

综 述 评 论

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2015.02.024

油橄榄羟基酪醇的生物合成及其衍生物研究进展



YUAN Jiao-jiao

原姣姣¹, 叶建中¹, 王成章^{1,2*}, 鲁黎³

(1. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局 林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省 生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042;

2. 中国林业科学研究院 林业新技术研究所, 北京 100091;

3. 湖北省林业科学研究院, 湖北 武汉 430079)

摘 要: 介绍了传统化学合成羟基酪醇的方法, 针对化学合成反应步骤多、催化剂昂贵、产率低、污染大等问题, 重点总结了以橄榄苦苷和酪醇为原料生物法合成羟基酪醇的途径, 同时还综述了羟基酪醇烷基醚、脂肪酸酯、糖基化等衍生物的制备方法、生物活性及其构效关系, 为羟基酪醇及其衍生物批量制备及其抗肿瘤、抗癌、心脑血管疾病新药的筛选提供参考和指导作用。

关键词: 羟基酪醇; 羟基酪醇烷基醚; 羟基酪醇糖苷; 脂肪酸酯; 生物转化

中图分类号: TQ35

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2015)02-0154-09

引文格式: 原姣姣, 叶建中, 王成章, 等. 油橄榄羟基酪醇的生物合成及其衍生物研究进展[J]. 林产化学与工业, 2015, 35(2): 154-162.

Advance in Biosyntheses and Biological Activities of Olive Hydroxytyrosol and Its Derivatives

YUAN Jiao-jiao¹, YE Jian-zhong¹, WANG Cheng-zhang^{1,2}, LU Li³

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. of Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China; 2. Research Institute of Forestry New Technology, CAF, Beijing 100091, China; 3. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430079, China)

Abstract: Chemical syntheses of hydroxytyrosol from different materials were investigated. Its disadvantages included long route, the low yield of product, and expensive catalyst as well as toxic reactants, etc.. This paper emphatically summarized biological synthetic routes for hydroxytyrosol with oleuropein and tyrosol. Furthermore, the syntheses and biological activities of hydroxytyrosol alkyl ether, lipophilic fatty acid ester, and glucoside derivatives, and structure-activity relationship were introduced. It is important to further study the syntheses of hydroxytyrosol and derivatives, and exploit new medicine of anti-tumor, anticancer, cardiovascular and cerebrovascular diseases.

Key words: hydroxytyrosol; alkyl ether; lipophilic fatty acid ester; glucosylated derivatives; biological transformation

橄榄油作为地中海饮食中必不可少的食用油,能大大降低心血管和肺癌的发病率,其营养价值和经济价值已被广泛认可^[1]。研究发现这主要由于橄榄油中包含大量的多酚类化合物,如橄榄苦苷、羟基酪醇和酪醇等^[2]。尤其是羟基酪醇(3,4-二羟基苯乙醇,简称 HT),清除自由基的能力强,表现出独特的生物活性,如抗氧化、抗菌、抗炎、改善心脏的冠脉血流、抑制胶原诱导的血小板凝聚、有效地保护香烟

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 甘肃省科技重大专项(143NKDK025); 国家林业局推广项目(2012-18)

作者简介: 原姣姣(1988—),女,山西晋城人,博士生,从事天然产物化学研究

* 通讯作者: 王成章(1966—),男,湖北汉川人,研究员,博士,博士生导师,主要从事天然产物研究与开发; E-mail: wangczl@sina.com。

有毒成分丙烯醛造成的视网膜色素上皮细胞的氧化损伤和线粒体功能失调,保护软骨和抗骨质疏松等^[3-7]。羟基酪醇还能抑制人类早幼细胞白血病细胞 HL60^[8]、腺癌细胞 HT29 及 HT29 克隆体 19A^[9]、女性乳腺癌 MCF-7 细胞^[10]等扩散,透过阻滞肿瘤细胞的循环及诱发其凋亡,具有很好的抗癌活性。尽管羟基酪醇有诸多生物活性,但国际市场上还没有任何公司批量生产天然羟基酪醇产品。天然羟基酪醇以橄榄苦苷酯化物的形式存在,主要从橄榄果渣和橄榄油加工废水中富集,成本高,目前没有实现羟基酪醇批量制备。Sigma、Aldrich、Fluka、Merck、Across 等公司仅提供少量试剂级橄榄苦苷和羟基酪醇,同时国外有羟基酪醇的不同剂型医药保健品问世。作者介绍了传统化学合成羟基酪醇的方法,重点总结了以油橄榄苦苷和酪醇为原料生物法合成羟基酪醇的途径,同时还综述了羟基酪醇烷基醚、脂肪酸酯、糖基化等衍生物的制备方法、生物活性及其构效关系,旨在为羟基酪醇及其衍生物的批量制备提供参考。

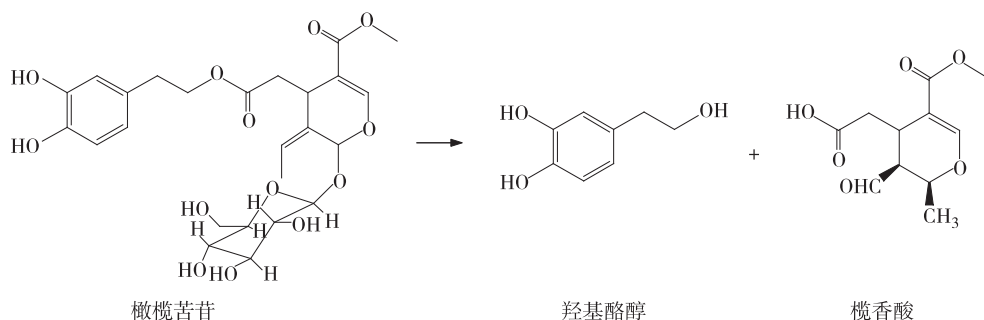
1 羟基酪醇的合成

1.1 化学降解法制备羟基酪醇

天然羟基酪醇是存在于橄榄油中的小分子酚类化合物,含量很低,大多数以酯化物(橄榄苦苷)的形式存在于油橄榄的各个部位。研究表明,不同品种、不同部位的油橄榄叶中橄榄苦苷和羟基酪醇含量存在明显差异^[11-12],而游离的羟基酪醇含量仅有 0.01%~0.8%^[12]。

