

# 硬脂酸和月桂酸在 Novozym 435 催化下对芦丁酯化及分子筛对酯化率的影响

段煜<sup>1,2</sup>, 杜宗良<sup>1\*</sup>, 唐卫文<sup>3</sup>, 吴大诚<sup>1</sup>

(1. 四川大学纺织研究所, 成都 610065; 2. 潍坊医学院, 潍坊 261042; 3. 成都地奥制药有限公司, 成都 610000)

**摘要:** 为了增加芦丁的脂溶性从而使其具有更优秀的抗氧化活性, 以硬脂酸和月桂酸为酰基供体, 在脂肪酶 Novozym 435 催化下对芦丁选择性酯化。经色谱柱提纯, 得到两种带不同长度烃基的芦丁脂肪酸酯。用红外光谱和核磁共振波谱对芦丁硬脂酸进行了结构鉴定, 表明该类酯化物的酯化反应位为鼠李糖的 C4'' 位羟基。以高效液相色谱监测酯化反应进程, 分子筛添加时间对酯化率的研究结果显示, 分子筛对酯化率和反应速率有提高的作用。分子筛添加时间对酯化率有影响。对于硬脂酸为酰基供体的情况, 反应 24 h 后添加分子筛的酯化反应可以得到最大的酯化转化率 46%。以月桂酸为酰基供体的酯化反应, 反应 11 h 后添加分子筛可以得到最大的酯化转化率 64.5%。

**关键词:** 酯化; 芦丁硬脂酸酯; 芦丁月桂酸酯; Novozym 435; 分子筛

中图分类号: Q629.9

文献标识码: A

## Effect of Molecular Sieves on Lipase-Catalyzed Esterification of Rutin with Stearic Acid and Lauric acid

DUAN Yu<sup>1,2</sup>, DU Zong-liang<sup>1\*</sup>, TANG Wei-wen<sup>3</sup>, WU Da-cheng<sup>1</sup>

(1. Textile College, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Weifang Medical University, Weifang 261042, China;

3. DIAO GROUP, Chengdu 610000, China)

**Abstract:** Rutin was acylated with stearic acid and lauric acid in esterification reaction catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in tert-amyl alcohol with and without molecular sieves. The structure of rutin stearate was characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR and UV-Vis spectra data. The lipase-catalyzed esterification of rutin took place at the C-4 of the rhamnose moiety. The addition of molecular sieves increased obviously the reaction rate and the yield. This study focused on the time effect of molecular sieves on the formation of rutin stearate and rutin laurate. For the esterification in case of stearic acid as acyl donor, the final conversion of rutin was the highest at 46% when molecular sieves was added at 24 h after the beginning of reaction. The highest conversion could reach up 64.5% because the esterification of rutin with lauric acid was acyl donor when molecular sieve was added at 11 h after the reaction beginning.

**Key words:** esterification; rutin stearate; rutin laurate; novozym 435; molecular sieve

黄酮类化合物广泛存在于绿色植物中, 具有抗衰老、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、免疫调节等多种生物活性<sup>[1-3]</sup>, 在保健食品、化妆品和药剂配置等领域有很大的应用前景。然而黄酮类化合物在自然界多以糖苷的形式存在, 糖苷极性大, 有一定的亲水性, 与脂肪和油类的相容性很差, 难以在脂肪类溶剂中稳定存在, 这就限制了黄酮类化合物在这些领域的应用。据研究黄酮类化合物的各种生物活性都是以抗氧化

活性为基础的<sup>[4]</sup>, 与抗自由基或抗脂质过氧化有关。黄酮类化合物抑制低密度脂蛋白 LDL 氧化<sup>[5-7]</sup>和抑制类胡萝卜素及不饱和脂肪酸氧化<sup>[8,9]</sup>的研究表明, 具有相同苷元的黄酮类化合物比其糖苷具有更优秀的抗氧化活性, 这是由于苷元亲脂性强能嵌入生物膜疏水层的内核发挥作用, 以及糖基的空间位阻减弱了黄酮化合物和生物分子的结合能力<sup>[10]</sup>。而黄酮类化合物在自然界多以糖苷的形式存在, 多羟基及糖基结构使其抗氧化活性下降。Saija 等<sup>[11]</sup>的研究认为, 黄酮类化合物分子的亲疏平衡性与其抗氧化活性和穿透膜的能力密切相关。虽然水解糖苷可以得到苷元, 但水解这个中间步骤对原料有较

