摘　　要

刺玫果黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制及槲皮素微胶囊制备表征

刺玫果，是一种广泛分布于东北地区的野生植物，其果实中含有多种功效成分，具有抗疲劳、抗氧化、抗炎等活性功能。刺玫果中黄酮化合物成分丰富，其中槲皮素、山奈酚、芦丁、金丝桃苷、木犀草素等是较为常见的几种黄酮。黄嘌呤氧化酶（Xanthine Oxidase，XOD）是参与嘌呤代谢过程中非常关键的一种酶，可以催化生成尿酸，如果尿酸含量过高，会引发高尿酸血症，进而导致痛风。黄酮化合物可以用作开发天然无毒的 XOD 抑制剂，来抑制尿酸生成。但因黄酮化合物稳定性差，长期储藏过程中易受 pH、温度、光照的影响而氧化分解，故本文将槲皮素作为芯材，海藻酸钠作为壁材，制备微胶囊并进行表征，进一步为黄酮化合物应用于食品药品行业提供理论依据。本文具体研究工作如下：

（1）采用超声辅助酶解法从刺玫果中提取黄酮，考察酶解时间、超声时间、酶解温度、纤维素酶浓度、乙醇体积分数以及提取方式对刺玫果总黄酮提取率的影响，确定最佳提取参数，并进行响应面分析，从而得到最优提取条件：酶解时间为 2.07 h，乙醇体积分数为 54.09%，酶解温度为 50.82℃，纤维素酶浓度为 8.50 mg/g，在此条件下刺玫果总黄酮最大提取率为 44.83%，对最佳提取条件进行验证，所得到的总黄酮提取率为 46.80%，与响应面预测值接近。

（2）通过酶反应动力学实验，以别嘌呤醇作为阳性对照，考察槲皮素、芦丁和金丝桃苷对 XOD 活性的影响。结果表明，三种黄酮均对 XOD 活性有较好的抑制作用，且它们的半抑制浓度（IC_{50}）为：（8.33 ± 0.36） μmol/L、（60.81 ± 0.19） μmol/L、（35.22 ± 0.4） μmol/L。在酶浓度与酶促反应速率线性关系图中，不同浓度的三种黄酮均经过原点，且在 Lineweaver-Burk 关系图中，均在第二象限相交于一点，由此证明槲皮素、芦丁和金丝桃苷对 XOD 均为可逆的竞争-非竞争混合型抑制。

（3）用槲皮素、芦丁和金丝桃苷对 XOD 进行荧光滴定，根据 Stern-Volmer 方程计算其猝灭常数 K_{SV}。结果显示，三者的 K_{SV} 值均随温度的升高而降低，且在不同温度下三者的猝灭速率常数 K_q 均大于最大猝灭常数，由此证明槲皮素、芦丁和金丝桃苷对 XOD 均为静态荧光猝灭。根据 van’t Hoff 方程计算热力学参数，得到其焓变、熵变与自由能值均为负值，由此证明三者均通过范德华力和氢

键与 XOD 自发结合。同步荧光实验结果显示，槲皮素与 XOD 的结合会使酪氨酸和色氨酸的最大波长出现红移，证明其降低了二者微环境的疏水性，而芦丁和金丝桃苷与 XOD 的结合仅仅使色氨酸出现明显红移，由此证明其对酪氨酸影响不大。通过计算酪氨酸和色氨酸的同步荧光猝灭率（Ratios of Synchronous Fluorescence Quenching，RSFQ），得到在相同浓度下色氨酸的 RSFQ 值大于酪氨酸，证明在荧光猝灭过程中，色氨酸残基的作用大于酪氨酸残基，黄酮化合物的结合位点与色氨酸相近。

