

竹叶黄酮的酶促酰化、 分离与结构鉴定

孙元奎, 马祥, 刘柳, 谔与运, 晏日安*

(暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要:研究了固定化脂肪酶 B(Novozmy 435)在低水分含量的叔戊醇溶剂中催化竹叶黄酮与硬脂酸的酰化反应。反应条件:竹叶黄酮与硬脂酸摩尔比 1:5, 脂肪酶用量 50g/L, 机械搅拌转速 200r/min, 反应温度 50℃, 反应时间 72h。后经液液萃取, 薄层层析(TLC, UV 254nm), 硅胶柱层析分离纯化, 薄层层析展开剂配比为氯仿/甲醇/冰乙酸(7:1:0.05, v/v/v), 柱层析洗脱剂配比为氯仿/甲醇/冰乙酸(10:1:0.05, v/v/v); 洗脱液合并相同组分, 得到两种黄酮苷酰化物单体。对纯化后的组分采用红外光谱(IR)、质谱(ESI-MS)、核磁共振(¹H-NMR、¹³C-NMR)进行结构鉴定和表征, 确定产物分别为异牡荆苷-6"-硬脂酸酯和异荜草苷-6"-硬脂酸酯, 说明反应表现出高度选择性。

关键词:固定化脂肪酶 B, 竹叶黄酮, 酰化, 薄层层析, 硅胶柱层析

Enzymatic acylation, isolation and identification of flavonoid glycosides from bamboo leaves

SUN Yuan-kui, MA Xiang, LIU Liu, LU Yu-yun, YAN Ri-an*

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Immobilised *Candida Antarctica* lipase B(Novozmy 435) was used to acylate flavonoid glycosides from bamboo leaves in *tert*-amyl alcohol, with stearic acid as acyl donors at low moisture content. The optimum reaction condition was as follows: a molar ratio of flavonoid glycosides from bamboo leaves to Stearic acid of 1:5, 50g/L lipase, stirring speed was 200r/min, 50℃ and reaction time was 72h. After Liquid-liquid extraction, the products of esterification reactions were subjected to thin-layer chromatography(TLC, UV 254nm), a silica gel column(700mm × 35mm, i.d.), the developing solvent ratio was chloroform/methanol/acetic acid(7:1:0.05, v/v/v), and eluted with chloroform/methanol/acetic acid(10:1:0.05, v/v/v). Then combine fractions had the same value of retardation factor R_f, two types of acylated flavonoids were obtained. The purified products were analyzed by IR, ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR and the two types of acylated flavonoids were isoorientin-6"-stearate and isovitexin-6"-stearate. The enzyme showed strong selectivity for acylation of glycosides.

Key words: immobilised lipase B; flavonoid glycosides; Acylation; TLC; Silica gel chromatography

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)09-0096-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.09.012

竹叶黄酮是我国近年来研究和开发的一种新型植物黄酮制剂, 具有中国本土资源特色和自主知识产权。竹叶黄酮主要是 4 种碳苷黄酮: 荜草苷、异荜草苷、牡荆苷、异牡荆苷^[1]。近年的研究表明, 竹叶黄酮具有较好的抗自由基、抗氧化、抗突变和保护心脑血管等多种医疗功效^[2-4]。因此, 目前对竹叶黄酮类物质的制备与功能作用的研究已成为一个热点。

天然黄酮类化合物一般以游离态或糖苷的形式存在, 脂溶性较差, 限制了其在食品中的应用^[5-6]。酰化是黄酮苷中糖基或其母核上的羟基官能团与脂

肪酸的酯化过程, 分为生物酶法和化学法两种^[7]。黄酮类化合物经过酰化修饰后, 其亲脂性明显提高, 并且可以改善它们的生物利用度。与化学酰化相比, 酶促酰化稳定性好, 选择性专一, 反应条件温和, 更符合绿色化学的要求。目前, 酰化主要使用的生物酶是固定化脂肪酶 B^[8-9], 并且脂肪酶 B 对黄酮苷糖基上的 6"-羟基表现出高度的选择性^[10-11]。本文以硬脂酸为酰基供体对竹叶黄酮进行酰化修饰, 应用薄层层析、硅胶柱层析分离纯化后得到两种酰化产物, 采用高效液相色谱分析两酰化产物得到较好分