收稿日期: 2006-3-17 接受日期: 2006-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50473050)

\*通讯作者 Tel: 86-28-85405437; E-mail: miaoyintian@163.com

大损耗,而且苷元溶解性差,不具备亲疏平衡性,在体液环境中不具备向细胞膜表面迁移的能力。向黄酮糖苷的分子中引入长碳链可以增加它的脂溶性及亲疏平衡性。

黄酮糖苷通过酯化修饰,在分子中引入长烃链可以增加它的脂溶性及亲疏平衡性,从而增加和脂肪的相容性及提高抗氧化性。然而通常的化学修饰反应选择性差,黄酮类化合物的多个羟基都有可能参与酯化,往往结合或屏蔽了主要活性基团,虽然增加了其脂溶性,但降低了本身的抗氧化效果<sup>[12,13]</sup>。因此,化学修饰酯化反应通常要经“基团保护-酯化-脱保护基团”三步。酶催化反应具有较强的专一性与选择性,可以选择酯化黄酮类化合物的某位羟基。近来曾有文献报道水含量、酰基供体结构、黄酮类化合物骨架、酶种和溶剂对酯化反应的影响。Daniele和Riva<sup>[14]</sup>等研究发现枯草杆菌蛋白酶能选择性酯化异槲皮苷和木犀草素-7-葡萄糖苷的葡萄糖基的伯羟基和C3位仲羟基;而槲皮苷的鼠李糖基的任何一位羟基都没有被酯化;然而来源于*C. Antarctica*的脂肪酶既能酯化葡萄糖基也能酯化鼠李糖基<sup>[15]</sup>。Nakajima<sup>[16]</sup>等用番薯创口处培育的细胞作为生物催化剂得到了若干天然存在的黄酮苷的酯化物。这些说明糖基的结构和酶种都会影响酯化的选择性。对于来源于*C. Antarctica*的脂肪酶催化的酯化反应,丙酮、乙腈<sup>[17]</sup>和叔戊醇<sup>[18]</sup>都是良好的反应溶剂。用干燥的反应试剂(黄酮类化合物、酰基供体、溶剂),并且加分子筛除去酯化反应生成的水,便能得到高转化率的酯化反应<sup>[19,20]</sup>。Kontogianni等<sup>[18]</sup>认为癸酸在脂肪酶催化下对柚皮苷的酯化反应符合Michaelis-Menten反应动力学。在芦丁和柚皮苷的酯化反应中,酰基供体的浓度在反应的初始阶段下降很快,随后下降逐渐减慢,最后达到一平台,此时反应处于热力学平衡阶段<sup>[20]</sup>。

到目前为止,黄酮苷在酶催化下的酯化已有比较详细的研究,但反应中分子筛添加时间的不同对酯化反应的影响还未见有文献报道。目前引入黄酮苷分子中的最长烃基链也只有16个碳长度,烃链进一步增长可能赋予酯化产物新的性质,比如两亲性。正是基于这些原因,我们以硬脂酸和月桂酸为酰基供体,以脂肪酶Novozym 435为催化剂对芦丁进行选择酯化,合成并提纯出了两种含不同烃基链长度的芦丁脂肪酸酯,并研究了酯化反应中分子筛添加时间不同对酯化转化率的影响,选择出了最佳的分子筛投料时间。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

硬脂酸,月桂酸,乙醇,甲醇,甲酸,乙酸乙酯,均为AR级(成都科龙化工试剂厂);芦丁,生化试剂,含量95%(北京化学试剂公司);脂肪酶Novozym 435,酯酶活力10470 PLU/g(诺维信(中国)生物技术有限公司);叔戊醇,CP级(北京化工厂);分子筛4 Å(中美上海环球分子筛有限公司);层析硅胶,300~400目(青岛海洋化工厂);葡聚糖HL-20(Merk公司);硅胶60薄层板(Merk公司);蒸馏水。

Nicolet 170SX型傅立叶红外光谱仪;Varian INOVA 400核磁共振仪;Bruker AVANCE 300核磁共振仪;ZF-I型紫外分析仪;SHIMADZU高效液相色谱,SHIMADZU C18反相色谱柱,4.6×150 mm,填料粒径5 μm。