目前羟基酪醇主要是从橄榄果、叶,以及在制备橄榄油或餐用橄榄果过程中产生的残渣和废水中分离的,而废水中橄榄苦苷、女贞苷、毛蕊花苷等糖苷、黄酮苷及多酚类物质成分复杂,分离效率低。而纯化羟基酪醇主要采用柱色谱分离的方法,例如:离子交换树脂、大孔吸附树脂、硅胶层析色谱等^[13]。目前的技术还不能大量地将羟基酪醇从成分复杂的废水中分离出来。

油橄榄果及叶中橄榄苦苷含量高,尤其在叶中达到 10%~17%^[11]。其结构为裂环烯醚类多酚化合物,极易受空气、阳光、酸、碱、氧化剂、过渡金属离子、长时间高温等因素的影响,发生氧化、缩合、螯合等反应遭受破坏,尤其是在酸、碱和酶的作用下易降解为羟基酪醇和榄香酸^[14],如下图所示。因此利用橄榄苦苷降解制备天然羟基酪醇是国内外研究热点。



Antonio 等^[15]采用酸催化降解方法:100 g 橄榄苦苷在硫酸和稀土卤化物催化水解下,可得到 13 g 羟基酪醇,3 g 榄香酸,2.8 g 橄榄苦苷苷元,催化剂价格昂贵,羟基酪醇收率很低;Cuomo 等^[16]采用酸水解橄榄果浆和 XAD-7 树脂分离,结果表明羟基酪醇回收率和纯度均较低。Villanova 等^[17]在中性或碱性条件下水解油橄榄加工废水,经过微滤、超滤、纳滤、反渗透膜分离得到 1 g/L 羟基酪醇。

Felizón 等^[18]报道蒸汽爆破法降解橄榄苦苷方法:采用蒸汽爆破法提取 100 g 干橄榄枯饼,当时间为 135 s,温度为 229 ℃时,可得到 2.8 g 乙酸乙酯萃取物,其中含有 149 mg 羟基酪醇。Leonardis 等^[19]采用 10% 的盐酸水蒸气(100 ℃)提取橄榄叶 1 h,再用乙酸乙酯萃取,其中羟基酪醇占到 92%,占到新鲜叶子的 0.2%。

Rigane 等^[20]对比了酸水解和碱水解橄榄苦苷的化学处理工艺,原料是经过“两相”离心机分离橄榄油后的的橄榄果渣或枯饼。结果表明酸水解处理工艺更佳,使用 1 mol 磷酸 90 ℃水解 80 min 可以得到 1.36 g/kg 的羟基酪醇,而且在高压下酸、碱水解橄榄苦苷分别得到 1.994 和 1.516 g/kg 的羟基酪醇。

1.2 化学法合成羟基酪醇

目前,化学合成羟基酪醇有多种方法,主要以酪醇、3,4-二羟基苯乙酸等为原料,合成路线如图 1

所示,但其产物得率不高,值得进一步寻求更简单、更好的合成方法。

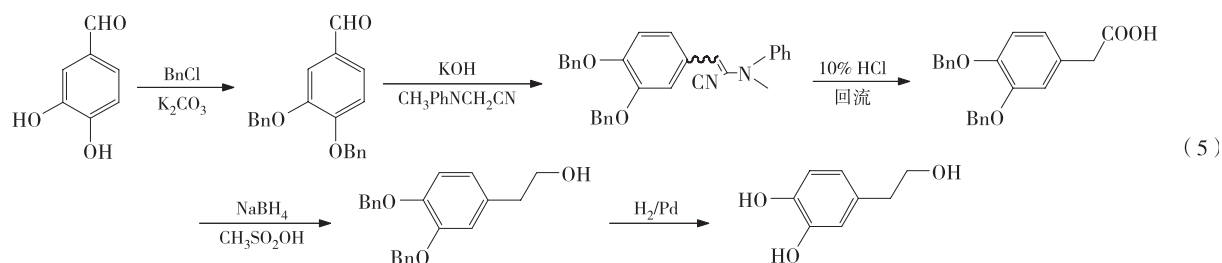
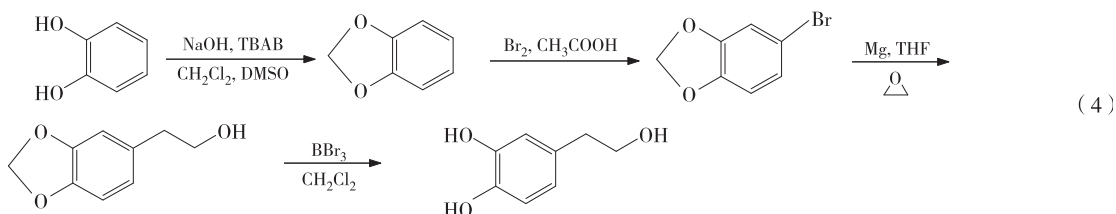
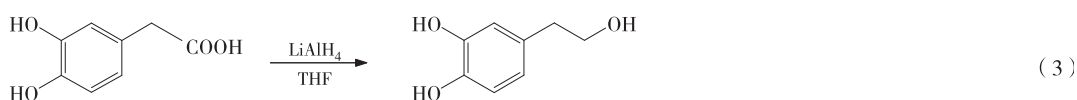
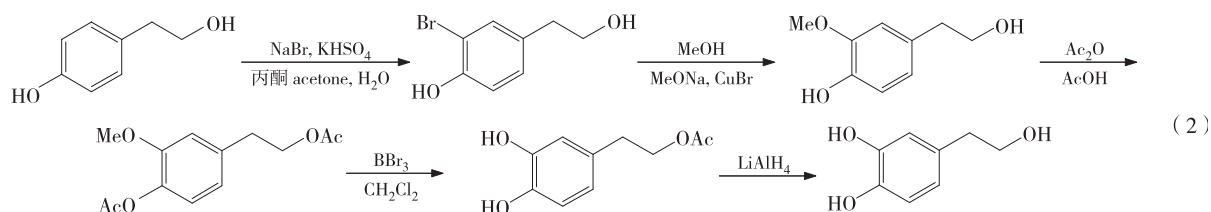
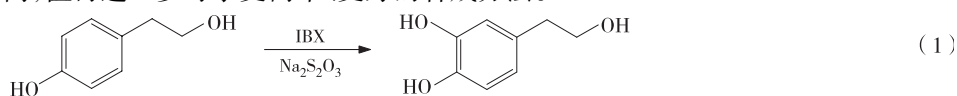