收稿日期: 2014-07-23

作者简介: 孙元奎(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品添加剂的制备与应用

* 通讯作者: 晏日安(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品添加剂的制备与应用。

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013010012931)。

离,采用 IR、ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等方法对其进行了结构鉴定,确定两种酰化产物为异荜荵苷-6"-硬脂酸酯和异荜荵苷-6"-硬脂酸酯,是两种新合成化合物。同时测定并比较了两种酰化产物的正辛醇/水体系分配系数,结果表明两种产物亲脂性明显提高。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜竹叶抗氧化物(竹叶黄酮总含量约为40%) 深圳金色盆地生物科技有限公司;异荜荵苷、荜荵苷、异荜荵苷、荜荵苷对照品 法国 Extrasynthese 公司;435 脂肪酶(固定化南极假丝酵母脂肪酶) 诺维信(中国)投资有限公司;硬脂酸 上海晶纯实业有限公司;4A 分子筛 天津福晨化学试剂厂;柱层析硅胶(200~300目)、薄层层析板 青岛海洋化工厂;乙酸乙酯、乙腈、正己烷 天津市富宇精细化工有限公司;氘代二甲基亚砜(DMSO) 美国剑桥同位素公司。

RE-52AAB 型旋转蒸发器 上海嘉鹏科技有限公司;SHZ-DIII 型循环水式真空泵 巩义宁于华仪器有限责任公司;DZF-6030A 型真空干燥箱 上海一恒科学技术有限公司;Essentia LGE-UV 高效液相色谱仪 日本岛津公司;EQUINOX-55 型红外光谱仪 布鲁克光谱仪器公司;4000Q Trap 质谱仪 AB SCIEX 公司;AVANCEIII 型核磁共振波谱仪(500MHz) 瑞士布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 竹叶黄酮 HPLC 分析 精密称取干燥至恒重的异荜荵苷、荜荵苷、异荜荵苷、荜荵苷样品适量,用甲醇溶解并定容至 50mL;将鲜竹叶抗氧化物样品置于 50℃ 烘箱中干燥至恒重,精密称取样品 1.0g 用甲醇定容至 50mL。色谱分析时,稀释 10 倍,经 0.45 μm 滤膜滤过,取 2 μL 进样。色谱条件:Synthesis C_{18} 色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μm);流动相:乙腈/0.5% 冰醋酸(14:86, v/v);流速 1mL/min,检测波长 340nm,柱温:40℃^[12]。

1.2.2 竹叶黄酮的酰化 将竹叶黄酮置于 50℃ 真空干燥箱 50min,放于干燥器中备用;将已活化的 4A 分子筛(300~400℃,3h)放入叔戊醇中,分子筛/叔戊醇 = 1:10 (g/mL),静置 24h,反应前抽滤使用。取 500mL 叔戊醇于 1000mL 三口烧瓶中,后加入 5.02g 竹叶黄酮,6.40g 硬脂酸(竹叶黄酮/硬脂酸 \approx 1:5 (mol/mol),50℃ 下常压回流,200r/min 机械搅拌。原料充分溶解后,加入 435 脂肪酶 25.00g,开始反应。反应 24h 后加入 4A 分子筛 25.06g,之后每 24h 加入 10.00g 分子筛,继续反应 48h^[13-14]。反应结束后抽滤滤液,旋转蒸发,得 8.24g 混合物。

1.2.3 酰化产物的纯化与分离 反应产物用乙腈/正己烷(2:5, v/v)溶解,于 50℃ 下萃取 20min,分液,取乙腈层旋转蒸干;后将蒸干物用乙酸乙酯/水(2:5, v/v)溶解,于 60℃ 下萃取 20min,分液,取乙酸乙酯层旋转蒸干,得 2.18g 粗产物^[15]。TLC 确定较优的展开剂比例:氯仿/甲醇/冰乙酸(7:1:0.05, v/v/v),将

确定的展开剂比例适当调低极性用于硅胶柱层析(200~300目,35mm \times 700mm 玻璃柱)分离,洗脱剂:氯仿/甲醇/冰乙酸(10:1:0.05, v/v/v),恒定流速洗脱,每 20mL 收集一份洗脱液。洗脱液经归类,旋蒸除去溶剂,得两单体产物。

