

芦丁酯的酶催化区域选择性合成及其 抗氧化活性研究进展

刘懿航¹, 杨浩楠¹, 佳 丽¹, 赵丽涛¹, 巩发永², 李 静², 何文森^{1*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 攀西特色作物研究与利用
四川省重点实验室, 西昌 615013)

摘 要: 芦丁即槲皮素-3-O-芸香糖苷, 是存在于苦荞、芸香、槐树等的天然类黄酮类化合物。芦丁具有抗氧化、降糖、预防心血管疾病等生物活性, 但低溶解度限制了其实际应用。通过对芦丁结构进行亲油修饰合成芦丁酯, 可以有效改善脂溶性, 提高生物利用率。本文详细综述了非水相酶催化合成芦丁酯的研究进展, 重点介绍了酶种类、反应介质、酰基供体等因素对芦丁酯酶促合成规律的影响。酶促合成芦丁酯的难点在于芦丁含多个羟基及其与酰基供体的不互溶性, 本文总结了芦丁的修饰位点, 提出了通过介质复配、物理辅助手段改善底物溶解性, 通过筛选酶、酶修饰等可以得到高区域选择性的芦丁酯; 进一步阐述了酰化修饰对芦丁抗氧化活性的影响, 并总结了现有芦丁酯的分离纯化策略; 最后展望了芦丁酯的未来研究方向, 对今后芦丁酯的深入研究及开发利用具有指导意义。

关键词: 芦丁; 脂溶性; 脂肪酶; 区域选择性; 抗氧化

Research progress on enzymatic regioselective synthesis of rutin and its antioxidant activity

LIU Yi-Hang¹, YANG Hao-Nan¹, JIA Li¹, ZHAO Li-Tao¹, GONG Fa-Yong², LI Jing², HE Wen-Sen^{1*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Panxi Crops Research
and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Xichang 615013, China)

ABSTRACT: Rutin, or quercetin-3-O-rutinoside, is a natural flavonoid present in buckwheat, rue, and *Sophora japonica* and other plants. Rutin has various biological activities such as antioxidant, hypoglycemic, and cardiovascular disease prevention, but its low solubility limits its practical application. The synthesis of rutin ester by lipophilic modification of rutin structure can effectively improve lipid solubility and increase bioavailability. This study presented a detailed review of the progress of enzyme-catalyzed synthesis of rutin ester in the non-aqueous phase, focusing on the effects of enzyme type, reaction media and acyl donor on the synthesis law of rutin ester. The

基金项目: 攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室资助课题项目、江苏大学 2021 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110299020)、江苏大学第 21 批大学生科研课题立项资助项目 (21A289)、江苏大学 2021/2022 年校级大学生创新训练计划项目 (202110299086Z、2022102991021X)

Fund: Supported by the Open Project Program of Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (202110299020), the Scientific Research Project for Jiangsu University Students (21A289), and the Programs of Innovation Practical Training of Students of Jiangsu University (202110299086Z, 2022102991021X)

*通信作者: 何文森, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为油脂加工与脂质营养。E-mail: wshe2013@163.com

*Corresponding author: HE Wen-Sen, Ph.D, Associate Professor, School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China. E-mail: wshe2013@163.com

difficulty of enzymatic synthesis of rutin ester was that rutin contained multiple hydroxyl groups and its insolubility with acyl donors and this study summarized the modification sites of rutin. The substrate solubility could be improved by through media compounding and physical assistance. High regioselectivity of rutin ester could be obtained by screening enzymes, enzyme modification, *etc.*, further described the effect of acyl modification on the antioxidant activity of rutin, and summarized the existing strategies for the isolation and purification of rutin. Finally, proposed the future research directions of rutin esters, which are of guidance for their further research and exploitation in the future.

KEY WORDS: rutin; lipid solubility; lipase; regioselectivity; antioxidant

0 引言

芦丁, 即芸香甙、维生素 P, 化学名为 5,7,3',4'-四羟基-3-芸香糖黄酮, 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$, 是槲皮素-3-O-芸香糖(α -L-鼠李糖 1-6- β -D-葡萄糖)苷(图 1)。芦丁在自然界中分布广泛, 目前已发现含芦丁的植物达 70 多种^[1]。其中, 苦荞、芸香、槐树、桉树中芦丁含量尤为丰富^[2-3]。研究表明, 芦丁具有抗氧化、消炎、抗衰老、抗血栓、降糖等多种生物活性^[4-8]。此外, 芦丁还具有减肥、降血压、抗菌、抗癌、抗过敏、治疗帕金森和阿尔茨海默病等多种功效^[9-14]。因此, 芦丁在食品、医药、化妆品等行业应用前景广阔。油脂及富含油脂食品极易氧化, 芦丁虽有良好的抗氧化活性, 但其脂溶性(油溶性、疏水性)差, 难在这些食品体系应用^[6]。此外, 芦丁的疏水性和稳定性差、对膜的穿透性有限、生物利用度低^[15-17], 导致其在体内的生物学效应难以发挥。为了促进芦丁在油脂等体系的应用, 近年来陆续有学者对芦丁进行改性合成芦丁酯以提高脂溶性(油溶性)^[18-20]。

