

低温化学法合成 β -谷甾醇亚麻酸酯

王晓萍, 刘伟, 陈竞男

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州450001)

摘要:在无溶剂条件下利用酸性催化剂4-十二烷基苯磺酸(DBSA)催化 β -谷甾醇与亚麻酸酯化合成 β -谷甾醇亚麻酸酯,通过单因素试验和响应面法优化了酯化反应条件,并采用红外光谱对产物结构进行了表征。结果表明,最佳酯化反应条件为反应温度76℃,反应时间12 h,醇酸摩尔比1:1.7, DBSA用量16%。在最佳条件下, β -谷甾醇转化率高达97.55%。红外光谱测试结果表明目标产物成功合成,实现了低温化学法合成 β -谷甾醇亚麻酸酯。

关键词: β -谷甾醇; 亚麻酸; 植物甾醇酯; 酯化; 4-十二烷基苯磺酸

中图分类号:TQ645.6; O643.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)12-0099-05

Chemical synthesis of β -sitosterol linolenic acid esters at low temperature

WANG Xiaoping, LIU Wei, CHEN Jingnan

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: An acid catalyst 4-dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA) was used to catalyze the esterification of β -sitosterol and linolenic acid to synthesize β -sitosterol linolenic acid esters under solvent free conditions. The optimal reaction conditions were optimized by single factor experiment and response surface methodology. The results showed the optimal reaction conditions were obtained as follows: reaction temperature 76℃, reaction time 12 h, molar ratio of β -sitosterol to fatty acid 1:1.7 and DBSA dosage 16%. Under the optimal conditions, the conversion rate of β -sitosterol was up to 97.55%. The infrared spectroscopy test showed that the target product was successfully synthesized, and the synthesis of β -sitosterol linolenic acid esters at low temperature was feasible.

Key words: β -sitosterol; linolenic acid; phytosterol ester; esterification; 4-dodecylbenzenesulfonic acid

植物甾醇是一种重要的天然活性物质,广泛分布于多种蔬菜、水果、谷物、坚果等植物性食物中,工业上主要来源于油脂精炼加工副产物——油脂脱臭馏出物^[1-2]。自然界中植物甾醇种类繁多,常见的为 β -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇和菜籽甾醇,其中 β -谷甾醇是最主要的植物甾醇单体,一般占50%以上,有的高达90%以上^[3]。 β -谷甾醇具有降低胆固醇、预防心血管疾病、抗炎、抗氧化、免疫调节等重要生理功能和营养价值^[4-6]。

游离态植物甾醇脂溶性和水溶性均较差,限制了其在食品、医药、化工等领域的应用^[7],而将植物甾醇与脂肪酸进行酯化合成植物甾醇酯是提高植物甾醇脂溶性的有效手段^[8]。与植物甾醇结合的脂肪酸种类会影响植物甾醇酯的溶解性与活性。Yang等^[9]使用酸性离子液体催化合成的月桂酸植物甾醇酯在葵花籽油中溶解度为4.28 g/100 mL,而相同条件下植物甾醇的溶解度仅为1.51 g/100 mL,脂溶性提高至近3倍。Zheng等^[10]采用脂肪酶催化合成了亚麻酸植物甾醇酯,其在油中溶解度达到35.8 g/100 mL,与植物甾醇相比,脂溶性提高了约20倍。与饱和脂肪酸植物甾醇酯相比,不饱和脂肪酸植物甾醇酯具有更显著的降胆固醇作用^[11]。同时,亚麻酸也是一种人体必需脂肪酸,在降血脂、抗血栓、抗癌、抗炎等方面都具有重要作用。因此,将 β -谷甾醇与亚麻酸进行酯化,可以充分发挥 β -谷甾醇与

收稿日期:2021-01-28;修回日期:2021-07-11

基金项目:河南省科技攻关项目(192102110211)