1.2.4 酰化产物的结构鉴定

1.2.4.1 高效液相色谱分析 酰化反应后的混合物和经硅胶柱层析分离得到的两酰化产物分别进行高效液相色谱分析,流动相为乙腈(A)和水(B)。色谱条件: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 色谱柱(4.6ID \times 250mm);采用梯度洗脱的方法,流动相配比为 0min: A:B = 60:40 (v/v),20min: A:B = 100:0 (v/v),35min: A:B = 100:0 (v/v);流速:1mL/min;柱温:40℃;检测器:紫外检测器;检测波长:340nm^[16]。

1.2.4.2 红外光谱分析 柱层析获得的两分离单体直接涂抹在红外测定仪的透光镜上测量,扫描范围 4000~500 cm^{-1} 。

1.2.4.3 分离产物的 ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 测定条件 柱层析两分离单体采用色谱级甲醇溶解,溶液浓度为 10mg/mL。质谱条件:电喷雾 ESI 离子源,电子能量 70eV,传输线温度 275℃,离子源温度 200℃,采用负离子模式,激活电压 1.5V,质量扫描范围 0~1000m/z。以四甲基硅为内标、氘代二甲基亚砜(DMSO-d)为溶剂, $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 在 30℃ 采用 500MHz 频率分别对分离纯化的两单体进行扫描。

1.2.5 酰化产物的亲脂性 100 μmol 的物质溶解于 10mL 的正辛醇(水饱和)中,加入 10mL 的水(正辛醇饱和),2000r/min 下离心 10min,静置分液,分别旋转蒸干,测定正辛醇层和水层中物质含量,计算分配系数,平行测定 3 次,取平均值^[17]。结果以 logP 表示,方程式如下:

$$P = C_0 / C_w$$

C_0 :平衡时物质在正辛醇相中的浓度。 C_w :平衡时物质在水相中的浓度。

1.2.6 数据处理 数据采用 Origin8.0 和 MestReNova 软件处理解析,结构式采用 Chemdraw10.0 版本绘制。

2 结果与讨论

2.1 竹叶黄酮的 HPLC 分析

鲜竹叶抗氧化物(竹叶黄酮总含量约为40%)用甲醇溶解定容,经 0.45 μm 滤膜滤过除杂,进行高效液相色谱分析。由图 1 标准品定位可知,1 为异荜荵苷,2 为荜荵苷,3 为荜荵苷,4 为异荜荵苷。由图 2 可知,经 HPLC 分析,竹叶黄酮中的四种黄酮苷得到了较好分离。按外标法以峰面积计算,四种竹叶黄酮的含量分别为:异荜荵苷 58.51%,荜荵苷 16.79%,荜荵苷 4.34%,异荜荵苷 18.36%;即四种黄酮苷的含量异荜荵苷 > 异荜荵苷 > 荜荵苷 > 荜荵苷。

2.2 高效液相色谱分析

酰化产物混合物经液液萃取,去除未反应的黄酮苷和脂肪酸等杂质;后经硅胶柱层析分离纯化,TLC 检测归类,得两种酰化产物。由图 3、图 4 可知,

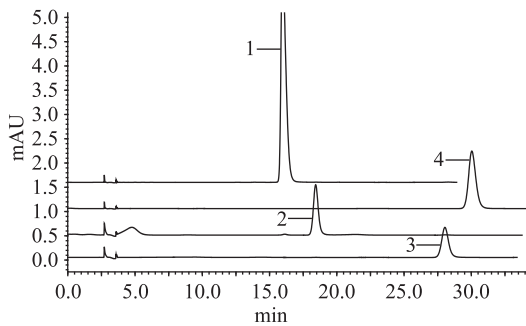


图1 四种黄酮苷标品的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of four Flavonoid Glycosides