### 1.2 试剂前处理

水含量对酶在有机介质中的催化酯化反应有很大影响,通常过高的水含量会导致低酯化转化率,因此对试剂中水分的前处理很必要。硬脂酸、月桂酸和芦丁在真空干燥器中干燥1周。叔戊醇用分子筛4 Å处理5 d,分子筛4 Å事先在150 °C下活化24 h,用量大约1 L液体中加100 g。

### 1.3 芦丁脂肪酸酯的合成

芦丁和脂肪酸以1:5(摩尔比)的比例溶于叔戊醇中。于60 °C加入一定量(4 mg/mL)的脂肪酶Novozym 435,机械搅拌器搅拌。反应一定时间后,按1 L液体中加100 g的用量加入分子筛4 Å(事先在150 °C下活化24 h)去除酯化反应生成的水<sup>[21]</sup>;反应96 h结束,滤去酶和分子筛,中止反应。真空蒸除溶剂,得一黄色物质。经薄层比较分析,表明该黄色物质为芦丁和其脂肪酸酯的混合物。

### 1.4 芦丁脂肪酸酯的纯化

52 g层析硅胶用匀浆法装填色谱柱(2.5×22 cm),干法上样,上样量1.5 g,洗脱剂为乙酸乙酯:乙醇:水=15:1:1(体积比)。洗脱液以薄层展开,展开剂为乙酸乙酯:乙醇:水:甲酸=15:1:2:1(体积比),于254 nm波长下分析,合并 $R_f$  0.25的样品。选定的合并样经葡聚糖HL-20色谱柱进一步纯化,甲醇洗脱,得到黄色无定形粉末,经薄层分析为单一组分。

### 1.5 高效液相色谱测定酯化转化率

高效液相色谱的洗脱条件:梯度洗脱,初始梯度

为 10% 甲醇、90% 水, 15 min 内变为 60% 甲醇、40% 水, 接着 10 min 内变为 100% 甲醇, 之后甲醇继续洗脱 20 min; 流速 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 紫外检测,  $\lambda = 280$  nm。

酯化反应开始后, 分别在一定的反应时间取 2 mL 反应液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。高效液相色谱测出芦丁的峰面积。同一洗脱条件下, 峰面积和含量成正比。根据芦丁的初始浓度可以计算出芦丁酯化转化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 芦丁硬脂酸酯的结构表征

以芦丁硬脂酸酯为代表物进行结构表征。

硬脂酸比芦丁硬脂酸酯及芦丁的极性小, 硅胶柱分离时是最早流出的组分, 挥干溶剂后呈蜡状。芦丁脂肪酸酯在硬脂酸后流出。我们采用截断法以保证芦丁硬脂酸酯中不含有硬脂酸, 得到粉末状的芦丁硬脂酸酯。因此, 红外光谱中的特征峰和硬脂酸无关。比较芦丁(2)和芦丁硬脂酸酯(1)的红外光谱图(如图 1 所示), 2950~2850  $\text{cm}^{-1}$  处甲基、亚甲基的 C-H 振动峰明显增强, 1732  $\text{cm}^{-1}$  处出现羰基的特征峰, 说明生成了芦丁硬脂酸酯。

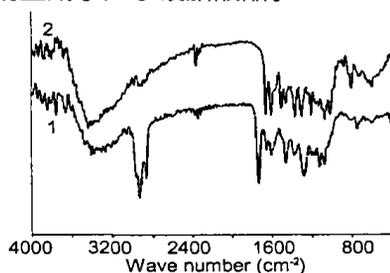


图 1 芦丁的硬脂酸酯化物(1)和芦丁(2)的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of rutin stearate (1) and rutin (2)

芦丁硬脂酸酯的<sup>1</sup>H NMR 波谱主要数据: 7.53 (2H, m, H2 和 H6), 6.78 (1H, d,  $J = 9$  Hz, H5), 6.28 (1H, s, H8), 6.11 (1H, s, H6), 5.32 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, H1), 4.66 (1H, t,  $J = 9$  Hz, H4''), 4.48 (1H, s, H1'''), 3.73~2.65 (9H, m, H2~H6, H2'''~H5'''), 2.21~2.13 (2H, m, H), 1.5 (2H, m, H), 1.25~1.13 (26H, m, H, 脂肪链中的亚甲基质子), 0.95 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H, 脂肪链中的甲基质子), 0.85 (1H, d,  $J = 6.7$  Hz, H6''')。