目前常用的芦丁酯合成方法有化学催化法和酶催化法。化学法具有工艺简单、反应快、成本低等优点, 但大多情况下反应条件剧烈、反应位点难以控制, 且易导致不饱和脂肪酸氧化^[21]。相比之下, 酶催化法具有许多优点: (1) 反应条件温和、副反应少; (2) 反应的选择性高, 易分离纯化; (3) 合成的芦丁酯健康安全、绿色环保。与化学合成法相比, 酶催化法可以对芦丁分子中特定羟基进行选择性酯化, 可以解决传统化学法难以实现的问题^[22]。因此, 酶催化法近年受到越来越多的广泛关注。目前国内外利用酶催化法合成芦丁衍生物的报道逐渐增多。基于此, 本文综述了近年来酶法合成芦丁酯的研究进展, 主要包括芦丁酯化位点、酶种类、反应介质、酰基供体 4 方面, 总结了酰化修饰对芦丁抗氧化活性的影响, 阐述了现有芦丁酯的分离纯化方法, 同时, 对芦丁酯的未来研究方向提出展望, 对今后芦丁酯的深入研究与开发利用提供重要参考价值。

1 酶催化合成芦丁酯的酯化位点

芦丁分子中含有多个羟基, 既有酚羟基, 又有糖苷羟基(图 1)。理论上, 这些羟基都是潜在的酯化位点。然而, 脂

肪酶催化芦丁酯化都发生在糖苷羟基。正常情况下, 不同类型羟基在酶促酯化反应的优先顺序依次为: 伯羟基、仲羟基和叔羟基。芦丁分子中含有的葡萄糖基和鼠李糖基中均无伯羟基(图 1), 因此酯化反应主要发生在仲羟基。现有文献报道显示, 脂肪酶催化芦丁酯化可以发生在鼠李糖基 4'''-OH、也可发生在葡萄糖基的 3''-OH, 或同时发生于上述两个位点^[18,23-26]。相比之下, 更多的研究显示, 鼠李糖基的 4'''-OH 是脂肪酶促芦丁酯化的最主要结合位点^[27-30]。此外, 枯草杆菌蛋白酶也可催化修饰芦丁, 主要的结合位点是葡萄糖基 3''-OH^[31]。

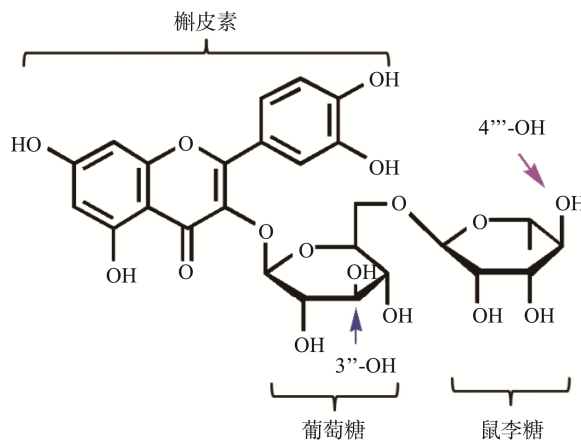


图 1 芦丁的化学结构式
Fig.1 Chemical structure of rutin

2 酶种类对芦丁酯区域选择性合成的影响

众多文献报道了酶催化区域选择性合成芦丁酯。在已有相关研究中, 脂肪酶是应用最多的一类生物催化剂。来源于南极假丝酵母的固定化脂肪酶 B (Novozym 435)、米黑根毛霉的固定脂肪酶(Lipozyme RM IM)、疏棉状嗜热丝孢菌的固定化脂肪酶(Lipozyme TL IM)、皱褶假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa*)和洋葱假单胞菌的脂肪酶(*Pseudomonas cepacia* lipase, PCL)是目前合成槲皮素-3-O-糖苷酯的主要脂肪酶^[18,23]。Novozym 435、Lipozyme RM IM 和 Lipozyme TL IM 是 Novozymes 公司开发的 3 种

商业固定化脂肪酶,已广泛用于催化各类酰化反应。其中,Novozym 435 因其区域选择性高、对有机溶剂耐受性强、热稳定性好、可催化底物种类多等优势应用最广。研究表明,Novozym 435 在不同条件下均能成功合成芦丁脂肪酸酯。这是由于:一方面,大多数脂肪酶的催化活性中心被 α -螺旋所形成的“盖子”结构所覆盖,具有界面活化效应,而南极假丝酵母的脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)因缺少“盖子”不存在界面活化效应,使得它在单一有机溶剂始终保持高效催化活性;另一方面,CALB 经固定化形成 Novozym 435,其热稳定性和重复利用性进一步提升^[32]。此外,在催化芦丁酯化方面,Lipozyme RM IM 和 Lipozyme TL IM 的效率虽不及 Novozym 435,但均能成功合成芦丁酯,且转化率与反应溶剂相关^[23]。以 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Bmim]BF₄)和 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([Bmim]PF₆)为溶剂,利用 Lipozyme RM IM 催化芦丁与丁酸乙酯酯,产物转化率分别达 49.5%和 50.0%,而 Lipozyme TL IM 为催化剂时转化率分别为 76.9%和 37.5%。*Candida rugosa* 和 PCL 两种脂肪酶是日本 Amano 公司开发的两种重要脂肪酶。在催化芦丁酯化方面,*Candida rugosa* 脂肪酶几乎不能成功催化合成(转化率<5%),而目前尚无 PCL 在该反应中的应用报道。