图1 羟基酪醇的化学合成路线

Fig. 1 Chemical synthetic routes of hydroxytyrosol

1.2.1 以酪醇为原料 Lucia 等^[21]在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,酪醇经 2-碘酰基苯甲酸 (IBX) 氧化和硫代硫酸钠还原得到羟基酪醇,收率仅为 30%。合成路线如图 1 中式(1)。

Bovicelli 等^[22]以酪醇为原料,在酚羟基的邻位引入溴取代,而后经甲醇钠催化和溴化亚铜的存在条件下得到 2-甲氧基-4-羟乙基苯酚,然后乙酸酐对酚羟基和醇羟基进行乙酰化保护,再使用三溴化硼脱除甲基,最后用 30% 的盐酸水解除除乙酰基合成羟基酪醇。合成路线如图 1 中式(2)。

Azabou 等^[23]研究了在 254 nm 的紫外光诱导下,存在于 H_2O_2 溶液的酪醇合成羟基酪醇,其过程需要 Al 和 Fe 的黏土催化剂。该合成反应使用 3.6 mol/L 酪醇,0.5 g/L 催化剂和 0.01 mmol/L H_2O_2 溶液可得到 64.36% 的羟基酪醇。

1.2.2 以 3,4-二羟基苯乙酸为原料 3,4-二羟基苯乙酸作为原料,以氢化铝锂^[24],TMSCHNH/硼氢化钠^[25],四正丁基硼烷化胺/碘甲烷^[26]为还原剂,收率都低于 50%,而且原料和催化剂成本昂贵,反应条件苛刻。合成路线如图 1 中式(3)。

延永等^[27]以 3,4-二羟基苯乙酸为原料,在 SOCl_2 存在下,与甲醇生成相应的酯化物,然后在乙醇/钠的还原条件下得到羟基酪醇,其收率为 41%。

1.2.3 以邻苯二酚为原料 徐超等^[28]以邻苯二酚为原料,先将活泼的邻二酚羟基保护起来,再进行对位的溴取代反应,经格氏试剂反应将卤代物变为羟基,最后再去保护释放邻二酚羟基合成羟基酪醇。反

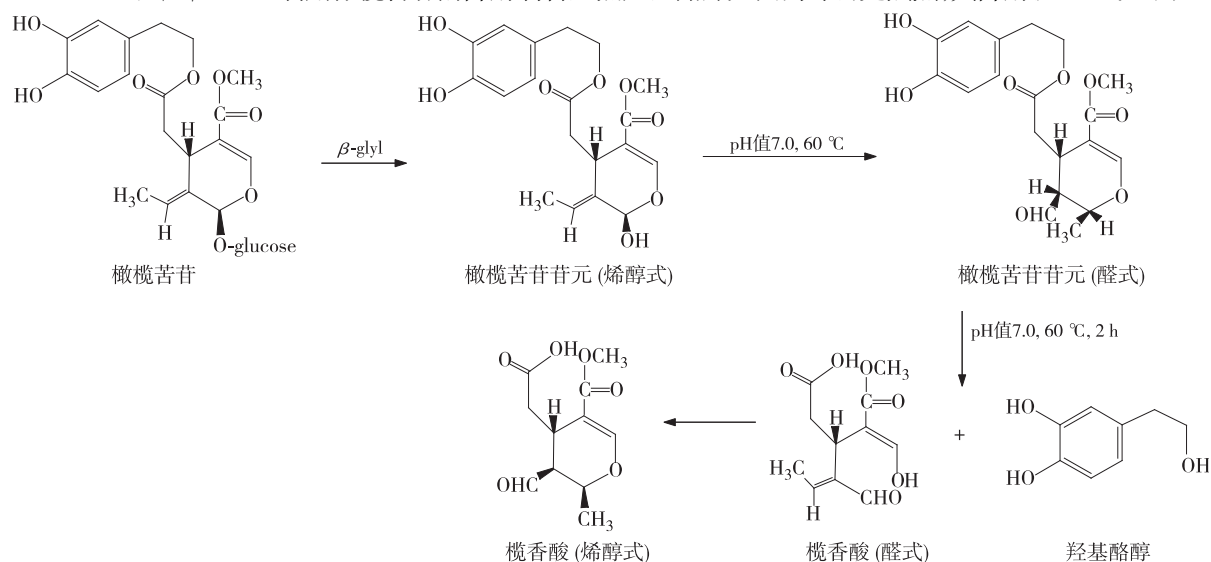
应总收率很低,约为24%。合成路线如图1中式(4)。

1.2.4 以3,4-二羟基苯甲醛为原料 Zhang等^[29]以3,4-二羟基苯甲醛为原料,先用氯化苄将两个酚羟基保护,然后把醛基取代生成易水解的基团,进而在酸性条件下得到酸,再经 NaBH_4 还原成醇,最后再脱掉苄基得到羟基酪醇。合成路线如图1中式(5)。

