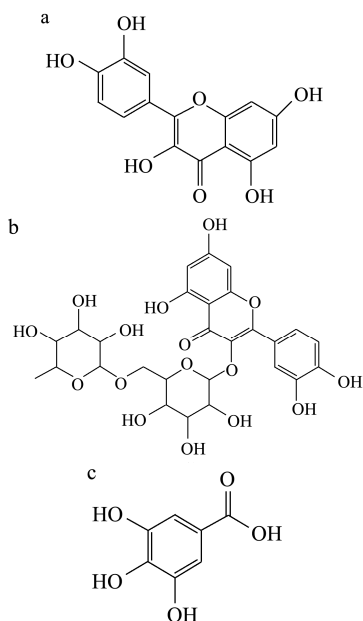


图4 三种化合物的结构<sup>[12,19]</sup>

Fig.4 The structure of the three compounds

注: a: 槲皮素; b: 芦丁; c: 没食子酸。

研究表明酚羟基对酶抑制起作用, 没食子酸为单苯环单羧基三羟基结构(图4c), 与槲皮素和芦丁相比, 单分子下酚羟基官能团较少; 另外, 与槲皮素和芦丁的水难溶性不同, 没食子酸的亲水性较强, 导致其酚羟基与黄嘌呤氧化酶的疏水活性位点排斥不易结合<sup>[19,20]</sup>。图5为增加没食子酸浓度后其对XOD抑制率的情况, 结果发现, 没食子酸浓度达到500 μmol/L时, 其抑制率已经超过50%, 并随着浓度进一步增大抑制率继续升高, 这可能与高浓度抑制剂充分包裹黄嘌呤氧化酶, 阻碍黄嘌呤与酶的作用有关<sup>[21]</sup>。

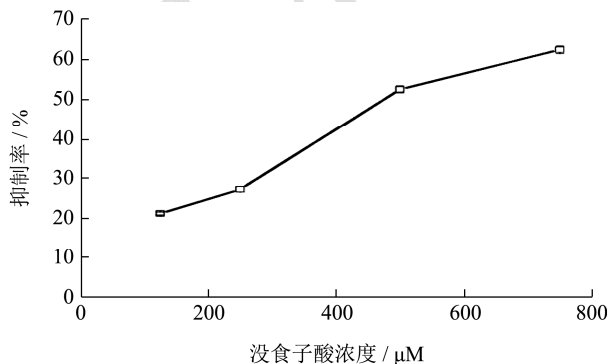


图5 没食子酸浓度与抑制率的关系

Fig.5 Relationship between gallic acid concentration and inhibition rate

### 2.3 没食子酸、维生素C协同作用对黄嘌呤氧

### 化酶的抑制效果

实验过程发现, 在 pH 7.5 的缓冲液反应体系中, 没食子酸的颜色会随时间发生变化, 浓度高时尤为明显, 这与没食子酸易被氧化降解有关, 而维生素C是天然抗氧化物质, 具备清除黄嘌呤酶促反应过程中生成的·O<sub>2</sub>或H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力, 徐燕等<sup>[22]</sup>证明了表没食子儿茶素、没食子酸酯和维生素C联用可有效降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平, Ye Z J等<sup>[17]</sup>采用高效液相色谱法分离没食子酸的降解产物并证明其对黄嘌呤氧化酶有抑制作用, 但未明确其作用机理。本文考察了没食子酸和维生素C联用对XOD的酶抑制实验, 结果见表2。维生素C对XOD基本没有抑制作用, 但没食子酸和维生素C联用组的酶抑制率明显高于没食子酸组, 由此证明, 维生素C对没食子酸抑制XOD具有协同增效作用, 这可能与Vc的强还原性防止没食子酸被氧化降解有关。

表2 维生素C对没食子酸抑制XOD的协同效应

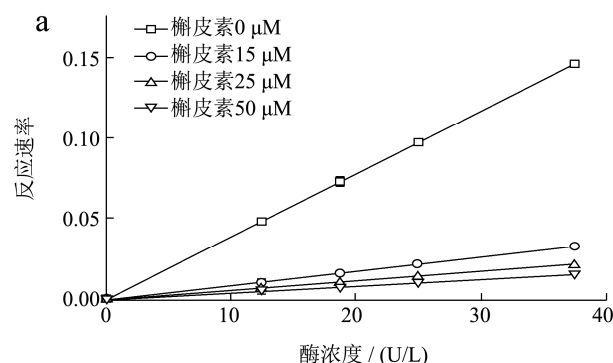
Table 2 Synergistic effect of vitamin C on gallic acid inhibition of XOD