作者简介:王晓萍(1995),女,硕士研究生,研究方向为油脂化学与精深加工(E-mail)1172884404@qq.com。

通信作者:刘伟,教授,硕士生导师(E-mail)liuwei820307@126.com。

亚麻酸的生理功能,得到高价值的植物甾醇酯。

植物甾醇酯的合成方法主要有酶法和化学法。其中:酶法具有反应条件温和、副反应较少等优点,但酶制剂成本高、反应时间长,目前仍处于实验室研究阶段^[12-13];化学法常以强酸或强碱为催化剂,虽然生产操作简单、酯化率高,但存在反应过程需高温、副反应多、腐蚀性强、严重污染环境等问题。Meng 等^[14]在 170 °C 下用 H₂SO₄ 催化油酸与植物甾醇直接酯化,植物甾醇的转化率达到 98.2%,然而反应副产物达到 29.7%。值得注意的是,亚麻酸的氧化稳定性与热稳定性差,在高温加热和空气条件下极易氧化。因此,亟须开发出一种能在温和条件下 (<80 °C) 下高效制备植物甾醇亚麻酸酯的工艺。

4-十二烷基苯磺酸(DBSA)是一种具有布朗斯特酸性的表面活性剂,已在一些研究中作为催化剂用于实现水相酯化反应。Manabe 等^[15]以 DBSA 为催化剂,在水中催化月桂酸与 3-苯基-1-丙醇的酯化反应,在 40 °C 时产率可以达到 84%,同时发现在反应过程中体系会形成 O/W 型乳状液,从而将产物与水分离,避免了水解逆反应的发生。基于此,本研究以 DBSA 为催化剂,实现低温催化 β -谷甾醇和亚麻酸进行酯化反应合成 β -谷甾醇亚麻酸酯,并对其合成工艺进行优化,以期为植物甾醇酯的绿色高效合成提供理论和技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

β -谷甾醇(95%),上海源叶生物技术有限公司;4-十二烷基苯磺酸($\geq 95\%$),西格玛奥德里奇化学有限公司;硫酸氢钠(NaHSO₄)、硫酸(H₂SO₄)、甲基磺酸(CH₃SO₃H),麦克林生化科技有限公司;亚麻酸(>70%),梯希爱(TCI)化成工业发展有限公司;对甲苯磺酸(PTSA),阿拉丁生化科技股份有限公司;正己烷(色谱纯),赛默飞世尔科技有限公司。

Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2487 紫外检测器,美国 Waters 公司;RCT 恒温磁力搅拌器,IKA(广州)仪器设备有限公司;傅里叶红外光谱仪,布鲁克(北京)科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 β -谷甾醇亚麻酸酯的合成

将 β -谷甾醇、亚麻酸、催化剂和磁子依次加到反应管中,放入设定好温度的磁力加热搅拌器中反应一定时间以合成 β -谷甾醇亚麻酸酯。

1.2.2 β -谷甾醇转化率的计算

1.2.2.1 标准曲线的绘制

准确称取 β -谷甾醇标准品,用正己烷溶解定

容到 50 mL 容量瓶中,配制 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 β -谷甾醇标准储备液,逐级稀释得到 500、200、100、50、20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同质量浓度梯度的系列标准工作溶液。取系列标准工作溶液进行 HPLC 分析,以 β -谷甾醇质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到标准曲线线性回归方程,根据线性回归方程的相关系数(R^2)判断拟合效果,相关系数大于 0.999 即可使用。

1.2.2.2 HPLC 分析条件

硅胶色谱柱(5 $\mu\text{m} \times 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$);柱温 30 °C;流速 0.8 mL/min;进样量 10 μL ;流动相 A 为正己烷-异丙醇(体积比 20:1),流动相 B 为正己烷;紫外检测波长 210 nm。

1.2.2.3 样品分析及 β -谷甾醇转化率的计算

称取一定质量 1.2.1 合成产物于 5 mL 容量瓶中,摇匀后定容,进行 HPLC 分析,并根据标准曲线回归方程计算样液中 β -谷甾醇的质量。按式(1)计算 β -谷甾醇转化率。

$$Y = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y 为 β -谷甾醇转化率; m_1 为反应前 β -谷甾醇质量; m_2 为反应后 β -谷甾醇质量。