部分蛋白酶与脂肪酶一样具有亲核活性中心(ser-OH),因此也可以相同催化机理来催化合成芦丁酯^[33]。XIAO 等^[31]以丁二酸二乙酯、己二酸二乙酯和癸二酸二乙酯为酰基供体,利用枯草杆菌蛋白酶成功合成了芦丁乙酯。与脂肪酶 Novozym 435 相比,枯草杆菌蛋白酶的区域选择性体现在葡萄糖基中的 3'-OH^[31]。由此表明,芦丁酯化位点与所用酶的种类密切相关。此外,酯酶也可成功催化合成芦丁酯。BIELY 等^[34]以乙酸乙酯、丙酸乙酯为酰基供体,利用来自里氏木霉的乙酰酯酶为催化剂在异丙醇中成功合成了乙酸芦丁酯和丙酸芦丁酯。

综上,脂肪酶、蛋白酶和酯酶均可成功催化芦丁酯化,合成相应芦丁酯。然而,不同酶的催化效率及酯化位点有所不同。现有研究大多以价格相对昂贵的固定化脂肪酶 Novozym 435 为催化剂,今后应筛选出价廉、催化活性高的生物酶催化剂用于芦丁酯的合成。此外,酶的固定化或修饰可以提高催化活性或选择性,今后可以聚焦酶的固定化或修饰对芦丁酯区域选择性合成的调控规律。

3 反应介质对酶催化合成芦丁酯的影响

溶剂效应是影响非水相酶催化反应的关键因素。一方面,底物在不同反应介质中溶解度不同,因而可以影响底物分子之间的传质反应。在酶催化合成芦丁酯时,反应介质既要溶解亲水性芦丁,又要适当溶解疏水性酰基供体。另一方面,反应介质可以通过改变体系水分活度影响酶分

子构象,进而对酶的活性和稳定性产生影响。目前,不同有机溶剂如四氢呋喃、丙酮、吡啶、叔丁醇、叔戊醇等均已被用于芦丁酯的酶促合成反应(表 1)。

对于一些能耐受极性溶剂的蛋白酶,大多选用吡啶、二甲亚砜、N,N-二甲基甲酰胺等极性溶剂。XIAO 等^[31]以吡啶为反应介质,利用枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶为生物催化剂成功合成了芦丁乙酯。大多数脂肪酶对于极性溶剂的耐受性弱,故在脂肪酶催化反应中选择合适的溶剂至关重要。MELLOU 等^[28]考察了丙酮、叔丁醇、叔戊醇、四氢呋喃和乙腈对芦丁酯合成的影响,发现以丙酮为溶剂时转化率最高,其次是乙腈、叔丁醇、叔戊醇。四氢呋喃为溶剂时转化率最低,不足 1%。在丙酮中,芦丁和亚油酸均能很好溶解,且不会引起脂肪酶变性。类似地,KONTOGIANNI 等^[40]研究了叔丁醇、丙酮和四氢呋喃对酶促合成芦丁酯的影响。结果发现,当酰基供体为正辛酸和月桂酸时,芦丁酯在丙酮中的转化率最高(17.7% vs 23.0%);当癸酸为酰基供体时,芦丁酯在叔丁醇中的转化率最高(24.0%)。不论选用何种酰基供体,芦丁酯在四氢呋喃中的转化率均最低(<5%)^[40]。单一溶剂往往难以兼顾底物的溶解度和酶的活性,常采用不同溶剂复配来解决该问题。然而,目前在芦丁酯的酶促合成中尚未充分利用复配溶剂这一优势,今后值得深入研究。

此外,离子液体因其溶解能力强、不易挥发、热稳定性好等优点也被用作合成芦丁酯的反应介质。KATSOURA 等^[23]选用两种离子液体[Bmim]BF₄和[Bmim]PF₆作为酶促合成芦丁酯的反应介质。结果表明,反应底物在两种离子液体中均能充分溶解。除 *Candida rugosa* 脂肪酶外,其余脂肪酶(Novozym 435、Lipozyme RM IM、Lipozyme TL IM)在两种离子液体中均能成功合成芦丁酯,且具有较高的转化率。当用 Novozym 435 催化合成芦丁酯时,以离子液体为反应介质时初始反应速率是传统有机溶剂的 2~4 倍。在最适工艺下反应 96 h,芦丁酯的转化率可达 65%^[23]。然而,离子液体用于酶促反应仍有许多问题值得研究,如离子液体体系中酶催化的作用机制、离子液体的残留与安全性等。