（4）以槲皮素为芯材，海藻酸钠为壁材，利用锐孔法制备槲皮素微胶囊，设计单因素实验和正交实验，确定最佳制备条件：芯壁比为 1:1，海藻酸钠浓度为 2%，$CaCl_2$ 溶液浓度为 4%，此时包埋率最高为 96.88%。对最佳条件下制得的微胶囊进行体外模拟消化及表征：7 h 后肠液累计释放量达到 65.38%，胃液累计释放量为 24.77%，由此得到微胶囊具有较好的缓释作用；微胶囊的微观形貌图（SEM）显示微胶囊结构紧密，成型效果好；通过对微胶囊傅里叶红外光谱（FTIR）、X 射线衍射（XRD）和差式扫描量热（DSC）图谱的分析，槲皮素大部分特征峰在微胶囊特征峰中均能找到，证明槲皮素已经成功地被包埋；对游离槲皮素和微胶囊进行四种抗氧化活性的比较，结果表明，被包埋后抗氧化性降低。

关键词：

刺玫果，黄酮，黄嘌呤氧化酶，微胶囊，槲皮素

Abstract

Inhibition of xanthine oxidase by flavone from rose hip, preparation and characterization of quercetin microcapsules

Rose hip is a kind of wild plant widely distributed in northeast China. Its fruit contains a variety of effective components, with anti-fatigue, anti-oxidation, anti-inflammatory and other active functions. Flavonoid compounds in rose hip are abundant, among which quercetin, kaempferol, rutin, hyperoside and luteolin are common ones. Xanthine oxidase (XOD) is a very key enzyme involved in purine metabolism, which can catalyze the production of uric acid. If the content of uric acid is too high, hyperuricemia will be triggered, and then lead to gout. Flavonoid compounds can be used to develop natural non-toxic XOD inhibitors to inhibit uric acid production. Due to the poor stability of flavonoid compounds, they are prone to oxidation and decomposition under the influence of pH, temperature and light during long-term storage. Therefore, in this paper, quercetin is used as the core material and sodium alginate as the wall material to prepare and characterize microcapsules, which further provide theoretical basis for the application of flavonoid compounds in the food and drug industry. The specific research work of this paper is as follows:

(1) The ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis method was used to extract flavonoids from rose hip. The effects of enzymatic hydrolysis time, ultrasonic time, enzymatic hydrolysis temperature, cellulase concentration, ethanol volume fraction and extraction methods on the extraction rate of total flavonoids were investigated. The optimal extraction parameters were determined and response surface analysis was carried out to obtain the optimal extraction conditions: The enzymatic hydrolysis time was 2.07 h, the ethanol volume fraction was 54.09%, the digestion temperature was 50.82 ℃, and the cellulase concentration was 8.50 mg/g. Under this condition, the maximum extraction rate of the flavonoids was 44.83%. The optimal extraction condition was verified, and the resulting total flavonoids extraction rate was 46.80%, which was close to the predicted value of the response surface.

(2) The effects of quercetin, rutin and hyperoside on the activity of XOD were

investigated by enzyme reaction kinetics experiment with allopurinol as positive control. The results showed that the three flavonoids had good inhibitory effects on XOD activity, and their half-inhibitory concentrations (IC_{50}) were (8.33 ± 0.36) μmol/L, (60.81 ± 0.19) μmol/L, (35.22 ± 0.4) μmol/L. In the linear relationship between enzyme concentration and enzymatic reaction rate, the three flavonoids with different concentrations all pass through the origin. In the Lineweaver-Burk diagram, they all intersect at a point in the second quadrant, which proves that quercetin, rutin and hyperoside all have reversible competition-non-competitive mixed inhibition on XOD.