1.2.3 TLC 分析 β -谷甾醇与 β -谷甾醇亚麻酸酯

用点样针取样品稀释液在预制的硅胶薄层板上点样,采用正己烷-乙醚-冰乙酸(体积比 90:10:1)作为展开剂对其进行展开,展开结束后,碘蒸气显色。

1.2.4 β -谷甾醇亚麻酸酯的分离纯化

将 1.2.1 反应后的混合物使用正己烷溶解,通过柱层析对反应产物进行分离纯化。分离条件:选用 100~200 目的硅胶,柱长 30 cm。洗脱剂为正己烷-乙醚-冰乙酸(体积比 90:10:1)。用薄层色谱法(TLC)检测分离的产物,以确定目标产物的收集段。将收集的目标产物减压旋蒸除去溶剂,即得到纯化 β -谷甾醇亚麻酸酯产品。

1.2.5 红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱仪,全反射光谱测定法(ATR)对纯化的 β -谷甾醇亚麻酸酯进行分析。分析条件:扫描范围 400~4 000 cm^{-1} ,扫描次数 32^[16]。

1.2.6 数据处理

采用 Origin 8.5 对试验数据进行处理,结合 SPSS 数据处理软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 β -谷甾醇亚麻酸酯合成单因素试验

2.1.1 催化剂种类对 β -谷甾醇转化率的影响

在反应温度 70 °C、反应时间 12 h、 β -谷甾醇与亚麻酸摩尔比(简称醇酸摩尔比,下同)1:1.5、催化剂

用量为 β -谷甾醇物质的量10%的条件下,研究 H_2SO_4 、PTSA、 $NaHSO_4$ 、 CH_3SO_3H 和DBSA 5种酸性催化剂对 β -谷甾醇转化率的影响,结果如图1所示。

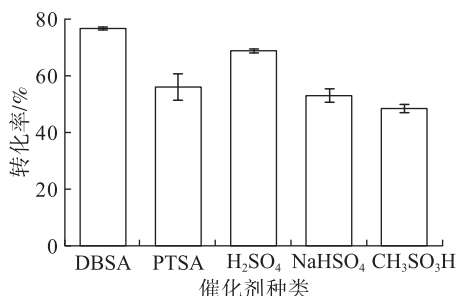
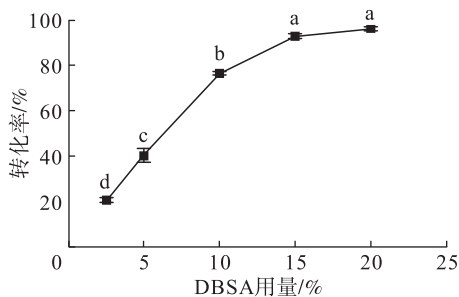


图1 催化剂种类对 β -谷甾醇转化率的影响

由图1可知,DBSA为催化剂时, β -谷甾醇的转化率最高,达到76.50%。这可能是因为DBSA、底物和酯化反应过程中产生的水形成了乳状液,将反应生成的水隔离,促使反应向正反应方向进行^[15],从而提高了 β -谷甾醇转化率,这也是使用DBSA作催化剂时不需要额外加入干燥剂(如分子筛)的原因。当 H_2SO_4 为催化剂时, β -谷甾醇的转化率也较高,达到68.54%;然而 H_2SO_4 具有强酸性和强腐蚀性,使得副反应增多,并且腐蚀设备。因此,选择DBSA为最适催化剂。

2.1.2 DBSA用量对 β -谷甾醇转化率的影响

在反应温度70℃、反应时间12h、醇酸摩尔比1:1.5的条件下,考察催化剂DBSA用量(以 β -谷甾醇物质的量为基准)对 β -谷甾醇转化率的影响,结果如图2所示。



注:图中不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同

图2 DBSA用量对 β -谷甾醇转化率的影响

由图2可知:DBSA用量从2.5%增加到10%时, β -谷甾醇转化率大幅度上升,由20.45%提高到76.50%,说明适当提高DBSA用量可以明显提高 β -谷甾醇转化率;当DBSA用量为15%时, β -谷甾醇转化率达到最大,为92.83%;随着DBSA用量的继续增加, β -谷甾醇转化率基本不变。Deng等^[11]以 $NaHSO_4$ 为催化剂合成亚麻酸植物甾醇酯,在130℃下反应8h甾醇转化率达到96%,然而催化剂用量高达38%(以甾醇物质的量为基准)。与