反应介质中的水含量在酶催化反应中起重要作用。芦丁酯的酶促合成属于可逆反应。当体系中水分含量较高时,有利于发生水解,不利于发生酯化。适当添加分子筛可以控制反应体系中的水分含量。VAISALI 等^[41]在未添加分子筛情况下,以丙酮(log $P=-0.23$)和叔丁醇(log $P=0.6$)作溶剂时,芦丁酯的转化率分别为 52.1%和 13.0%。在叔丁醇中添加分子筛时,芦丁酯的转化率可以增加至 62.1%^[41]。在丙酮中添加分子筛,芦丁酯的转化率未能升高,反而显著降低。这可能是由于:(1)丙酮与分子筛发生醛醇缩合反应导致自缩合;(2)当酶周围的水合层被分子筛去除时引起脂肪酶的失活。DUAN 等^[45]发现在叔丁醇中添加 100 g/L 4Å 分子筛,显著增加了芦丁硬脂酸酯的转化率。

表 1 近年来酶催化合成芦丁脂肪酸酯的主要工艺参数					
Table 1 Main process parameters for the enzyme-catalyzed synthesis of rutin fatty acid esters in recent years					
酰基供体	酶	反应条件	转化率/%	反应位点	参考文献
乙酸乙烯酯(C2)	Novozym 435	异丙醇, 60°C, 96 h	94	4''-OH,4'',4'''-OH	[35]
乙酸乙烯酯(C2)	Novozym 435	四氢呋喃、丙酮、二氧六环/吡啶, 45°C, 45 h	-	3'',4'''-OH	[36]
乙/丙酸乙烯酯 (C2~C3)	里氏木霉 CE16 乙酰酯酶	异丙醇	60/30	-	[34]
丁酸乙烯酯	Novozym 435/Lipozyme RM IM/Lipozyme TL IM/ <i>Candida rugosa</i>	[Bmim]BF ₄ /[Bmim]PF ₆ /丙酮, 60°C, 96 h	65	4'''-OH	[23]
丁二酸二乙烯酯 (C4)	枯草杆菌蛋白酶	吡啶, 50°C, 4 d	-	-	[31]
丁酸(C4)	枯草杆菌蛋白酶	吡啶, 45°C, 8 h	90	-	[37]
脂肪酸(C3~C18)	Novozym 435	叔丁醇, 55°C, 120 h	16~40	4'''-OH	[24]
脂肪酸(C4~C18)	Novozym 435	叔丁醇, 60°C, 168 h, 酶用量 10 g/L	27~62	4'''-OH	[27]
脂肪酸(C4~C22)	Novozym 435	叔丁醇, 60°C, 168 h, 摩尔比 1:5	15~61	4'''-OH	[38]
脂肪酸(C6~C12)	南极假丝酵母 SP 435 脂肪酶	叔丁醇, 60°C	42~76	4'''-OH	[39]
脂肪酸(C8~C12)	Novozym 435	丙酮/叔丁醇/四氢呋喃, 45°C	50~60	-	[40]
癸酸	南极假丝酵母脂肪酶	丙酮/叔丁醇, 55°C, 96 h, 摩尔比 1:4	13-65	-	[41]
月桂酸	Novozym 435	丙酮, 50°C, 摩尔比 1:4, 96 h	70~77	-	[42]
月桂酸	南极假丝酵母脂肪酶 B	丙酮, 20~55°C, 120 h	-	4'''-OH	[43]
棕榈酸甲酯	Novozym 435	叔丁醇, 60°C, 80 h	<10	-	[44]
硬脂酸	Novozym 435	叔戊醇, 60°C, 44 h	46	-	[45]
油酸	Novozym 435	丙酮, 50°C	70	-	[28]
亚麻酸	Novozym 435	丙酮, 摩尔比 1:4.5, 55°C, 60 h	93.7	-	[21]
多不饱和脂肪酸 (C18~C22)	Novozym 435	丙酮, 50°C, 96 h	30~60	-	[46]

注: -表示文献未提供该数据。

非水相酶催化反应实际上是发生在与酶紧密结合的“必需水”层。酶分子中“必需水”存在可以降低蛋白质刚性, 暴露出活性位点。因此, 适量水分存在有利于酶催化反应进行。不同溶剂对水的亲和程度不同, 故在相同的酶促反应中可能表现出不同的转化效率。在 3 种水分活度(0.07、0.23 和 0.7)下, 芦丁酯在丙酮中的转化率随水分活度增加而逐渐降低, 水分活度控制在 0.07 时最高。在叔丁醇中, 芦丁酯转化率随水分活度增加先增加再降低, 在水分活度 0.23 时达最大^[41]。

综上, 反应介质是酶促合成芦丁酯的重要因素。除了考虑底物溶解性、酶的稳定性和活性外, 还应考虑反应介质中的水分含量和反应体系的水分活度。此外, 在保证酶活性前提下可以通过超声、微波辅助提高底物溶解度, 进而加速酯化反应。

4 酰基供体对芦丁酯酶促合成的影响

酰基供体的选择对于芦丁酯化也很重要。一方面, 酰基供体的碳链长度、不饱和度会影响芦丁酯的脂溶性, 进

而决定了其应用范围。另一方面, 酰基供体的结构、碳链长度及不饱和度也会影响芦丁的酶促酯化效率。目前用于修饰芦丁的疏水酰基供体主要包括脂肪酸、脂肪酸甲酯、脂肪酸乙烯酯等。饱和脂肪酸主要有乙酸、丁酸、癸酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸等, 不饱和脂肪酸包括油酸、亚油酸、亚麻酸等。