组别	浓度/μM	抑制率/%
A 没食子酸	250	27.17±0.13
B 维生素C	1250	1.82±0.04
联用组	A: 250 B: 1250	40.96±0.25

### 2.4 槲皮素、芦丁、没食子酸对XOD的抑制

#### 类型

对酶抑制类型的研究可更深入地了解抑制剂的作用途径, 并为XOD抑制剂的研究和临床应用提供理论参考。在抑制剂-XOD反应体系中, 通过考察不同抑制剂浓度下, 反应速率随酶浓度的变化关系, 来确定抑制剂的可逆性与不可逆性, 结果如图6所示。如图所见, 三组数据所有的直线都经过起点, 随着样品浓度的增加, 直线的斜率下降, 说明槲皮素、芦丁、没食子酸是一种可逆的XOD抑制剂。



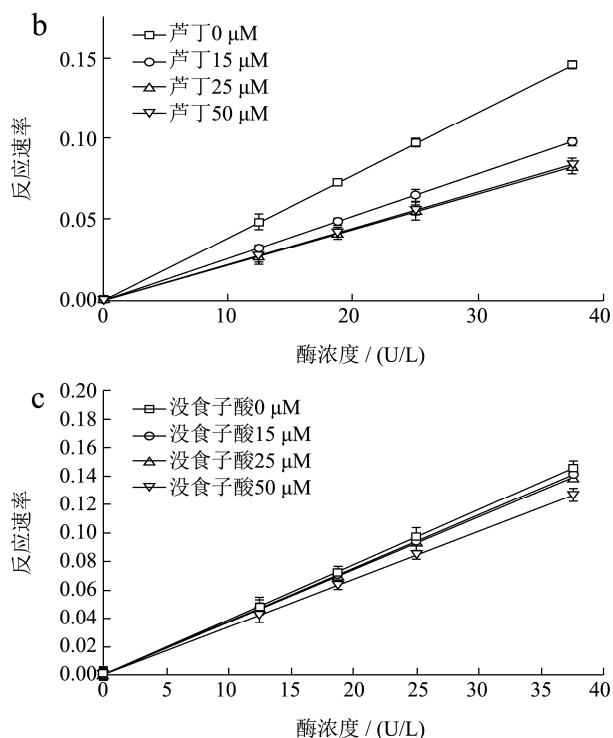


图6 不同浓度下, 酶浓度与反应速率的关系

Fig.6 The relationship between enzyme concentration and reaction rate at different concentrations

为了阐明槲皮素、芦丁和没食子酸对 XOD 的可逆抑制类型, 通过 Lineweaver Burk 图监测  $K_m$  (米氏常数) 和  $V_{max}$  值 (最大反应速率) 的变化来研究它们的抑制动力学, 其中, 斜率为  $K_m$  和  $V_{max}$  的比值, y 轴截距为  $1/V_{max}$  的值, 如图 7 所示。图 7 显示直线斜率均是随槲皮素、芦丁和没食子酸的浓度增加而增大。从图 7a 看出, 槲皮素浓度在 10~50  $\mu\text{M}$  内时, 五条直线基本相交于第一象限的一点, 说明槲皮素对黄嘌呤氧化酶的抑制类型不是纯粹的竞争性, 属于一种特殊的混合抑制剂, 它是通过氢键和范德华力的作用与位点结合改变 XOD 的二级结构, 降低底物与催化中心的接触几率, 从而起到抑制作用<sup>[18,23]</sup>, Umeo Takahama 等<sup>[24]</sup>的研究也表明其抑制类型为混合型 (竞争-非竞争), 实验数据的差异可能是由于实验设计不同所致; 图 7b 显示了随芦丁浓度增大,  $K_m$  增大,  $V_m$  减小, 不同浓度的芦丁的五条直线在第二象限相交于一点, 且交点靠近 y 轴, 符合混合抑制剂的特征, 表明芦丁是一种竞争性占优势的混合型抑制剂, 故芦丁对黄嘌呤氧化酶的抑制, 体现在它们既可以与黄嘌呤竞争该反应酶的活性部位, 又可与酶的其他部位结合来抑制酶-底物复合物生成尿酸<sup>[25,26]</sup>, 目前尚未有对芦丁抑制类型的报道, 但 Zhu J X<sup>[12]</sup>、Flemmig J.<sup>[27]</sup>等均有证明芦丁对 XOD 活性抑制作用; 由图 7c 可见, 没食子酸抑制类型与槲皮素相似, 也属于一种特殊的混合抑制剂,