1.3 生物法合成羟基酪醇

采用生物转化法合成羟基酪醇,大都以橄榄苦苷和酪醇进行酶降解或者菌种的转化。此法反应条件温和,转化率高,环境污染小,具有不可比拟的优势,已成为国内外学者的研究热点。

1.3.1 以酶降解为主 利用橄榄苦苷酶降解制备天然羟基酪醇是国内外研究热点,其降解机理^[30]如下图。



Briante等^[30]利用嗜高温 β -葡萄糖苷酶(pH值7.0, 60 °C)降解橄榄苦苷,该方法使用的酶价格昂贵,且条件苛刻,必须是嗜高温。Briante等^[31]又通过固定在壳聚糖上的嗜高温 β -葡萄糖苷酶得到了大量高纯度的羟基酪醇(91%~94%),其利用壳多糖和壳聚糖吸附极性分子的能力来纯化羟基酪醇,该方法也可以运用到橄榄油压榨厂废水的羟基酪醇回收。

Espin等^[32]采用生物酶法,以Vc为还原剂,酪醇在酪氨酸酶催化下转化为羟基酪醇。其中加入Vc是为了将过度氧化的二醌化合物还原成羟基酪醇。

1.3.2 以细菌发酵为主 Santos等^[33]研究了使用乳酸菌降解橄榄苦苷为羟基酪醇,发现植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 6907降解效率最好,橄榄苦苷的降解率达到90%,而羟基酪醇的生成率只达到30%。实验过程中发现不同菌种在不同条件下(厌氧和好养)作用机制和产物收率不同,而且,菌种*L. paracasei* 9192和*L. plantarum* 6907还检测到中间产物——橄榄苦苷苷元的存在。

Allouche等^[34-35]发现了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和黏质沙雷菌(*Serratia marcescens*)2种土壤菌种都能够将酪醇转化为羟基酪醇。前一种菌在微碱的水溶液中降解7 h的2 g/L酪醇溶液,能够产生80%的羟基酪醇。为了提高羟基酪醇产量和阻止进一步被羟基化,实验采用了此菌的细胞静息方法来研究。结果发现,菌株降解7 h的4 g/L酪醇溶液,能够产生82%的羟基酪醇;当细胞液质量浓度为5 g/L时,可得到96%的羟基酪醇,发酵过程见图2。当邻位、间位和对位酪醇在黏质沙雷菌降解7 h时,产物分别为邻羟基苯乙酸、间羟基苯乙酸和羟基酪醇。只有对位酪醇(2 g/L)能够得到80%的羟基酪醇(1.6 g),此菌种具有一定的选择性。而且,*S. marcescens*相比*P. aeruginosa*来说,是一种更有前景的菌种。它能够生长在质量浓度为4 g/L的酪醇培养基上,而*P. aeruginosa*只能生长在2 g/L的浓度上。

Bouallagui等^[36]利用微生物固相负载技术将*P. aeruginosa*静息细胞固载在海藻酸钙水凝胶上,能够使酪醇在较高的质量浓度下(5 g/L)转化为86%的羟基酪醇,还实现了这种生物催化剂的回收和重新使用,而且催化效率没有明显的降低。Brooks等^[37]也采用同样的微生物固载技术将恶臭假单胞菌*P. putida* F6的细胞提取液负载到海藻酸钙水凝胶上,也实现了酪醇向羟基酪醇的转化(77%)。

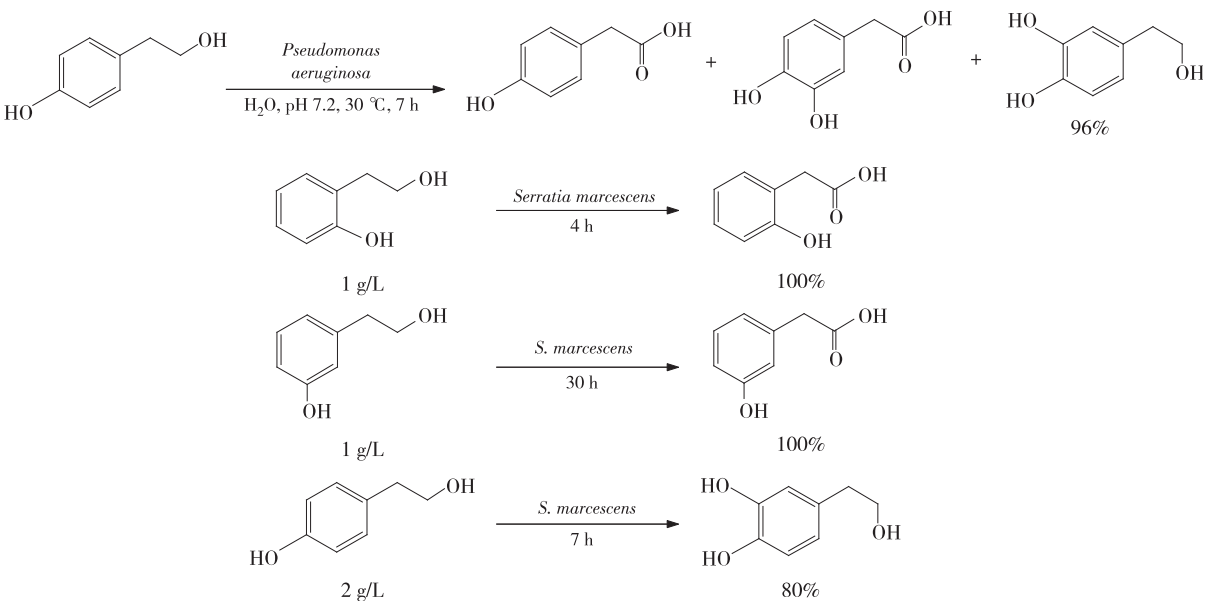
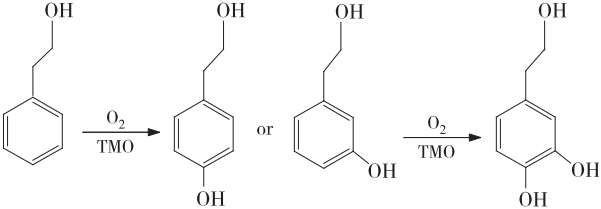