芦丁的<sup>1</sup>H NMR 波谱主要数据: 7.52 (2H, m, H2 和 H6), 6.80 (1H, d,  $J = 9$  Hz, H5), 6.36 (1H, s,

H8), 6.18 (1H, s, H6), 5.32 (1H, d,  $J = 7$  Hz, H1), 4.42 (1H, s, H1'''), 3.74~3.04 (9H, m, H2~H6, H2'''~H5'''), 1.01 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H6''')。

同芦丁的<sup>1</sup>H NMR 波谱比较, 芦丁硬脂酸酯化物的母核及糖基质子的位移没有变化; 2.21~0.95 ppm 出现了一系列脂肪链质子峰, 证明生成了芦丁硬脂酸酯; 4.66 ppm 处出现一新的三峰, 说明与该质子连接的羟基发生酯化反应; 附近没有新峰出现, 说明得到的芦丁硬脂酸酯为单酯化物。

脂肪酶 Novozym 435 对黄酮苷的葡萄糖基的 C3 和 C6 位羟基及鼠李糖基的 C4'' 位羟基都有很好的酯化选择性<sup>[14,15]</sup>。从<sup>1</sup>H NMR 波谱分析芦丁硬脂酸酯为单酯化物, 但需进一步明确酯化位究竟是葡萄糖基的 C3 羟基还是鼠李糖基的 C4'' 位羟基, 为此我们测定了芦丁硬脂酸酯的<sup>13</sup>C NMR 谱。

芦丁硬脂酸酯的<sup>13</sup>C NMR 波谱数据: 177.5 (C4), 174 (C=O, 酯羰基), 168.3 (C7), 157.7 (C9 or C2), 150.2 (C4), 133 (C3), 122.5 (C6), 116.7 (C5), 77.9 (C3), 75.3 (C4), 74.7 (C4'''), 71.6 (C4'' 或 C2), 70.9 (C2'' 或 C4), 69.3 (C3'''), 67 (C5''), 硬脂酸部分 34.7, 31.8, 29.7, 25.4, 25, 24.5, 23.7, 23.1, 18.5, 15.2, 12.1。

芦丁分子中, 葡萄糖基的 C4 和 C3 的取代环境相同, 鼠李糖基的 C4'' 和 C3'' 的取代环境相同(见图 3), 因此, 在芦丁的<sup>13</sup>C NMR 波谱中 C4 和 C3 的化学位移及 C4'' 和 C3'' 的化学位移相似。C3 或 C4'' 酯化后, 原来的 C\*-O 变为 C\*-O-CO, 相应地, 化学位移向低场移动。芦丁硬脂酸酯的<sup>13</sup>C NMR 波谱中, C4 和 C3 的化学位移分别为 75.3 ppm 和 77.9 ppm, 基本相似; C3'' 的化学位移为 69.3 ppm, 而 C4'' 的化学位移明显移向低场, 为 74.7 ppm。表明酯化发生在鼠李糖基的 C4'' 位羟基。

硬脂酸在 Novozym 435 催化下对芦丁的选择性酯化反应, 经 FT-IR 光谱和核磁共振波谱分析, 断定纯化得到芦丁硬脂酸酯为单酯化合物, 且酯化只发生在鼠李糖基的 C4'' 位羟基。当酰基供体为月桂酸时, 酯化反应遵循的是相同的酶催化反应机理, 酯化发生位不变。因此, 脂肪酸在 Novozym 435 催化下对芦丁的选择性酯化反应式如图 3 所示。