(3) Quercetin, rutin and hyperoside were used for fluorescence titration of XOD, and the quenching constant K_{SV} was calculated according to Stern-Volmer equation. The results showed that the K_{SV} values of the three flavonoids decreased with the increase of temperature, and the quenching rate constant K_q of the three flavonoids was greater than the maximum quenching constant at different temperatures. It was proved that quercetin, rutin and hyperoside all quenched XOD by static fluorescence. The thermodynamic parameters were calculated according to the van't Hoff equation, and the enthalpy change, entropy change and free energy change were all negative values. It was proved that the three flavonoids spontaneously combined with XOD through van der Waals force and hydrogen bond. The results of synchronous fluorescence experiment showed that the combination of quercetin and XOD could redshift the maximum wavelength of tyrosine and tryptophan, which proved that it reduced the hydrophobicity of the microenvironment of both, while the combination of rutin and hypericin with XOD only caused obvious redshift of tryptophan, which proved that it had little effect on tyrosine. According to calculation of Synchronous Fluorescence Quenching rate (RSFQ) between tyrosine and tryptophan, RSFQ value of tryptophan is higher than tyrosine at the same concentration, proving that in the fluorescence quenching process, The effect of tryptophan residues was greater than that of tyrosine residues, and the binding site of flavonoids was similar to tryptophan.

(4) Using quercetin as core material and sodium alginate as wall material, quercetin microcapsules were prepared by the sharp-hole method. Single factor

experiment and orthogonal experiment were designed to determine the optimal preparation conditions as follows: Core wall ratio was 1:1, sodium alginate concentration was 2%, $CaCl_2$ solution concentration was 4%, the highest embedding rate of 96.88%. Simulated digestion and characterization of microcapsules prepared under optimal conditions in vitro: After 7 h, the cumulative release amount of intestinal fluid was 65.38% and gastric fluid was 24.77%, indicating that microcapsules had a good slow-release effect. The microcapsule microstructure (SEM) showed that the microcapsule structure was tight and the molding effect was good. By means of fourier infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and Differential scanning calorimetry (DSC) analysis, most of the characteristic peaks of quercetin can be found in the characteristic peaks of the microcapsules, which proves that quercetin has been successfully embedded. Four antioxidant activities were compared between free quercetin and microcapsules. The results showed that the antioxidant activity decreased after embedding.

Key words:

Rose hip, flavonoids, xanthine oxidase, microcapsule, quercetin

目　　录

第 1 章　绪论 1
1.1　刺玫果概述 1
1.1.1　刺玫果活性成分 1
1.1.2　刺玫果活性功能 2
1.2　刺玫果总黄酮研究进展 2
1.2.1　刺玫果黄酮成分及含量 2
1.2.2　刺玫果总黄酮提取方法 4
1.3　黄嘌呤氧化酶概述 5
1.3.1　黄嘌呤氧化酶结构和催化机制 5
1.3.2　黄嘌呤氧化酶与疾病 7
1.3.3　黄嘌呤氧化酶抑制剂研究进展 7
1.4　微胶囊概述 9
1.4.1　微胶囊简介 9
1.4.2　微胶囊制备方法研究现状 10
1.5　研究意义与内容 12
1.5.1　选题意义 12
1.5.2　研究内容 13
1.5.3　创新点 13
1.5.4　技术路线 14
第 2 章　刺玫果黄酮的提取及优化实验 15
2.1　材料与仪器 15

2.1.1 实验材料 15
2.1.2 实验仪器 15
2.2 实验方法 16
2.2.1 标准曲线的绘制 16
2.2.2 刺玫果总黄酮含量的测定 17
2.2.3 单因素实验 17
2.2.4 响应面优化实验 19
2.2.5 数据处理与分析 19
2.3 实验结果 19
2.3.1 标准曲线 19
2.3.2 单因素实验 20
2.3.3 响应面优化实验 24
2.4 本章小结 28
第 3 章 槲皮素、金丝桃苷和芦丁对黄嘌呤氧化酶的抑制动力学 ..29
3.1 材料与仪器 29
3.1.1 实验材料 29
3.1.2 实验仪器 29
3.2 实验方法 30
3.2.1 三种黄酮对 XOD 催化生成尿酸抑制率的测定 30
3.2.2 三种黄酮对 XOD 的抑制可逆性 30
3.2.3 三种黄酮对 XOD 的抑制作用类型 30
3.2.4 数据处理与分析 30