脂肪酸的碳链长度对酯化反应产生重要影响。VISKUPICOVA 等^[27]研究了不同碳链长度脂肪酸(C4~C18)对芦丁酯合成的影响。结果发现, 芦丁脂肪酸酯的转化率位于 27%~62%, 具体转化率与脂肪酸链长相关。当以短中链脂肪酸(C4~C12)为酰基供体时, 芦丁的转化率最高, 达 50%以上。当脂肪酸碳链进一步延长时, 转化率逐渐降低。LUE 等^[42]以月桂酸或棕榈酸为酰基供体时, 芦丁酯的产率高达 81%, 而以三文鱼副产物提取的 omega-3 多不饱和脂肪酸为修饰剂时转化率仅 30%^[46]。酰基供体碳链增加, 空间位阻相应增加, 这可能是导致酶催化芦丁酯转化率降低的原因。MELLOU 等^[28]发现脂肪酸的不饱和度对芦丁酯化的影响不大。分别以油酸、亚油酸和 γ -亚麻酸为酰基供

体时芦丁酯的转化率分别为 70%、80%和 68%。

KATSOURA 等^[23]研究了不同酰基供体在[Bmim]BF₄和[Bmim]PF₆中南极假丝酵母脂肪酶催化芦丁酯合成的影响。以碳链长度≤4 的脂肪酸及其乙烯酯为酰基供体时, 转化率高达 65%。当长链脂肪酸及其乙烯酯为酰基供体时, 转化率降低。以月桂酸乙烯酯为酰基供体时, 转化率仅为 23%^[23]。虽然在有机溶剂中固定化南极假丝酵母脂肪酶对长链脂肪酸表现出较好的催化活性, 但其在离子液体中的溶解度低可能是决定其转化率降低的原因。在离子液体中适当加入丙酮, 长链酰基供体的溶解度增加, 芦丁酯的转化率随之增加^[23]。因此, 酰基供体碳链长度增加导致的在离子液体中溶解度降低是引起芦丁酯转化率降低的主要原因。

与脂肪酸、脂肪酸酯相比, 脂肪酸乙烯酯是修饰芦丁的最有效酰基供体。在酶促酯交换时, 生成的副产物乙烯醇能快速异构成乙醛, 后者沸点低极易挥发, 促使反应平衡向芦丁酯生成的方向移动^[18]。

5 芦丁酯产物的分离纯化现状

芦丁酯合成后需经过适当的分离纯化方可应用到不同体系。目前关于芦丁酯的研究大多采用硅胶柱层析法和液液萃取法。VISKUPICOVA 等^[27]报道了一种利用硅胶柱层析法分离芦丁脂肪酸酯的方法。该方法以乙酸乙酯/甲醇(7:3, *V:V*)为洗脱剂, 利用反相薄层色谱法监测馏出液中产物洗脱情况。其中, 反相薄层色谱法采用 RP-18 F₂₅₄ 薄层色谱板, 展开剂为乙腈/乙酸/水(1:40:8, *V:V:V*), 在 254 nm 下显色。芦丁的 *R_f* 为 0.96, 而芦丁饱和脂肪酸酯的 *R_f* 为 0.15~0.87。随着脂肪酸碳链长度增加, *R_f* 逐渐减小; 芦丁不饱和脂肪酸酯的 *R_f* 介于 0.23~0.36。尽管利用硅胶柱法可以从反应样中分离出高纯度芦丁酯, 但该方法具有样品量小、所需时间长等缺点。因此, 亟需开发一种样品量更大的分离方法。

LUE 等^[42]建立了一种液液萃取的方法分离芦丁酯。反应结束, 过滤除去脂肪酶和分子筛, 通过真空旋转蒸发除去反应溶剂丙酮得固体混合物。整个萃取过程主要分两步进行。首先, 室温下利用庚烷/水(4:1, *V:V*)提取未反应的棕榈酸, 重复 3~4 次, 离心去除庚烷层。其次, 利用有机溶剂/水(1:6, *V:V*)在不同温度下萃取产物。通过考察不同温度下芦丁酯在庚烷、甲苯、氯仿、石油苯、异戊醇、乙酸乙酯及芦丁在水中的溶解度, 最终确立出乙酸乙酯/水(1:6, *V:V*)在 60℃时为芦丁酯的最适萃取工艺。利用该方法萃取后, 转化率为 73%~77%的芦丁棕榈酸酯最终纯度可达 97%, 提取率达 74%~90%。类似地, 转化率 70%~72%的芦丁月桂酸酯的纯度可达 98%, 提取率达 80%~81%。与硅胶柱层析法相比, 液液萃取法可以分离的样品量大, 在实际生产中具有重要意义。王炼等^[21]利用类似方法从反应粗产物中分离芦丁亚麻酸酯。首先, 以正庚烷/水(2:1, *V:V*)在 50℃下萃取除去过量的 α -亚麻酸。其次, 以乙酸乙酯/水