图 2 铜绿假单胞菌和黏质沙雷菌 2 种土壤菌种转化酪醇生产羟基酪醇

Fig. 2 Transformation for hydroxytyrosol from tyrosol by *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*

Satoh 等^[38]还发现大肠杆菌(*Escherichia coli*)内生的辅因子 MH₄ 能够控制酪氨酸的过氧化作用,可以取代酪氨酸羟化过程中必不可少的辅因子 BH₄。经基因工程将老鼠体内的酪氨酸羟化酶植入大肠杆菌内,使得酪氨酸经过一系列途径转化为羟基酪醇。同时 Orenes-Piñero 等^[39]将来自热葡萄糖苷地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)的多酚羟化酶基因(NADH 和 FAD)转入大肠杆菌进行基因表达,能够将酪醇转化为羟基酪醇。Brouk 等^[40]将甲苯-单氧酶(TMO)基因转入大肠杆菌中,使用廉价的苯乙醇为原料,经 2 次羟化后得到羟基酪醇,反应路线见下图。



1.3.3 以真菌发酵为主 Halaoui 等^[41]从 20 多种真菌中筛选出 2 种菌种(朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*), 血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus*))能够分泌酪氨酸酶将酪醇转化成羟基酪醇,且将酪氨酸酶纯化,并对这 2 种菌株的产酶性能进行了系统分析。其中,*P. sanguineus* CBS 614. 73 一天能够产 45.4 U/g 的单酚酶和 163.6 U/g 双酚酶,pH 值范围 6~7,温度范围 30~70 °C。

Bouzid 等^[42]以 2 阶段橄榄油加工处理的液-固橄榄油废料为原料,与富含肉桂酰酯酶的黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)混合发酵,结果表明,用此菌发酵物经 HP-20 树脂和分子筛葡聚糖 Sephadex LH-20 两步层析纯化,每千克干质量废料中含有 2.94 g 的羟基酪醇,纯度为 85%。

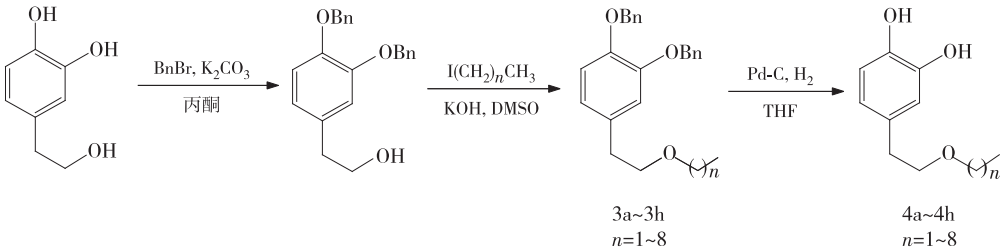
Khoufi 等^[43]发现利用麦麸培养的黑曲霉发酵液能够将橄榄油废水中的羟基酪醇释放出来,其中酶菌产生的酶活为 3 000 IU/L 的葡萄糖苷酶和 100 IU/L 的酯酶。并以橄榄油废水、乙酸乙酯萃取部分和剩余的水部分 3 种样品作为底物评价了酶的降解效果,结果发现黑曲霉发酵 1 L 的橄榄油废水 5 天后,水解液经乙酸乙酯萃取 2 h 能够得到 0.8 g 的羟基酪醇。

2 羟基酪醇衍生物合成及其生物活性

羟基酪醇是三羟基多酚,亲水性强,为了增强其脂溶性以提高生理活性,国际上开始对羟基酪醇的三羟基分子结构进行修饰得到亲脂性衍生物,其在学习和预防心脑血管疾病与肿瘤方面药效明显,此方法成为新药研制的有效途径之一。

2.1 烷基醚衍生物

羟基酪醇烷基醚类化合物是很好的抗氧化物质^[44]。Madrona 等^[45]经三步法合成了一系列的羟基酪醇烷基醚类衍生物,合成线路如下图。



随着烷基链的增长,反应难度越来越大,其产率也随之降低(见表 1)。对这些衍生物进行铁离子还原/抗氧化力(FRAP),2,2-联氮-2-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基(ABTS)和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)等抗氧化性能的比较,表明烷基醚的链长对活性的影响不大,短链衍生物对活性起着正面效应,相反长链对应的物质会相对减少它的活性^[44]。还发现这些衍生物对肝癌^[46]、结肠腺癌^[47-48]的细胞扩散也有着很好的抑制作用。