注:1:异荭草苷;2:荭草苷;3:牡荭苷;4:异牡荭苷,图2同。

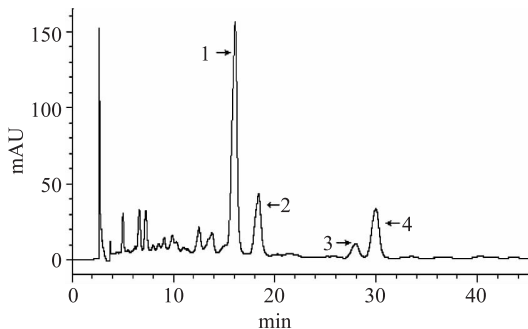


图2 竹叶黄酮的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of Flavonoid Glycosides from Bamboo Leaf

反应产物经过水和正己烷的多次萃取除杂之后,保留时间在 16~25min 间有明显的吸收峰,其中 23.19min 峰为异牡荭苷-6''-硬脂酸酯,21.35min 峰为异荭草苷-6''-硬脂酸酯,其余峰经质谱鉴定均非目标产物。由于荭草苷和异荭草苷以及牡荭苷和异牡荭苷为两对同分异构体,黄酮苷糖基上均有 6''-羟基,理论上讲,产物不应只有两种已酰化的黄酮苷。但目前通过硅胶柱层析分离和高效液相色谱分析,只分离纯化得到以上两种酰化产物。

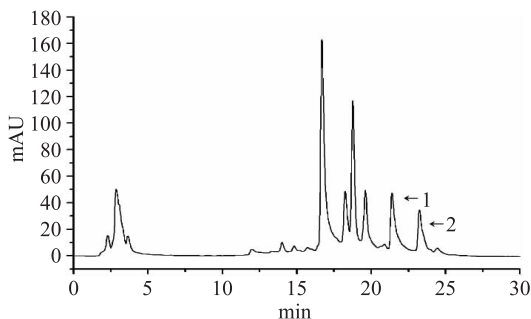


图3 酰化产物的高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of reaction product

注:1:异荭草苷-6''-硬脂酸酯;
2:异牡荭苷-6''-硬脂酸酯,图4同。

2.3 异牡荭苷-6''-硬脂酸酯和异荭草苷-6''-硬脂酸酯的红外图谱分析

纯化酰化产物的红外图谱如图 5 所示:分析可知,吸收峰 3391.32cm^{-1} 和 3401.94cm^{-1} 分别为酚羟

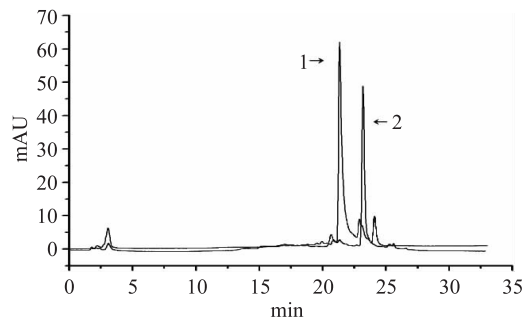


图4 异牡荭苷-6''-硬脂酸酯和

异荭草苷-6''-硬脂酸酯的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of isoorientin-6''-stearate and isovitexin-6''-stearate

基、糖基上的羟基峰;羰基的伸缩振动区域在 $1900\sim 1500\text{cm}^{-1}$,吸收峰 1653.53cm^{-1} 和 1651.14cm^{-1} 为黄酮羰基峰; $1600\sim 1450\text{cm}^{-1}$ 区域是芳环的骨架振动区,吸收峰 $1450, 1500, 1600\text{cm}^{-1}$ 附近为苯环骨架振动峰,以上均与黄酮类化合物吸收峰一致^[18];而 $2924, 2854\text{cm}^{-1}$ 左右峰为烷烃饱和 C-H 伸缩振动的特征吸收峰, $1726.33, 1717.96\text{cm}^{-1}$ 为酯基的特征吸收峰, $1249.02, 1270.95\text{cm}^{-1}$ 处为酯基中 C-O 伸缩振动吸收峰^[19],综合红外图谱分析,符合竹叶黄酮酯化产物的结构特征。