### 2.2 反应混合物的高效液相色谱(HPLC)

用 HPLC 跟踪测定酯化反应过程中芦丁的减少和芦丁脂肪酸酯的增加。图 4 是硬脂酸在酶催化下对芦丁酯化在不同时间的 HPLC 图(反应 24 h 后添

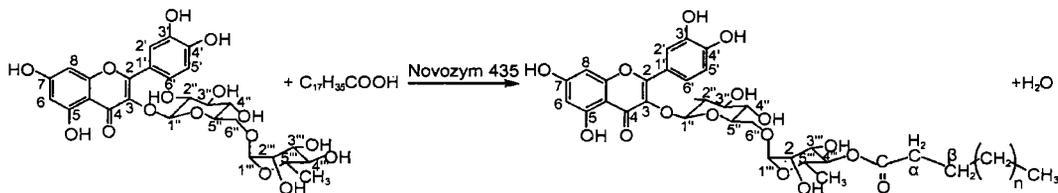


图2 硬脂酸和月桂酸在 Novozym 435 催化下对芦丁的选择性酯化

Fig. 2 Enzyme catalyzed synthesis of rutin stearate and rutin laurate

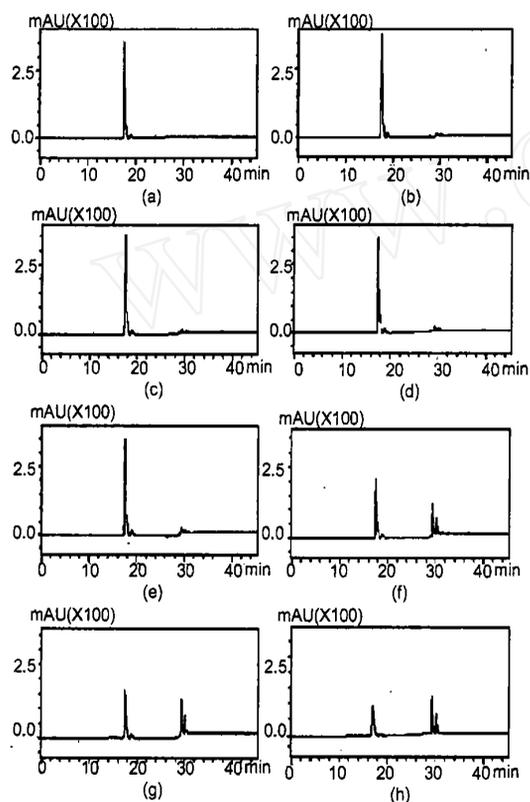


图3 硬脂酸酯化芦丁在不同反应时间的高效液相色谱图(反应 24 h 后添加分子筛) a. 0 h; b. 3 h; c. 7 h; d. 19 h; e. 31 h; f. 55 h; g. 79 h; h. 96 h

17.5 min 时为芦丁峰, 18.9 min 时为芦丁不纯物的峰, 29.4 min 时为芦丁硬脂酸峰, 30.2 min 时为芦丁不纯物的酯化物峰

Fig. 3 A typical HPLC chromatograms of the lipase-catalyzed reaction mixture of rutin and stearic acid at different reaction time: a. 0 h, b. 3 h, c. 7 h, d. 19 h, e. 31 h, f. 55 h, g. 79 h, h. 96 h.

The retention time of the first peak is 17.5 min (for rutin), the second 18.9 min (for impurity of rutin), the third 29.4 min (for impurity of rutin stearate) and the last 30.2 min (for possible product of impurity of rutin).

加分子筛)。图 3 中 17.5 和 29.4 min 时的两个峰分别为芦丁峰和芦丁硬脂酸酯峰。芦丁硬脂酸酯在分子中引入了长烷基链, 疏水性强于芦丁, 因此在反相柱上的保留时间大于芦丁, 在芦丁之后出峰。从图中可见, 随反应时间增长, 芦丁的峰面积逐渐减小, 相应地芦丁硬脂酸酯的峰面积逐渐增大。反应 31 h (图 e) 后芦丁硬脂酸酯含量的增大变得显著, 这是由于反应 24 h 后添加的分子筛吸收了酯化反应生成的水, 使反应速度加快。

### 2.3 分子筛对酯化反应的影响

反应中添加分子筛来吸收酯化生成的水是得到高酯化率的关键。因为酯化反应的中间产物“酰基供体-酶”的生成量越多酯化率就越高, 而酯化生成的水将水解中间产物。考虑到这点, 我们在酯化反应中添加分子筛 4 Å 以吸收酯化反应生成的水。

图 4 是添加及不添加分子筛的硬脂酸酯化芦丁的酯化率曲线。

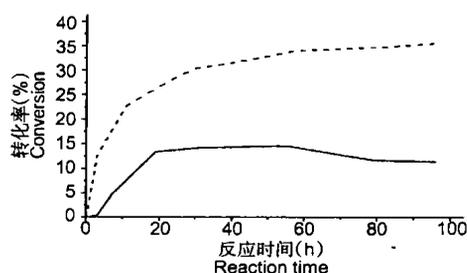


图4 添加及不添加分子筛的以硬脂酸为酰基供体的酯化率曲线

—不添加分子筛, 在反应开始时添加分子筛

Fig. 4 Time-dependence of rutin conversion in lipase-catalyzed esterification with or without molecular sieves. To add molecular sieves to the reaction mixture at the beginning of the reaction.