表 1 羟基酪醇烷基醚的产率¹⁾

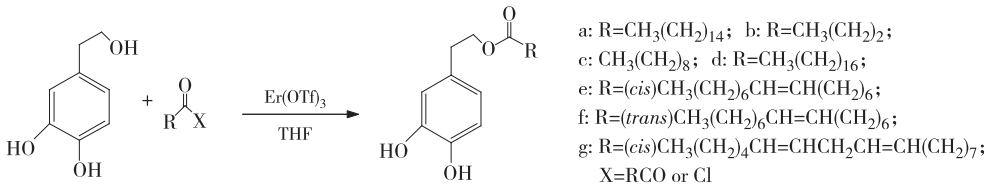
Table 1 Yields of hydroxytyrosol alkyl ethers

<i>n</i>	化合物 compound	产率/% yield	化合物 compound	产率/% yield
1	3a	91	4a	87
2	3b	86	4b	76
3	3c	78	4c	71
4	3d	84	4d	82
5	3e	82	4e	75
6	3f	80	4f	66
7	3g	67	4g	55
8	3h	60	4h	59

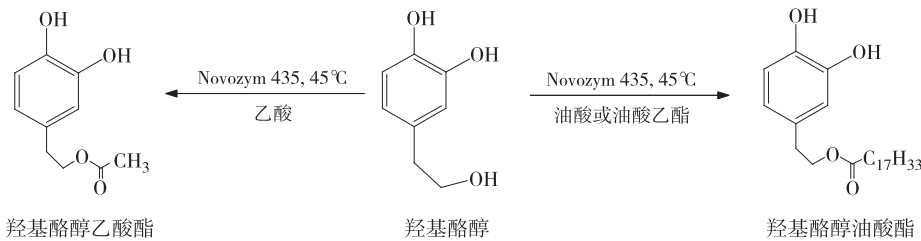
1) 产率均以羟基酪醇质量计 the yield were calculated by hydroxytyrosol mass

2.2 亲脂性脂肪酸酯衍生物

Procopio 等^[49]指出了羟基酪醇亲脂性脂肪酸酯类衍生物的合成路线:由 3,4-二羟基苯乙酸经 NaBH₄ 还原为羟基酪醇,再经酰化或者转酯化反应得到,如下图所示。同时还对脂肪酸酯衍生物进行了皮肤的体外渗透活性研究,结果表明活性与其化学结构以及不饱和脂肪酸共轭情况等息息相关。



Bouallagui 等^[50]研究了酶法催化羟基酪醇脂肪酸酯的生物合成,如下图所示。采用来源于南极假丝酵母(*Candida antarctica*)分泌的脂肪酶催化酰化或者转酯化反应生成羟基酪醇乙酸酯和油酸酯,其产率分别为 98% 和 78%。还研究了其 DPPH 自由基活性,结果显示其酯化衍生物抗氧化性能相比羟基酪醇并没有降低。



Bernini 等^[51]指出由酪醇合成羟基酪醇及其亲脂性衍生物的路线:酪醇先经过酰化或转酯化反应对酪醇的醇羟基进行保护以免其过度氧化,再经 IBX/DMP 氧化和 Na₂S₂O₃ 还原,得到亲脂性酸酯类衍生物,进而脱除保护基团生成羟基酪醇。Bernini 等^[52]还合成了一系列邻苯二酚衍生物(脂肪酸酯和碳酸

甲酯)。2 类衍生物的体外 ABTS 抗氧化实验和单细胞内活性氧化荧光 (DCF) 实验表明,邻苯二酚衍生物体外的抗氧化性能较高,但整个细胞的活性氧化荧光实验并没有表现出很好的结果。

Rezaei-Sadabady 等^[53]认为酪醇和羟基酪醇等多酚物质,都有着很高的自由基清除能力和有效的抗氧化性能。所以他们运用量子化学计算建立了结构-抗氧化剂的构效关系,以酪醇、羟基酪醇、羟基酪醇醋酸盐,还有 2 个衍生物为结构基础,计算化合物的分子电参数,比如,原子、自由基的焓、键能,轨道能量、偶极矩等来得到 H 原子的贡献,得到的键解离能 (BDE) 数据和实验中抗氧化性能相结合,能够很好地预测新抗氧化物的清除自由基性能。

2.3 糖基化衍生物

Trincone 等^[54]采用海兔 (*Aplysia fasciata*) 内脏分泌的 α -葡萄糖苷酶,催化酪醇和羟基酪醇的糖基化反应,生成相应的糖苷类化合物。而且还验证了一个假设:酪氨酸酶能把酪醇氧化成羟基酪醇,同时也能将酪醇的糖苷类衍生物转化为相应的羟基酪醇衍生物。

3 结论与展望

路易斯酸碱催化降解橄榄苦苷的过程中,橄榄苦苷次生代谢产物复杂,缺乏对橄榄苦苷降解机理及次生代谢产物的控制研究,且羟基酪醇在酸碱液中容易发生氧化聚合,导致收率较低。化学合成羟基酪醇反应过程复杂,收率低,且催化剂昂贵,化学试剂有毒,环境污染严重,不适用于工业化生产。生物法合成羟基酪醇途径具有稳定、安全、无污染的优点,但该方法涉及酶和基因工程菌,技术要求比较高,生产周期长,目前技术还不成熟,使得酶和微生物的使用和回收成本较高,大规模生产受到一定限制。因此,寻求高效的专一性酶(或菌)和固定化生物催化剂技术,使原料向羟基酪醇高通量转化,将是制备羟基酪醇较有应用前景的研究方向。