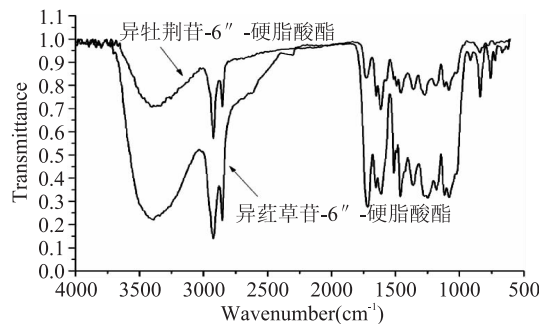


图5 异牡荭苷-6''-硬脂酸酯和

异荭草苷-6''-硬脂酸酯的红外图谱

Fig.5 FT-IR spectra of isoorientin-6''-stearate and isovitexin-6''-stearate

2.4 异牡荭苷-6''-硬脂酸酯和异荭草苷-6''-硬脂酸酯的 ESI-MS 分析

酰化产物用甲醇溶解,ESI-MS 二级图谱如图 6 所示,已知异牡荭苷硬脂酸酯和异荭草苷硬脂酸酯的分子量 $M = 698, 714$; $M_1 = 697.7, 713.6$ 分别为去氢 $[M-H]^-$ 峰, $M_2 = 679.8, 695.7$ 分别为去水 $[M_1-18]^-$ ($[M_1-H_2O]^-$) 峰, $M_3 = 413.3, 429.4$ 分别为去硬脂酸 $[M_1-284]^-$ ($[M_1-C_{18}H_{36}O_2]^-$) 峰;酰化产物黄酮苷部分异牡荭苷和异荭草苷分子量 $M_4 = 432, 448$, $M_5 = 341.3, 357.5$ 分别为 $[M_4-H-90]^-$ ($[M_4-H-C_3H_6O_3]^-$) 峰, $M_6 = 311.3, 327.3$ 分别为 $[M_4-H-120]^-$ ($[M_4-H-C_4H_8O_4]^-$) 峰, $M_7 = 269.0, 285.4$ 为苷元芹菜素和木犀草素离子 $[M_4-163]^-$ ($[M_4-C_6H_{11}O_5]^-$) 峰,以上碎片峰与文献黄酮碳苷的裂解特征一致^[20]。

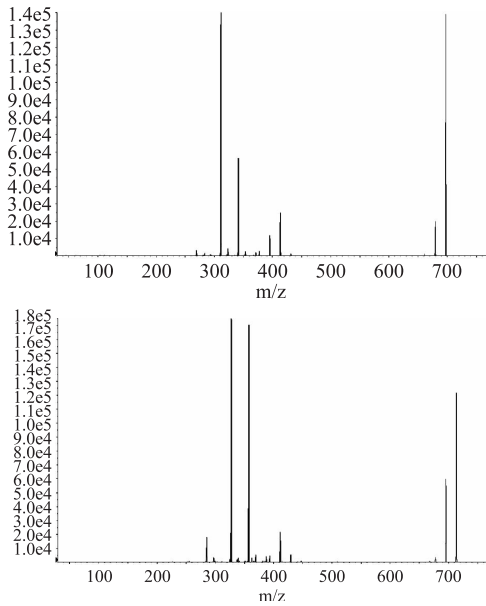


图6 异牡荆苷-6''-硬脂酸酯(A)和异荭草苷-6''-硬脂酸酯(B)的ESI-MS二级图谱

Fig.6 Second class ESI-MS chromatogram of isoorientin-6''-stearate (A) and isovitexin-6''-stearate (B)

2.5 异牡荆苷-6''-硬脂酸酯和异荭草苷-6''-硬脂酸酯的¹H-NMR和¹³C-NMR分析

为进一步表征并区分两分离单体的结构,将纯化后的单酯溶于氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆),核磁共振仪扫描。由图7、图8及表1、表2的¹H-NMR、¹³C-NMR分析可知,酯基上的-αCH₂-C=O为δ¹H=2.25,酯基上的-βCH₂-为δ¹H=1.45、1.48,酯基上的-(CH₂)₈-在δ¹H=1.16、1.22,酯基上的CH₃-为δ¹H=0.83,δ¹³C=173.36、173.39为C=O,说明酰化反应成功。此外,与异荭草苷和异牡荆苷¹H-NMR、¹³C-