但其斜率随没食子酸浓度变化不及槲皮素显著, Noriyoshi Masuoka 等<sup>[11]</sup>发现没食子酸酯可竞争性地抑制尿酸生成, 而没食子酸与其结构骨架相同, 推测没食子酸和没食子酸酯一样, 它们的酚羟基均可与黄嘌呤竞争酶活性位点而达到抑制效果, 故可认为没食子酸是一种偏向竞争型的混合型抑制剂。

综上所述, 经 Lineweaver Burk 图分析发现, 黄酮多酚类化合物的 XOD 抑制类型可能不属于经典竞争性抑制和非竞争性抑制, 而是特殊的混合抑制类型, 这对探讨黄酮类化合物对 XOD 的抑制特性和机理有一定的启发。

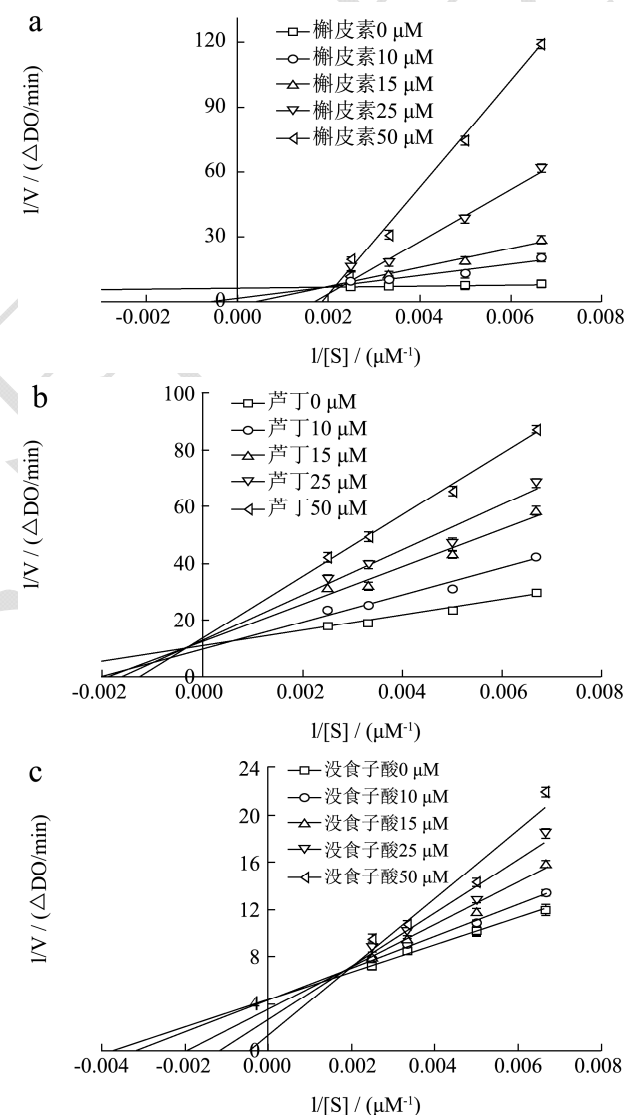


图7 槲皮素、芦丁、没食子酸对黄嘌呤的 Lineweaver Burk 曲线

Fig.7 Lineweaver Burk curves of quercetin, rutin, gallic acid against xanthine

### 2.5 IC<sub>50</sub> 值的计算

通过计算得到槲皮素、芦丁、没食子酸和别嘌呤

醇的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 结果见表3。数据显示几种抑制剂的抑制强度为槲皮素>别嘌呤醇>芦丁>没食子酸, 没食子酸抑制作用微弱。Salem<sup>[28]</sup>等测得槲皮素对 XOD 抑制作用的 IC<sub>50</sub> 为 6.0 μmol/L; Zhang C<sup>[29]</sup>等研究槲皮素抑制作用得到的 IC<sub>50</sub> 值为 2.74 μmol/L, 抑制效果较好, 槲皮素对黄嘌呤氧化酶的抑制活性高于别嘌呤醇; Zhao J 等<sup>[18]</sup>得到槲皮素的 IC<sub>50</sub> 值为 (4.03±0.73) μmol/L, 对 XOD 有很强的抑制作用, 而芦丁等物质抑制作用较弱大于 200 μmol/L; 而 Neelam Malik 等<sup>[25]</sup>测得芦丁的 IC<sub>50</sub> 值为 (20.867±0.12) μmol/L。本研究中, 槲皮素 IC<sub>50</sub> 值为 (5.51±0.41) μmol/L, 显著高于临床药物别嘌呤醇, 与其它文献的结论基本一致, 而芦丁、没食子酸未找到较为统一的参考数据, 其 IC<sub>50</sub> 值的差异主要是由于实验方法和样品纯度的差异所致。由此可见, 槲皮素用于临床抗痛风药物的开发具有潜在价值, 这可能与槲皮素和 XOD 特定活性位点氨基酸残基空间互补有关<sup>[30]</sup>。

表3 各抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值Table3 IC<sub>50</sub> value of each inhibitor

种类	IC <sub>50</sub> 值/(μmol/L)
槲皮素	5.51±0.41
芦丁	48.66±0.49
没食子酸	>200
别嘌呤醇	24.09±0.51

### 3 结论

3.1 天然植物活性物质槲皮素、芦丁、没食子酸对 XOD 都有不同程度的抑制作用, 抑制强弱的顺序为槲皮素>芦丁>没食子酸, 其中槲皮素对 XOD 的抑制效果强于临床用药别嘌呤醇, 在浓度为 50 μmol/L 时, 抑制率达到 90% 以上, 半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 (5.51±0.41) μmol/L; 芦丁结构中虽然有多个酚羟基, 但因空间位阻导致其抑制效果低于槲皮素, 其 IC<sub>50</sub> 为 (48.66±0.49) μmol/L; 低浓度的没食子酸抑制作用较弱, 当浓度大于 500 μmol/L 时, 抑制率可提升至 50%, 250 μmol/L 没食子酸与 1250 μmol/L 维生素 C 联用对 XOD 的抑制率达到 (40.96±0.25)%, 比同浓度的没食子酸抑制率提高了近 15%, 其与维生素 C 的协同作用不仅增强自身稳定性, 还可提高对 XOD 的抑制活性, 故其可考虑作为缓解痛风及并发炎症的联合药物进行研发。

3.2 本实验表明槲皮素、没食子酸属于一种特殊的混合抑制剂, 芦丁是一种竞争性占优势的混合型抑制剂。这三种非经典抑制模式, 说明了黄酮多酚类物质有多个位点可与黄嘌呤氧化酶结合, 为研究这些化合物的酶抑制机理和应用开发提供了方向和理论依据。