随着植物化学技术不断发展,油橄榄中高附加值产品的出现,使其应用范围不断扩大,这将为油橄榄活性物质的研究和应用提供优良的技术条件。作为从油橄榄里提取的天然化合物,羟基酪醇具有很多生物和药理活性,已逐渐引起研究者的关注。然而油橄榄羟基酪醇的研究与应用仍存在不小的问题和障碍。由于羟基酪醇在自然界含量很低,其工业化合成工艺的开发显得十分重要,但仍然存在很多技术瓶颈。为了尽快实现其工业化合成与进一步的应用开发,选择更为安全、有效、便宜的原料,通过合适的化学合成方法或生物转化法实现向羟基酪醇的高效率、高通量制备成为关键。随着有机合成方法和生物化工技术的不断进步以及对羟基酪醇的深入研究,应尽快开发出适宜于工业化生产羟基酪醇的合成工艺和新型产品。在此基础上,采用化学和生物方法对羟基酪醇进行结构修饰,引入更多的亲脂性基团改变其亲水/疏水平衡,改善原有的生物活性或提高其生理活性等,更深地阐明修饰官能团与生物活性的构效关系,加强亲脂性羟基酪醇衍生物抗肿瘤药物的开发力度。

参考文献:

- [1] GRANADOS-PRINCIPAL S, QUILES J L, RAMIREZ-TORTOSA C L, et al. Hydroxytyrosol: from Laboratory investigations to future clinical trials[J]. Nutrition Reviews, 2010, 68(4): 191-206.
- [2] ROMERO C, BRENES M. Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 9017-9022.
- [3] VISIOLI F, CARUSO D, PLASMATI E, et al. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma[J]. Free Radical Research, 2001, 34(3): 301-305.
- [4] BISIGNANO G, TOMAINO A, CASCIO R L, et al. On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1999, 51(8): 971-974.
- [5] KILLEEN M J, PONTONIERE P, CREA R. Hydroxytyrosol: An examination of its potential role in cardiovascular disease, inflammation, and longevity[J]. Agricultural Food Industry High Technology, 2011, 22(5): 16-19.
- [6] OWEN R W, GIACOSA A, HULL W E, et al. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil[J]. European Journal of Cancer, 2000, 36(10): 1235-1247.
- [7] 刘威振, 张兴, 陈新建, 等. 羟基酪醇药理作用研究进展[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 684-688.

- LIU Wei-zhen,ZHANG Xing,CHEN Xin-jian,et al. Research progress on pharmacological actions of hydroxytyrosol[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University,2012,28(6):684-688.
- [8]FABIANI R,DE BARTOLOMEO A,ROSIGNOLI P,et al. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation[J]. The Journal of Nutrition,2006,136(3):614-619.
- [9]BERNINI R,CRISANTE F,MERENDINO N,et al. Synthesis of a novel ester of hydroxytyrosol and α -lipoic acid exhibiting an antiproliferative effect on human colon cancer HT-29 cells[J]. European Journal of Medicinal Chemistry,2011,46(1):439-446.
- [10]BOUALLAGUI Z,HAN J,ISODA H,et al. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Food and Chemical Toxicology,2011,49(1):179-184.
- [11]王成章,高彩霞,叶建中,等. HPLC 研究油橄榄叶中橄榄苦苷的含量变化规律[J]. 林产化学与工业,2008,28(6):39-43.
WANG Cheng-zhang,GAO Cai-xia,YE Jian-zhong,et al. Study on seasonal variation of oleuropein content in olive leaves by HPLC[J]. Chemistry and Industry of Forest Products,2008,28(6):39-43.
- [12]叶建中,王成章,陈虹霞,等. 油橄榄叶中羟基酪醇含量及提取工艺研究[J]. 林产化学与工业,2011,31(1):63-67.
YE Jian-zhong,WANG Cheng-zhang,CHEN Hong-xia,et al. Content determination and extraction technology of hydroxytyrosol from olive leaves[J]. Chemistry and Industry of Forest Products,2011,31(1):63-67.
- [13]金元宝,党建章,代建国,等. 羟基酪醇分离纯化方法研究进展[J]. 食品科技,2011,36(7):174-177.
JIN Yuan-bao,DANG Jian-zhang,DAI Jian-guo,et al. Progress of extraction and purification of the hydroxytyrosol[J]. Food Science and Technology,2011,36(7):174-177.
- [14]叶建中,王成章,陈虹霞,等. 油橄榄叶中羟基酪醇的含量变化规律研究[J]. 林产化学与工业,2011,31(2):70-74.
YE Jian-zhong,WANG Cheng-zhang,CHEN Hong-xia,et al. Variation rule of hydroxytyrosol content in olive leaves[J]. Chemistry and Industry of Forest Products,2011,31(2):70-74.
- [15]ANTONIO P,GIOVANNI S,NICOLA C,et al. Chemical-catalytic method for the peracylation of oleuropein and its products of hydrolysis;EP, WO2008136037[P]. 2008-11-13.
- [16]CUOMO J,RABOVSKIY A B. Antioxidant compositions extracted from a wastewater from olive oil production;US,US6361803[P]. 2002-03-26.
- [17]VILLANOVA L,FASIELLO G,MERENDINO A,et al. Process for the recovery of tyrosol and hydroxytyrosol from oil mill wastewaters and catalytic oxidation method in order to convert tyrosol in hydroxytyrosol;EP,1623960[P]. 2009-12-23.
- [18]FELIZÓN B,FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J,HEREDIA A,et al. Steam-explosion pretreatment of olive cake[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,2000,77(1):15-22.
- [19]LEONARDIS A D,ARETINI A,ALFANO G,et al. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity[J]. European Food Research and Technology,2008,226(4):653-659.
- [20]RIGANE G,BOUAZIZ M,BACCAR N,et al. Recovery of hydroxytyrosol rich extract from two-phase chemlali olive pomace by chemical treatment[J]. Journal of Food Science,2012,77(10):1077-1083.
- [21]LUCIA M D,PANZELLA L,PEZZELLA A,et al. Oxidative chemistry of the natural antioxidant hydroxytyrosol:Hydrogen peroxide-dependent hydroxylation and hydroxyquinone/o-quinone coupling pathways[J]. Tetrahedron,2006,62(6):1273-1278.
- [22]BOVICELLI P,ANTONIOLETTI R,MANCINI S,et al. Expedient synthesis of hydroxytyrosol and its esters[J]. Synthetic Communications,2007,37(23):4245-4252.
- [23]AZABOU S,NAJJAR W,GHORBEL A,et al. Mild photochemical synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2007,55(12):4877-4882.
- [24]BARALDI P G,SIMONI D,MANFREDINI S,et al. Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol: A reinvestigation[J]. Liebigs Annalen der Chemie,1983,1983(4):684-686.
- [25]BAI Chen,YAN Xiao-jun,TAKENAKA M,et al. Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1998,46(10):3998-4001.
- [26]TUCK K L,TAN Hai-wei,HAYBALL P J. Synthesis of tritium-labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2000,48(9):4087-4090.
- [27]延永,郭媛,彭梦姣,等. 羟基酪醇的合成[J]. 精细化工,2012,29(10):985-988.
YAN Yong,GUO Yuan,PENG Meng-jiao,et al. Synthesis of hydroxytyrosol[J]. Fine Chemicals,2012,29(10):985-988.
- [28]许超,高俊超,张坚,等. 羟基酪醇合成工艺研究[J]. 精细化工,2012,27(12):1209-1212.
XU Chao,GAO Jun-chao,ZHANG Jian,et al. Process research of hydroxytyrosol synthesis[J]. Fine Chemicals,2012,27(12):1209-1212.
- [29]ZHANG Zhao-li,CHEN Jing-lei,XU Qiong-ming,et al. Efficient synthesis of hydroxytyrosol from 3,4-dihydroxybenzaldehyde[J]. Synthetic Communications,2012,42(6):794-798.
- [30]BRIANTE R,CARA F L,TONZIELLO M P,et al. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic β -glycosidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2001,49(7):3198-3203.