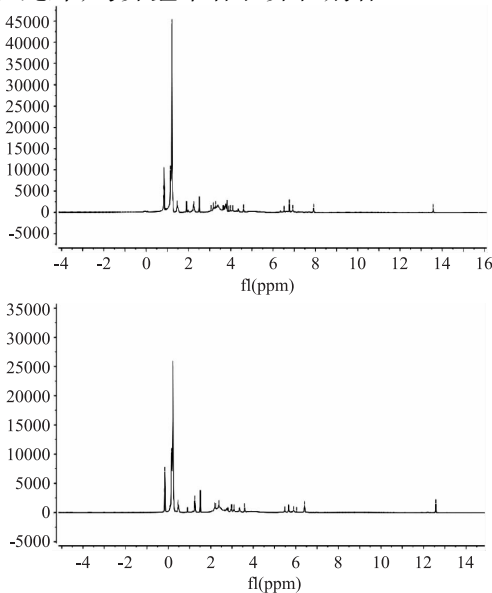


图7 异牡荆苷-6''-硬脂酸酯和

异荭草苷-6''-硬脂酸酯的¹H-NMR图谱

Fig.7 ¹H-NMR spectra of isoorientin-6''-stearate and isovitexin-6''-stearate

NMR对比分析^[21],确定酰化物为异牡荆苷硬脂酸酯和异荭草苷硬脂酸酯;同时,6''位的碳的化学位移向低场偏移(δ¹³C=61.57、61.61→64.68、64.69),按文献,同样说明酰化位置在6''-羟基上^[13]。最终确定分离得到的酰化物为异牡荆苷-6''-硬脂酸酯和异荭草苷-6''-硬脂酸酯,结构式如下:

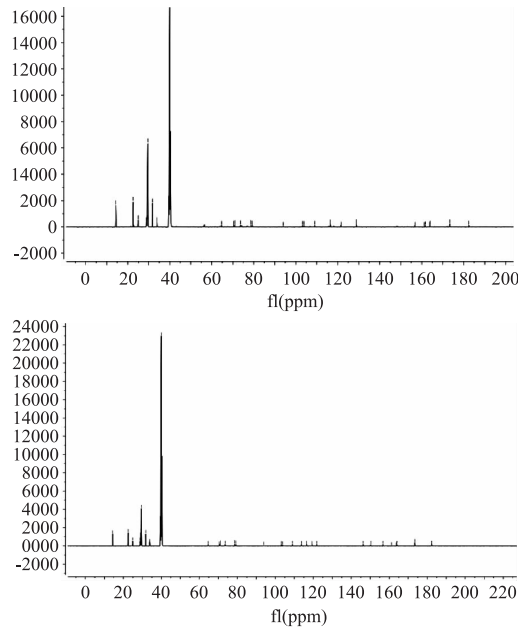


图8 异牡荆苷-6''-硬脂酸酯和

异荭草苷-6''-硬脂酸酯的¹³C-NMR图谱

Fig.8 ¹³C-NMR spectra of isoorientin-6''-stearate and isovitexin-6''-stearate

表1 异牡荆苷-6''-硬脂酸酯和

异荭草苷-6''-硬脂酸酯的¹H-NMR分析

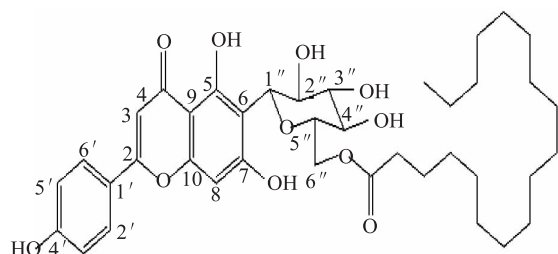
Table 1 ¹H-NMR data of isoorientin-6''-stearate and isovitexin-6''-stearate

H	δ ¹ H	
	异牡荆苷-6''-硬脂酸酯	异荭草苷-6''-硬脂酸酯
3	6.77	6.66
8	6.52	6.48
2'	7.92	7.40
3'	6.93	-
5'	6.93	6.89
6'	7.92	7.38
1''	4.60	4.59
2''	4.10	4.04
3''	3.28	3.23
4''	3.07	3.16
5''	3.18	3.35
6''	3.98, 3.90	3.98, 3.97
5-OH	13.56	13.58
-αCH ₂ -C=O	2.25	2.25
-βCH ₂ -	1.48	1.45
-(CH ₂) ₁₄ -	1.22	1.16
CH ₃ -	0.83	0.83