(1:1, *V:V*)在 60℃下去除未反应的芦丁, 乙酸乙酯层经氮吹、真空干燥即可得芦丁亚麻酸酯, 产物纯度达 95%。COUTO 等^[24]建立了一种利用高速逆流色谱分离芦丁酯的方法, 以不同比例的正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水为双相溶剂, 产物纯度从不足 40%增加至 90%以上。

6 酰化修饰对芦丁抗氧化活性的影响

芦丁与不同脂肪酸结合后不同程度地改善了亲脂性, 有利于在油脂等体系应用。当与不饱和脂肪酸酯化后, 芦丁的脂溶性/油溶性得到显著提升。

芦丁与 *n*-3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)酯化后其清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基活性并未减弱, 显著优于二丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT), 且在乳液中的抗氧化活性优于 α -生育酚^[46]。不同链长(C4~C18)脂肪酸芦丁酯对 DPPH 自由基的清除率达 60.7%~78.9%, 是 BHT 的 4~5 倍^[27]。在 β -胡萝卜素/亚油酸酯体系中, 芦丁酯对脂质氧化的抑制作用较游离芦丁提高 15%。芦丁酯的脂肪酸碳链越长, 对脂质氧化的抑制作用越强。众多芦丁酯中, 硬脂酸酯的抑制氧化能力最强, 与 BHT 相当。在抑制葵花籽油氧化方面, 芦丁棕榈酸酯、硬脂酸酯、油酸酯、亚油酸酯和亚麻酸酯效果最好, 其效果高于或与 α -生育酚的效果相当^[27]。在极易氧化的沙丁鱼油(富含 *n*-3 PUFA)中, 芦丁脂肪酸酯抑制初级氧化产物(50.0% vs 20.6%)和次级氧化产物(42.4% vs 20.4%)形成的能力显著优于游离芦丁^[47]。SØRENSEN 等^[48]发现芦丁月桂酸酯在富含鱼油牛奶乳液中的抗氧化活性显著优于芦丁和棕榈酸芦丁酯。

LUE 等^[49-50]分别从 DPPH 自由基清除能力、还原力、金属螯合力和抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化、散装油和水包油型(O/W)乳液 6 方面评价了芦丁月桂酸酯、芦丁棕榈酸酯、游离芦丁和 BHT 的抗氧化能力。结果发现, 芦丁及两种芦丁酯均表现出很强的 DPPH 自由基清除能力, 但三者在还原力和金属螯合能力方面表现出较低的活性^[49]。在抑制人体 LDL 氧化方面, 芦丁酯是有效的抗氧化剂, 芦丁月桂酸酯显著优于芦丁、芦丁棕榈酸酯和 BHT^[34]。在这些系统中, 芦丁酯的抗氧化能力依赖于浓度^[49]。相比之下, 在更复杂的系统中使用芦丁酯作为抗氧化剂可能比芦丁更具优势。在抑制散装油氧化方面, 芦丁和 BHT 最有效, 其次是棕榈酸芦丁酯, 而月桂酸芦丁酯在低浓度和高浓度下分别起到抗氧化或促氧化作用^[50]。在 O/W 乳液中, 高浓度芦丁和 BHT 比芦丁酯更有效^[50]。由此说明, 芦丁与中链脂肪酸的酰化并没有提高其在散装油或 O/W 乳液中的抗氧化能力。

综上, 芦丁经酯化修饰后其亲脂性得到提升, 但在不同体系中的抗氧化活性尚无定论。今后需在不同单一体系

中考察不同芦丁酯与芦丁的抗氧化能力, 系统评估芦丁酯对不同氧化体系的抑制规律, 阐明芦丁酯分子与抗氧化活性之间的构效关系。

7 结束语

芦丁是广泛存在于苦荞、芸香、槐树等植物中的天然类黄酮类化合物, 因其良好的抗氧化、消炎、降糖、预防心血管疾病等活性而备受关注。芦丁的溶解性差、生物利用度低限制了其实际应用。利用酶催化法对芦丁分子进行结构修饰, 可以显著改善其脂溶性, 进而拓宽其在油脂等体系的应用。

现有酶促合成芦丁酯的研究主要是以来源于南极假丝酵母的脂肪酶 B 为生物催化剂, 但该酶昂贵的价格限制了其规模化应用, 应进一步筛选出价廉、催化活性高的生物酶催化剂用于芦丁酯的合成。虽然目前涉及酶促合成芦丁酯的报道较多, 但转化率均仍有待提高, 超声、微波等加速酶促反应的新技术可以进一步应用于芦丁酯的酶促合成。芦丁分子引入脂肪酸后其脂溶性显著增加, 在油脂中的抗氧化活性也有报道。一方面, 芦丁酯在不同食品体系中的抗氧化活性缺乏系统研究, 且其安全性有待系统评估。另一方面, 芦丁酯在体内的生物利用度尚不清楚, 今后值得深入研究。