- [31] BRIANTE R, PATUMI M, FEBBRAIO F, et al. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 111(1): 67–77.
- [32] ESPIN J C, SOLAR-RIVAS C, CANTOS E, et al. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3): 1187–1193.
- [33] SANTOS M M, PICCIRILLO C, CASTRO P M L, et al. Bioconversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(6): 2435–2440.
- [34] ALLOUCHE N, DAMAK M, ELLOUZ R, et al. Use of Whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2105–2109.
- [35] ALLOUCHE N, SAYADI S. Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(16): 6525–6530.
- [36] BOUALLAGUI Z, SAYADI S. Production of high hydroxytyrosol yields via tyrosol conversion by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized resting cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9906–9911.
- [37] BROOKS S J, DOYLE E M, O'CONNOR K E. Tyrosol to hydroxytyrosol biotransformation by immobilized cell extracts of *Pseudomonas putida* F6[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 191–196.
- [38] SATOH Y, TAJIMA K, MUNEKATA M, et al. Engineering of *L*-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(6): 603–610.
- [39] ORENES-PIÑERO E, GARCÍA-CARMONA F, SÁNCHEZ-FERRER Á. A new process for obtaining hydroxytyrosol using transformed *Escherichia coli* whole cells with phenol hydroxylase gene from *Geobacillus thermoglucosidarius*[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1/2/3/4): 377–383.
- [40] BROUK M, FISHMAN A. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 114–121.
- [41] HALAOULI S, ASTHER M, KRUS K, et al. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus species* with high potential for food technological applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(2): 332–343.
- [42] BOUZID O, NAVARRO D, ROCHE M, et al. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(5): 1855–1862.
- [43] KHOULFI S, HAMZA M, SAYADI S. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9050–9058.
- [44] PEREIRA-CARO G, MADRONA A, BRAVO L, et al. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 86–91.
- [45] MADRONA A, PEREIRA-CARO G, MATEOS R, et al. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters[J]. Molecules, 2009, 14(5): 1762–1772.
- [46] PEREIRA-CARO G, SARRIA B, MADRONA A, et al. Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(11): 5964–5976.
- [47] PEREIRA-CARO G, MATEOS R, TRAKA M H, et al. Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1172–1182.
- [48] MATEOS R, PEREIRA-CARO G, BACON J R, et al. Anticancer activity of olive oil hydroxytyrosyl acetate in human adenocarcinoma Caco-2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(13): 3264–3269.
- [49] PROCOPIO A, CELIA C, NARDI M, et al. Lipophilic hydroxytyrosol esters: Fatty acid conjugates for potential topical administration[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(11): 2377–2381.
- [50] BOUALLAGUI Z, BOUAZIZ M, LASSOUED S, et al. Hydroxytyrosol acyl esters: Biosynthesis and activities[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(5): 592–599.
- [51] BERNINI R, MINCIONE E, BARONTINI M, et al. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(19): 8897–8904.
- [52] BERNINI R, CRISANTE F, BARONTINI M, et al. Synthesis and structure/antioxidant activity relationship of novel catecholic antioxidant structural analogues to hydroxytyrosol and its lipophilic esters[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(30): 7408–7416.
- [53] REZAEI-SADABADY R, ZARGHAMI N, BARZEGAR A, et al. Studies of the relationship between structure and antioxidant activity in interesting systems, including tyrosol, hydroxytyrosol derivatives indicated by quantum chemical calculations[J]. Soft, 2013, 2(3): 13–18.
- [54] TRINCONE A, PAGNOTTA E, TRAMICE A. Enzymatic routes for the production of mono- and di-glucosylated derivatives of hydroxytyrosol[J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 79–83.