表2 异牡荆苷-6"-硬脂酸酯

和异荭草苷-6"-硬脂酸酯的¹³C-NMR分析Table 2 ¹³C-NMR data of isoorientin-6"-stearate and isovitexin-6"-stearate

C	$\delta^{13}\text{C}$	
	异牡荆苷-6"-硬脂酸酯	异荭草苷-6"-硬脂酸酯
2	163.97	164.10
3	103.18	103.17
4	182.39	182.29
5	161.70	163.87
6	109.04	109.04
7	163.83	161.26
8	94.06	93.92
9	156.78	156.70
10	103.86	103.82
1'	121.56	121.81
2	128.83	113.69
3	116.43	146.26
4	161.24	150.26
5'	116.43	116.48
6'	128.83	119.36
1"	73.57	73.56
2"	70.46	70.97
3"	78.58	78.58
4"	70.98	70.42
5"	79.19	79.19
6"	64.69	64.68
C=O	173.36	173.39
CH ₃ (CH ₂) ₁₆	14.37-33.95	14.40-33.94



异牡荆苷-6"-硬脂酸酯

图9 异牡荆苷-6"-硬脂酸酯和
异荭草苷-6"-硬脂酸酯的结构式Fig.9 Structures of isoorientin-6"-stearate
and isovitexin-6"-stearate

2.6 异牡荆苷-6"-硬脂酸酯和异荭草苷-6"-硬脂酸酯的亲脂性分析

异牡荆苷和异荭草苷在正辛醇/水体系 IgP 通过 Chemdraw 7.0 软件分析分别为 -0.72、-1.11, 而经实验测定异牡荆苷-6"-硬脂酸酯和异荭草苷-6"-硬脂酸酯 logP 分别为 9.36、8.74, 表明经过酰化后物质的亲脂性得到了较大提高。

3 结论

本文以固定化脂肪酶 B 催化竹叶黄酮与硬脂酸

反应,合成并纯化得到了两个竹叶黄酮的新单酯产物。采用薄层层析和硅胶柱层析对酰化产物进行分离纯化,经 IR、ESI-MS、NMR 鉴定,确定两组分别为异牡荆苷-6"-硬脂酸酯异荭草苷-6"-硬脂酸酯,测定并比较了两种酰化产物的正辛醇/水体系分配系数,结果表明两种产物亲脂性明显提高,达到预期目标。

参考文献

- [1] Zhang Y, Jiao J J, Zhang Y, et al. Isolation and Purification of Four Flavone C-glycosides from Antioxidant of Bamboo Leaves by Macroporous Resin Column Chromatography and Preparative High-performance Liquid Chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 107:1326-1336.
- [2] Zhang Y, Luo Z, Shao Z P, et al. Effects of Antioxidants of Bamboo Leaves and Flavonoids on 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) Formation in Chemical Model Systems[J]. Food Chemistry, 2014, 62(20):4798-4802.
- [3] Zhang S, Chen J, Sun A D, et al. Protective Effects and Antioxidant Mechanism of Bamboo Leaf Flavonoids on Hepatocytes Injured by CCl₄ [J]. Food and Agricultural Immunology, 2014, 25(3):386-396.
- [4] Lu B Y, Wu X Q, Shi J Y, et al. Toxicology and Safety of Antioxidant of Bamboo Leaves. Part 2: Developmental Toxicity Test in Rats with Antioxidant of Bamboo Leaves [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(10):1739-1743.
- [5] Salem J H, Humeau C, Chevalot I, et al. Effect of Acyl Donor Chain Length on Isoquercitrin Acylation and Biological Activities of Corresponding Esters [J]. Process Biochemistry, 2010, 45:382-389.
- [6] 张红城, 吴正双, 高文宏, 等. 黄酮类化合物改性方法的研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(3):256-261.
- [7] Enaud E, Humeau C, Piffaut B, et al. Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 27:1-6.
- [8] Zhang X, Li L, Huang J R, et al. Enzymatic Synthesis of Naringin Palmitate[J]. Adv Mater Res, 2012:1350-1356.
- [9] Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, et al. Enzymatic Acylation of Flavonoids[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(11):2237-2251.
- [10] Kyriakou E, Primikyri A, Charisiadis P, et al. Unexpected Enzyme-catalyzed Regioselective Acylation of Flavonoid Aglycones and Rapid Product Screening[J]. Org. Biomol. Chem., 2012, 10:1739-1742.
- [11] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Engasser J M, et al. Acylation of Natural Flavonoids Using Lipase of Candida Antarctica as Biocatalyst[J]. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, 29:63-67.
- [12] 龚金炎, 吴晓琴, 张英, 等. RP-HPLC 法测定竹叶提取物中黄酮类和酚酸类成分[J]. 中草药, 2010, 41(1):63-65.
- [13] Ma X, Yan R A, Yu S Q, et al. Enzymatic Acylation of Isoorientin and Isovitexin from Bamboo-Leaf Extracts with Fatty Acids and Antiradical Activity of the Acylated Derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(43):