—Without molecular sieves, with molecular sieves

图 5 是添加及不添加分子筛的月桂酸酯化芦丁的酯化率曲线。

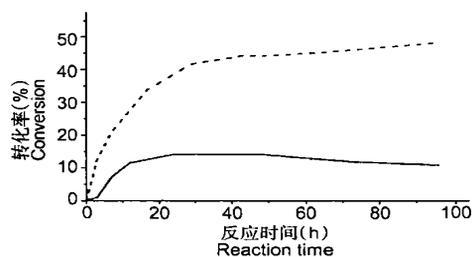


图5 添加及不添加分子筛的以月桂酸为酰基供体的酯化率曲线

—不添加分子筛, 在反应开始时添加分子筛

Fig. 5 Time-dependence of rutin conversion in lipase-catalyzed esterification with or without molecular sieves. To add molecular sieves to the reaction mixture at the beginning of the reaction.

—Without molecular sieves, with molecular sieves

从图4和5看到,不论酰基供体是硬脂酸还是月桂酸,添加分子筛后酯化率在反应初试阶段快速增长,之后增长趋于平缓,最后达到一最大值。未添加分子筛的酯化率在反应的前20 h快速增长,之后增长也趋于平缓,约50 h后由于反应介质中的水增多导致酯键水解,酯化率开始降低。转化率-时间曲线的斜率代表反应速度,从图中可见,在反应初试阶段,添加分子筛后的曲线斜率远大于未添加分子筛的,这说明添加分子筛将增加酯化反应速度。Gacometti等<sup>[22]</sup>也曾证实添加分子筛能增加酶催化甘油酯化的反应速度。

为了考察分子筛添加时间不同对酯化反应的影响,我们作了一系列实验,在酯化反应的不同时间段添加分子筛,并用HPLC检测反应进程。图6为以硬脂酸为酰基供体,酯化反应5、18、24、31和44 h后添加分子筛的酯化率曲线。

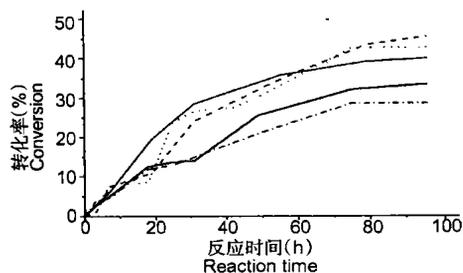


图6 硬脂酸对芦丁的酯化反应进行不同时间后添加分子筛的酯化率曲线

—5 h, ...18 h, 24 h, —·—31 h, 44 h

Fig. 6 Time-dependence of rutin conversion in lipase-catalyzed esterification using molecular sieves at different times after the beginning of the reaction.

—5 h, ...18 h, 24 h, —·—31 h, 44 h

对于在反应5、18和24 h后添加分子筛的情况,初始的反应速度低于在反应开始就添加分子筛的反应速度,添加分子筛后,反应速度迅速增大,并且这种增大的趋势一直保持到反应结束,最终酯化率大于初始就加分子筛的酯化率。从图中还可以看到反应进行了24 h后添加分子筛的酯化反应可以得到最大的酯化率46%。

对于在反应进行了31和44 h后添加分子筛的情况,反应进行了20 h后转化率的增长开始变慢。这曾被Gayot等<sup>[19]</sup>对棕榈酸在酶催化下对柚皮苷选择性酯化的研究中发现,如果反应中不添加分子筛,酯化反应24 h后反应速率显著降低。在我们的酯化反应中,由于添加分子筛时反应速度已经降低,因此最终的酯化率低于在24 h添加分子筛的酯化率。

图7为以月桂酸为酰基供体,酯化反应分别进行了5、11、24和43 h后添加分子筛的酯化率曲线。

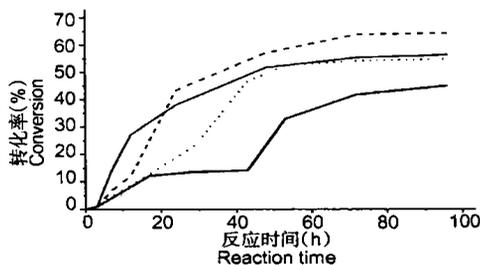


图7 月桂酸对芦丁的酯化反应进行不同时间后添加分子筛的酯化率曲线

—5 h, 11 h, ...24 h, 43 h

Fig. 7 Time-dependence of rutin conversion in lipase-catalyzed esterification using molecular sieves at different times after the beginning of the reaction.