3.3 实验结果 31
3.3.1 三种黄酮对 XOD 的抑制作用 31
3.3.2 三种黄酮对 XOD 的抑制类型 32
3.4 本章小结 34
第 4 章 槲皮素、金丝桃苷、芦丁与黄嘌呤氧化酶结合性质研究 ..35
4.1 材料与仪器 35
4.1.1 实验材料 35
4.1.2 实验仪器 35
4.2 实验方法 36
4.2.1 荧光滴定实验 36
4.2.2 同步荧光光谱的测定 36
4.2.3 数据处理与分析 36
4.3 实验结果 37
4.3.1 三种黄酮对 XOD 的猝灭形式分析 37
4.3.2 结合常数、结合位点数和热力学分析 39
4.3.3 三种黄酮同步荧光光谱分析 41
4.4 本章小结 43
第 5 章 槲皮素微胶囊的制备和表征 44
5.1 材料与仪器 44
5.1.1 实验材料 44
5.1.2 实验仪器 45
5.2 实验方法 45

5.2.1 锐孔法制备槲皮素微胶囊 45
5.2.2 微胶囊包埋率的测定 46
5.2.3 微胶囊的单因素实验 46
5.2.4 正交法优化微胶囊工艺实验 47
5.2.5 微胶囊形态观察分析 47
5.2.6 微胶囊红外光谱测定 48
5.2.7 微胶囊热稳定性测定 48
5.2.8 微胶囊 X 射线衍射测定 48
5.2.9 微胶囊体外模拟释放实验 48
5.2.10 微胶囊化后槲皮素抗氧化活性的变化 49
5.2.11 数据处理与分析 50
5.3 实验结果 50
5.3.1 单因素实验 50
5.3.2 正交法优化实验 53
5.3.3 微胶囊质量评价与表征 53
5.3.4 微胶囊红外光图谱分析 55
5.3.5 微胶囊 DSC 图谱分析 55
5.3.6 微胶囊 X 射线图谱分析 56
5.3.7 微胶囊体外模拟释放实验 57
5.3.8 微胶囊化后槲皮素抗氧化活性的变化 58
5.4 本章小结 59
第 6 章 结论与展望 60

6.1 结论 60
6.2 展望 61
参考文献 62
导师简介 72
作者简介及科研成果 73
致 谢 74

第 1 章　绪论

1.1　刺玫果概述

刺玫果（*Rosa davurica* Pall），又被称为野玫瑰果，是属于蔷薇科蔷薇属野蔷薇种的一种落叶小灌木[1]，植株高约为 1-1.5 cm，枝条上有密刺，夏季开花，秋冬果实成熟，色泽鲜红，酸甜，具有很高的经济价值。在中国北方的原始森林中，如大兴安岭、小兴安岭等地，生长着大量天然刺玫果，内蒙古、山西、华北等地区也有分布[2]。刺玫果中富含多种多糖、氨基酸、黄酮、果胶等成分，其中 V_C 含量最高，在欧美国家誉有“维生素记录保持者”的称号[3]。刺玫果果实营养丰富，而它的其他部位也具有利用价值。刺玫果的花，可以提取出具有很高经济价值的精油，也可以提取出色素和香精，用于开发和生产食品等。刺玫果的叶子，可以用来泡茶，具有促消化、活血、调经等作用。刺玫果的根，具有很高的药用价值，如止咳、止痰、止血等。刺玫果的籽能被用来榨油，还能用来制作化妆品，也可以作为原料用来研发治疗皮肤病、结肠炎等疾病的药物[4]。

作为一种药食同源的天然产物，刺玫果不仅可以用作添加剂，还可以用作各种功能性食品、医疗保健药物的原材料，用于制作果酱、果冻、果脯等休闲食品。因此，刺玫果具有较好的开发和应用价值。