(下转第 106 页)

fusiforme [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50 (3-4): 695-700.

[4] Ye Hong, Wang Keqi, Zhou Chunhong, et al. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum* [J]. Food Chemistry, 2008, 111: 428-432.

[5] 张华峰, 高征, 罗亚飞, 等. 海蒿子活性多糖降血脂作用的研究 [J]. 中成药, 2009, 31 (12): 1925-1927.

[6] 张维杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.

[7] Osselaer N V, Rampart M, Herman A G. Differential inhibition of polymorphonuclear leukocyte recruitment *in vivo* by dextran sulphate and fucoidan [J]. Mediators of Inflammation, 1996, 5 (5): 346-357.

[8] Karagözler A A, Erdağ B, Emek Y C, et al. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata* [J]. Food Chemistry, 2008, 111 (2): 400-407.

[9] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay [J]. Free Radi in Bio and Medi, 1999, 26 (9): 1231-1237.

[10] Hua Yanglin, Yang Bao, Tang Jian, et al. Structural analysis of water-soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their *in vivo* antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87 (1): 343-347.

[11] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44:

(上接第 100 页)

10844-10849.

[14] Duan Y, Du Z, Yao Y, et al. Effect of Molecular Sieves on Lipase-catalyzed Esterification of Rutin with Stearic Acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (17): 6219-6225.

[15] Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110: 265-271.

[16] Foteini M, Heleni L, Haralambos S, et al. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2029-2034.

[17] Kajiya K, Kumazawa S, Nakayama, T. Steric Effects on Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65 (12): 2638-2643.

307-315.

[12] 卢芷虹, 林宗毅, 崔春, 等. 柠檬酸提取海带渣中多糖及其抗氧化活性与结构的研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (23): 93-96.

[13] Xue Changhu, Fang Yu, Lin Hong, et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13: 67-70.

[14] Wu L C, Hsu H W, Chen Y C, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya [J]. Food Chemistry, 2006, 95 (2): 319-327.

[15] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数 (ORAC) 测定原理及应用 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22 (8): 1015-1021.

[16] Vishchuk Olesya S, Ermakova Svetlana P, Zvyagintseva Tatyana N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346 (17): 2769-2776.

[17] Suresh V, Senthilkumar N, Thangam R, et al. Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its *in vitro* anticancer and antioxidant activity [J]. Process Biochemistry, 2013, 48 (2): 364-373.

[18] Takashi Kuda, Tomoko Hishi, Sayuri Maekawa. Antioxidant properties of dried product of 'haba-nori', an edible brown alga, *Petalonia binghamiae* (J. Agardh) Vinogradova [J]. Food Chemistry, 2006, 98 (3): 545-550.

[18] 杨念云, 段金彪, 李萍, 等. 金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (21): 1621-1624.

[19] Latifa C, Julie A, Catherine H, et al. Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 9496-9502.

[20] Li X Q, Xiong Z L, Ying X X, et al. A Rapid Ultra-performance Liquid Chromatography-electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Method for the Qualitative and Quantitative Analysis of the Constituents of the Flower of *Trollius ledibouri* Reichb [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 580 (2): 170-180.

[21] Nicole K, Marcus A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56 (9): 3368-3376.