### 参考文献

- [1] Enroth C, Eger B T, Okamoto K, et al. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(20): 10723-10728
- [2] Cicalese, Stephanie, Scalia, et al. Xanthine oxidase inhibition as a potential treatment for aortic stiffness in hypertension [J]. American Journal of Hypertension, 2019, 32(3): 234-236
- [3] Yan J, Zhang G, Hu Y, et al. Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3766-3773
- [4] Mohos V, Eszter Nyúl, Miklós Poór. Inhibition of xanthine oxidase-catalyzed xanthine and 6-mercaptopurine oxidation by flavonoid aglycones and some of their conjugates [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3256
- [5] 郝悦, 焦安妮, 于敏, 等. 30 种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性的筛选 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 55-59  
HAO Yue, JIAO An-ni, YU Min, et al. Activity screening of thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(1): 55-59
- [6] Malik Neelam, Dhiman Priyanka, Khatkar Anurag. Mechanistic approach towards interaction of newly synthesized Hesperidin derivatives against xanthine oxidase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 864-876
- [7] Zeng N, Zhang G, Hu X, et al. Mechanism of fisetin suppressing superoxide anion and xanthine oxidase activity [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 1-10
- [8] 方天仪, 李曼曼, 丁雪东, 等. 16 种中药水提物和醇提物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, 7: 112-115  
FANG Tian-yi, LI Man-man, DING Xue-dong, et al. Inhibitory effect of water extracts and alcohol extracts from 16 kinds of traditional Chinese medicine on xanthine oxidase [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 7: 112-115
- [9] Cos P Y, Calomme M, Hu J P, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers [J]. J Nat Products, 1998, 61(71): 11-15
- [10] De S M R, Paula C A, Pereira D, et al. Pharmacological basis