参考文献

- [1] GULLONB, LÚ-CHAU TA, MOREIRA MT, *et al.* Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability [J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 67: 220–235.
- [2] WU XJ, FU GM, LI RY, *et al.* Effect of thermal processing for rutin preservation on the properties of phenolics & starch in Tartary buckwheat achenes [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 1275–1283.
- [3] 李珂, 冯亚莉, 曹瑞梅, 等. 芦丁的结构修饰及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2021, 52: 6413–6424.
LI K, FENG YL, CAO RM, *et al.* Research progress on structural modification and biological activity of rutin [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52: 6413–6424.
- [4] CHOI SS, PARK HR, LEE KA. A comparative study of rutin and rutin glycoside: Antioxidant activity, anti-inflammatory effect, effect on platelet aggregation and blood coagulation [J]. Antioxidants 2022, 10: 1696.
- [5] LI SS, LI J, PAN RY, *et al.* Sodium rutin extends lifespan and health span in mice including positive impacts on liver health [J]. Br J Pharmacol, 2021, 179: 1825–1838.
- [6] NEGAHDARI R, BOHLOULI S, SHARIFI S, *et al.* Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations [J]. Phytother Res, 2021, 35: 1719–1738.
- [7] 冯爽, 马霄, 冯亚莉, 等. 天然化合物芦丁的治疗潜力[J]. 化学通报, 2021, 84: 1338–1344.
FENG S, MA X, FENG YL, *et al.* Therapeutic potential of natural compound rutin [J]. Chemistry, 2021, 84: 1338–1344.
- [8] WU HT, SU ML, JIN H, *et al.* Rutin-loaded silver nanoparticles with antithrombotic function [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 598977.
- [9] YAN X, ZHAI YY, ZHOU WL, *et al.* Intestinal flora mediates antiobesity effect of rutin in high-fat-diet mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2022. DOI: 10.1002/mnfr.202100948
- [10] HOU LS, CUI ZY, SUN P, *et al.* Rutin mitigates hepatic fibrogenesis and inflammation through targeting TLR4 and P2X7 receptor signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Funct Foods, 2020, 64: 103700.
- [11] SAHA S, MISHRA A. Rutin-loaded polymeric nanorods alleviate nephrolithiasis by inhibiting inflammation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* [J]. Food Funct, 2022, 13: 3632–3648.
- [12] SURENDRAN V, PALEI NN. Formulation and characterization of rutin loaded chitosan-alginate nanoparticles: Antidiabetic and cytotoxicity studies [J]. Curr Drug Deliv, 2022, 19: 379–394.
- [13] NOON J, MILLS TB, NORTON IT. The use of antioxidant rutin hydrate Pickering particles to combat lipid oxidation in O/W emulsions [J]. J Food Eng, 2020, 274: 109830.
- [14] CHANDRASEKAR V, ARUNACHALAM SS, HARI H, *et al.* Probing the synergistic effects of rutin and rutin ester on the oxidative stability of sardine oil [J]. J Food Sci Technol-Mysore, 2022. DOI: 10.1007/s13197-022-05473-6
- [15] ACEVEDO-FANI A, OCHOA-GRIMALDO A, LOVEDAY SM, *et al.* Digestive dynamics of yoghurt structure impacting the release and bioaccessibility of the flavonoid rutin [J]. Food Hydrocolloid, 2021, 111: 106215.
- [16] RASHIDINEJAD A, JAMESON GB, SINGH H. The effect of pH and sodium caseinate on the aqueous solubility, stability, and crystallinity of rutin towards concentrated colloidal stable particles for the incorporation into functional foods [J]. Molecules, 2022, 27: 534.
- [17] HUANG A, MCCLEMENTS DJ, LUO, SJ, *et al.* Fabrication of rutin-protein complexes to form and stabilize bilayer emulsions: Impact of concentration and pretreatment [J]. Food Hydrocolloid, 2022, 122: 107056.
- [18] 王雪凝, 孔建强. 酶法合成鞣皮素 3-O-糖苷酰基化衍生物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1–19.
WANG XN, KONG JQ. Enzymatic synthesis of acylated quercetin 3-O-glycosides: A review [J]. Chin J Biotechnol, 2021, 37(6): 1–19.
- [19] ABUALHASAN M, ASSALI M, MAHMOUD A, *et al.* Synthesis of rutin derivatives to enhance lipid solubility and development of topical formulation with a validated analytical method [J]. Curr Drug Deliv, 2022, 19: 117–128.
- [20] UCHIYAMA H, KADOTA K, TOZUKA Y, *et al.* A review of transglycosylated compounds as food additives to enhance the solubility and oral absorption of hydrophobic compounds in nutraceuticals and pharmaceuticals [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2092056
- [21] 王炼, 郑明明, 黄清, 等. 亚麻酸芦丁酯的酶法合成工艺研究[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(6): 717–722.
WANG L, ZHENG MM, HUANG Q, *et al.* Biocatalysis synthesis of rutin esters of α -linolenic acid [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2013, 35(6): 717–722.
- [22] 何文森, 王慧慧, 马海乐, 等. 植物甾醇的改性研究进展[J]. 中国油脂, 2015, 40(11): 85–90.
HE WS, WANG HH, MA HL, *et al.* Advance in the modification of phytosterols [J]. China Oils Fats, 2015, 40(11): 85–90.