—5 h, 11 h, ...24 h, 43 h

从图7看到,同以硬脂酸为酰基供体的酯化反应相似,四条曲线都在添加分子筛后反应速率迅速增大。对于反应5、11和24 h后添加分子筛的酯化反应,它们的最终酯化率都大于初始就加分子筛的酯化率。从图中还可以看到反应进行了11 h后添加分子筛的酯化反应可以得到最大的酯化率64.5%。对于在反应进行了43 h后添加分子筛的情况,由于添加分子筛时反应速度已经降低,因此最终的酯化率低于在11 h添加分子筛的酯化率。

### 3 结论

为增加芦丁的亲脂性以增强其抗氧化活性,我们以脂肪酶Novozym 435为催化剂,用硬脂酸和月桂

酸选择性酯化芦丁,得到了两种含不同长度烷基链的芦丁脂肪酸酯。以芦丁硬脂酸酯为代表物,用红外光谱和核磁共振光谱对其结构进行鉴定,结果表明酯化只发生在鼠李糖的 C4''位羟基。以配置了二极管阵列检测器的高效液相色谱检测酯化反应进程,研究发现添加分子筛后的酯化反应的酯化率和反应速率远大于不添加分子筛的情况。分子筛添加时间不同,酯化率也不同。对于硬脂酸为酰基供体的情况,反应 24 h 后添加分子筛的酯化反应可以得到最大的酯化率 46%。以月桂酸为酰基供体的酯化反应,反应 11 h 后添加分子筛可以得到最大的酯化率 64.5%。

#### 参考文献

- Saleh MM, Hashem FA, Gombitza KW. Study of *Citrus taitensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated. *Food Chem*, 1998, 63:397-400.
- Gamez EJ, Luyengi L, Lee SK, et al. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *J Nat Prod*, 1998, 61:706-708.
- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33:1061-1080.
- Guohua C, Emin S, Ronald LP. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad Biol Med*, 1997, 22:749-760.
- Zhu QY, Huang Y, Chen ZY. Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *J Nutr Biochem*, 2000, 11:14-21.
- Vaya J, Mahmood S, Goldblum A, et al. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry*, 2003, 62:89-99.
- Hou L, Zhou B, Yang L, et al. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. *Chem Phys Lipids*, 2004, 129:209-219.
- Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Rad Biol Med*, 1997, 23:302-313.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharma*, 1999, 66:11-17.
- Bi S Y, Ding L, Tian Y, et al. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J Mole Stru*, 2004, 703:37-45.
- Saija A, Tomaino A, Trombetta D, et al. "In vitro" antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *Eur J Pharma Biopharma*, 2003, 56:167-174.
- Shen RS (沈生荣), Jin CF (金超芳), Yang XQ (杨贤强). Molecule modification of catechins. *J Tea (茶叶)*, 1999, 25(2):76-79.
- Wang QE (王巧娥), Tang AB (唐安斌), Shi B (石碧). The synthesis of liposoluble tea polyphenols(LTP) and its resistance to autoxidation of oil. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2001, 13(4):12-15.
- Danieli B, Riva S. Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. *Pure Appl Chem*, 1994, 66:2215-2218.
- Danieli B, Luisetti M, Sampognaro G, et al. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym*, 1997, 3:193-201.
- Hakajima N, Ishihara K, Hamada H, et al. Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90:347-349.
- Nakajima N, Ishihara K, Itoh T, et al. Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87:105-107.
- Kongogianni A, Skouridou V, Sereti V, et al. Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 21(1-2):59-62.
- Cayot S, Santarelli X, Coulon D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J Biothech*, 2003, 101:29-36.
- Ardhaoui M, Falcimaigne A, Ognier S, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J Biotech*, 2004, 110:265-272.
- Song X (宋欣), Qu YB (曲音波), Hu XY (胡晓燕). Studies of lipase-catalyzed oleyl linolenate synthesis in nonaqueous media. *Chem J Chin Univ(高等学校化学学报)*, 1999, 20:1578-1580.
- Gacometti J, Gacometti F, Cedomila M, et al. Kinetic characterisation of enzymatic esterification in a solvent system: adsorptive control of water with molecular sieves. *J Mol Catal B: Enzym*, 2001, 11:921-928.