1.1.1　刺玫果活性成分

刺玫果作为天然植物，其中含有大量多糖、皂苷、黄酮类、果胶、类胡萝卜素、花青素、氨基酸、维生素、多酚类及多种矿物质等活性成分。赵惠茹[5]等采用酶辅助水提法从刺玫果中提取多糖物质，通过 Box-Behnken 响应面法和遗传算法联用，得到提取多糖的最佳条件：酶解时间为 71 min、加酶量为 1.37%、料液比为 1:30，在此条件下多糖提取率可达 16.38%。崔遥[6]等利用柱层析法从刺玫果籽中提取多糖和原花青素，结果表明，在优化的工艺条件下，刺玫果籽中原花青素和多糖得率均接近 95%，且通过与对照组阿卡波糖和维生素 C 比较，得出其具有较好的抑制α-葡萄糖苷酶活性的能力和抗氧化能力。周新宇[7]等利用超声辅助提取法，以刺玫果为原料，对其中富含的花色苷进行提取并优化，得到最佳条件：料液比为 1:15、乙醇体积分数为 60%、超声温度为 50℃、溶液 pH 为 2、超

声时间为 30 min、超声提取 2 次。戴鹂莹[8]等通过离子液体辅助、离子液体协同超声波辅助、离子液体协同超声波-微波辅助三种方式探究不同提取方法对刺玫果多酚提取率的影响，结果表明三种方法都可以有效的提高刺玫果多酚的提取率，且离子液体协同超声波-微波辅助方法比传统溶剂提取可提高 20%。

1.1.2　刺玫果活性功能

刺玫果在民间医药中就有着悠久的传统用途，据《全国中草药汇编》中记载[9]，刺玫果可用于治疗肠、胃、耳鼻喉等问题，并且在传统的欧洲民间医学中，也被用作通便、利尿、抗痛风和抗风湿的药物[10]。现代医学临床证明刺玫果具有抗衰老、抗疲劳、抗癌、抗辐射、可预防心血管疾病等作用。翟春梅[11]等以果蝇为模型，探讨刺玫果抗衰老活性机制，通过喂食刺玫果影响果蝇体内糖原、乳酸脱氢酶（LDH）、钠钾泵（Na^+-K^+-ATP 酶）等代谢指标和丙二醛（MDA）、超氧化物岐化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）等氧化指标，得出刺玫果醇提物可延长果蝇寿命。Tumbas[12]等通过固相萃取法从刺玫果中提取黄酮、维生素 C 以及酚酸物质，并利用电子自旋共振（ESR）技术探究刺玫果提取物对超氧阴离子和羟基自由基的抗氧化性，从而得出刺玫果可用作天然的抗氧化剂。孟永海[13]等利用实时 PCR 技术检测刺玫果对肾阳虚大鼠子宫以及睾丸组织中性激素的表达，得出刺玫果对性激素作用机制可能与增强受体敏感性和提高睾酮合成途径相关限速酶的蛋白有关。王彦硕[14]等以小鼠巨噬细胞和脂多糖（LPS）诱导的巨噬细胞炎症模型来探究刺玫果多糖的抗炎活性，结果表明刺玫果具有很好的抗炎效果，抗炎活性成分可能集中于乙酸乙酯萃取物（EA）和正丁醇萃取物（n-Bu）中。

1.2　刺玫果总黄酮研究进展

1.2.1　刺玫果黄酮成分及含量

刺玫果中黄酮化合物成分丰富，其中槲皮素、山奈酚、芦丁、金丝桃苷、木犀草素等是刺玫果黄酮化合物中含量较高的几种黄酮。邸松[15]等利用高效液相色谱法（HPLC）对刺玫果提取物中金丝桃苷、芦丁、槲皮素及木犀草素四种黄酮单体进行定量分析，得到它们的含量分别为 607.98 μg/g、450.63 μg/g、187.32 μg/g、12.68 μg/g。杨莹莹[16]等采用 HPLC 结合主成分分析和聚类分析法，对 30 批不同

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/996110105132010054