- [23] KATSOURA MH, POLYDERA AC, TSIRONIS L, *et al.* Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency [J]. *J Biotechnol*, 2006, 123: 491–503.
- [24] COUTO JFO, SIMAS DLR, SILVA MVT, *et al.* HSCC separations of rutin esters obtained by enzymatic reaction catalyzed by lipase [J]. *J Braz Chem Soc*, 2021, 32(3): 523–533.
- [25] 曹清丽, 吕玉姣, 林强. 有机相中脂肪酶催化合成黄酮酯类研究进展 [J]. *化学世界*, 2013, 7: 424–428, 434.
CAO QL, LV YJ, LIN Q. The research progress of lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters in organic medium [J]. *Chem World*, 2013, 7: 424–428, 434.
- [26] VISKUPICOVA J, MALIAR T. Rutin fatty acid esters: From synthesis to biological health effects and application [J]. *J Food Nutr Res*, 2017, 56(3): 232–243.
- [27] VISKUPICOVA J, DANIHELOVA M, ONDREJOVIC M, *et al.* Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods [J]. *Food Chem*, 2010, 123: 45–50.
- [28] MELLOU F, LOUVRARI H, STAMATIS H, *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 Biochem*, 2006, 41: 2029–2034.
- [29] ARDHAOU M, FALCIMAIGNE A, OGNIER S, *et al.* Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids [J]. *J Biotechnol*, 2006, 123: 491–503.
- [30] OLIVEIRA EBD, HUMEAU C, CHEBIL L, *et al.* A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2009, 59(1): 96–105.
- [31] XIAO YM, QI W, WU WB, *et al.* Controllable regioselective acylation of rutin catalyzed by enzymes in non-aqueous solvents [J]. *Biotechnol Lett*, 2005, 27: 1591–1595.
- [32] CHEN G, KHAN IM, HE W, *et al.* Rebuilding the lid region from conformational and dynamic features to engineering applications of lipase in foods current status and future prospects [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2022, 21: 2688–2714.
- [33] 万会达, 夏咏梅. 酶催化区域选择性合成蔗糖酯的研究进展 [J]. *日用化学工业*, 2010, 40: 48–53.
WAN HD, XIA YM. Progress in regioselective synthesis of sucrose ester by enzymatic catalysis [J]. *China Surfact Deterg Cosmet*, 2010, 40: 48–53.
- [34] BIELY P, CZISZÁROVÁ M, WONG KKY, *et al.* Enzymatic acylation of flavonoid glycosides by a carbohydrate esterase of family 16 [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 2249–2255.
- [35] MECENAS AS, MALAFAIA CRA, SANGENITO LS, *et al.* Rutin derivatives obtained by transesterification reactions catalyzed by Novozym 435: Antioxidant properties and absence of toxicity in mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203159.
- [36] 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]. *J Mol Catal B-Enzym*, 1997, 3: 193–201.
- [37] KODELIA G, ATHANASIOU K, KOLISIS FN. Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenetic effects in mammalian cells in culture [J]. *App Biochem Biotechnol*, 1994, 44: 205–212.
- [38] VISKUPICOVA J, DANIHELOVA M, MAJEKOVA M, *et al.* Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: A quantum-chemical QSAR analysis [J]. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2012, 27(6): 800–809.
- [39] ARDHAOU M, FALCIMAIGNE A, ENGASSER JM, *et al.* Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2004, 29: 63–67.
- [40] KONTOGIANNI A, SKOURIDOU V, SERETI V, *et al.* Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2001, 103: 655–660.
- [41] VAISALI C, BELUR PD, IYYASWAM R. Lipase mediated synthesis of rutin fatty ester: Study of its process parameters and solvent polarity [J]. *Food Chem*, 2017, 232: 278–285.
- [42] LUE BM, GUO Z, GLASIUS M, *et al.* Scalable preparation of high purity rutin fatty acid esters [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2010, 87: 55–61.
- [43] RAZAK NNA, ANNUR MSM. Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2015, 54: 5604–5612.
- [44] PASSICOS E, SANTARELLI X, COULON D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 1073–1076.
- [45] DUAN Y, DU Z, YAO Y, *et al.* Effect of molecular sieves on lipase-catalyzed esterification of rutin with stearic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 6219–6225.
- [46] MBATIA B, KAKI SS, MATTIASSEN B, *et al.* Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 7021–7027.
- [47] VAISALI C, BELUR PD, IYYASWAMI R. Effectiveness of rutin and its lipophilic ester in improving oxidative stability of sardine oil containing trace water [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2018, 53: 541–548.
- [48] SØRENSEN ADM, PETERSEN LK, DIEGO S, *et al.* The antioxidative effect of lipophilized rutin and dihydro-caffeic acid in fish oil enriched milk [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114: 434–445.
- [49] LUE BM, NIELSEN NS, JACOBSEN C, *et al.* Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays [J]. *Food Chem*, 2010, 123: 221–230.
- [50] LUE BM, SØRENSEN ADM, JACOBSEN C, *et al.* Antioxidant efficacies of rutin and rutin esters in bulk oil and oil-in-water emulsion [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2017, 119: 1600049.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



刘懿航, 主要研究方向为芦丁的分子修饰及生物活性研究。
E-mail: 1102991013@qq.com



何文森, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为油脂加工与脂质营养。
E-mail: wshe2013@163.com