- for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 24: 111-119
- [11] Noriyoshi Masuoka, Isao Kubo. Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds [J]. *Phytochemistry*, 2018, 155: 100-106
- [12] Zhu J X, Wang Y, Kong L D, et al. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 93(1): 133-140
- [13] 谢凯莉,李昭华,董先智,等.槲皮素抑制黄嘌呤氧化酶活性的研究进展[J].*时珍国医国药*,2019,9:2223-2225  
XIE Kai-li, LI Zhao-hua, DONG Xian-zhi, et al. Research progress of quercetin on inhibiting the activity of xanthine oxidase [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 9: 2223-2225
- [14] 赵守涣,杨慧,史冠莹,等.响应面法优化三种天然产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J].*食品工业科技*,2018,39(5): 230-234  
ZHAO Shou-huan, YANG Hui, SHI Guan-ying, et al. Optimization of the three natural products' inhibitory effect on xanthine oxidase by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 230-234
- [15] Rich Daniel H. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* [M]. Hoboken: Robert A Copeland, 2005
- [16] Jang Hoon Kim, Chang Hyun Jin. Xanthine oxidase inhibitory activity of isoflavonoids from *Apios americana* [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2019, 83: 107137
- [17] Ye Z J, He X A, Wu J P, et al. New prenylflavonol glycosides with xanthine oxidase inhibitory activity from the leaves of *Cyclocarya paliurus* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020
- [18] Zhao J, Huang L, Sun C Y, et al. Studies on the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and xanthine oxidase through enzyme kinetics, spectroscopy methods and molecular simulations [J]. *Food Chemistry*, 2020, 323
- [19] Masuoka Noriyoshi, Nihei Ken-ichi, Kubo Isao. Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006, 50(8): 725-731
- [20] Pan J F, Lian H L, Jia H, et al. Ultrasound treatment modified the functional mode of gallic acid on properties of fish myofibrillar protein [J]. *Food Chemistry*, 2020, 320
- [21] Cao W W, Fang Y J, Wu T, et al. Insights from multispectral and molecular docking investigation on the xanthine oxidase inhibition by 1,4-dicaffeoylquinic acid [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1219
- [22] 徐燕,蔡吓强,解千金,等.表没食子儿茶素没食子酸酯和维生素 C 联用对高尿酸血症小鼠血尿酸水平的影响[J].*茶叶科学*,2020,40(3):407-414  
XU Yan, CAI Xia-qiang, XIE Qian-jin, et al. The intergative effects of epigallocatechin-3-gallate and Vitamin C on serum uric acid levels in hyperuricemic mice [J]. *Journal of Tea Science*, 2020, 40(3): 407-414
- [23] Tang H J, Zhao D S. Investigation of the interaction between salvianolic acid C and xanthine oxidase: Insights from experimental studies merging with molecular docking methods [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 8
- [24] Umeo Takahama, Yukiko Koga, Sachiko Hirota, et al. Inhibition of xanthine oxidase activity by an oxathiolanone derivative of quercetin [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1808-1811
- [25] Neelam Malik, Priyanka Dhiman, Anurag Khatkar. In silico design and synthesis of targeted rutin derivatives as xanthine oxidase inhibitors [J]. *BMC Chemistry*, 2019, 13(1): 1-13
- [26] Hyang Dok-Go, Kwang Heun Lee, Hyoung Ja Kim, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten* [J]. *Brain Research*, 2003, 965(1-2): 130-136
- [27] Flemmig J, Kuchta K, Arnhold J, et al. *Olea europaea* leaf extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(7): 561-566
- [28] Salem J H, Chevalot I, Harscoat-Schiavo, et al. Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(2): 486-494
- [29] Zhang C, Wang R, Zhang G W, et al. Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112
- [30] Cao H, Pauff J M, Hille R. X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin [J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(7): 1693-1699