之相比,选择DBSA作为催化剂催化合成甾醇酯在实际生产中具有较高的应用价值。因此,选择15%为最佳DBSA用量。

2.1.3 反应温度对 β -谷甾醇转化率的影响

在DBSA用量15%、反应时间12h、醇酸摩尔比1:1.5的条件下,考察反应温度对 β -谷甾醇转化率的影响,结果如图3所示。

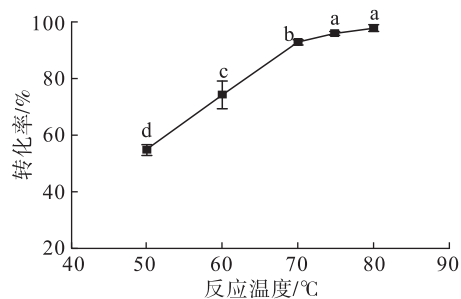


图3 反应温度对 β -谷甾醇转化率的影响

由图3可知:DBSA在50℃仍然具有较高的催化活性;在50~70℃时, β -谷甾醇转化率随着反应温度的升高呈直线上升趋势,说明当反应温度低于70℃时,温度对反应速率影响较大;继续升高反应温度, β -谷甾醇转化率增长缓慢,在75℃时达到最大;反应温度继续升高至80℃, β -谷甾醇转化率与75℃时无显著差异。因此,选择最适反应温度为75℃。

2.1.4 醇酸摩尔比对 β -谷甾醇转化率的影响

酯化反应是典型的可逆反应,提高其中一种反应物的用量可以促使反应向酯化方向移动,从而提高反应转化率。由于脂肪酸价格相对低廉,而且在反应后更容易分离回收,所以选择脂肪酸适当过量来促进植物甾醇酯的合成。在反应温度75℃、反应时间12h、DBSA用量15%的条件下,考察醇酸摩尔比对 β -谷甾醇转化率的影响,结果如图4所示。

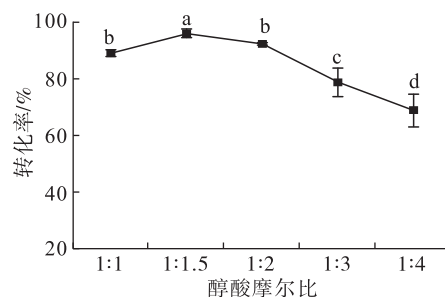


图4 醇酸摩尔比对 β -谷甾醇转化率的影响

由图4可知:当醇酸摩尔比从1:1增加到1:1.5时, β -谷甾醇转化率由89.06%提高到95.95%;当醇酸摩尔比继续增加, β -谷甾醇转化率呈线性下降趋势。这是因为过量的亚麻酸会稀释催化剂的浓度,从而降低反应速率。在实际生产中亚麻酸过量太多不利于甾醇酯的分离纯化^[17],同时也会增加生

产成本。因此,选择 1:1.5 为最佳醇酸摩尔比。

2.1.5 反应时间对 β -谷甾醇转化率的影响

在反应温度 75 °C、醇酸摩尔比 1:1.5、DBSA 用量 15% 的条件下,考察反应时间对 β -谷甾醇转化率的影响,结果如图 5 所示。

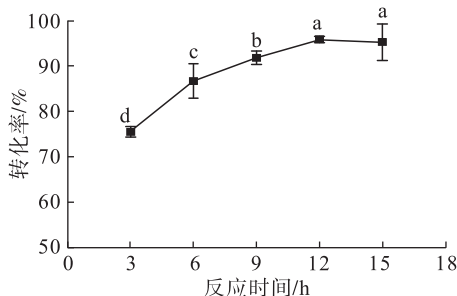


图 5 反应时间对 β -谷甾醇转化率的影响

由图 5 可知:反应初期反应速率较快, β -谷甾醇转化率在反应 3 h 时可达 75.66%;随着反应时间的继续延长, β -谷甾醇转化率缓慢提高,在反应 12 h 时 β -谷甾醇转化率达到最高,为 95.95%;继续延长反应时间至 15 h, β -谷甾醇转化率与 12 h 时无显著差异,表明酯化反应趋于平衡。因此,选择 12 h 为最佳反应时间。

2.2 β -谷甾醇亚麻酸酯合成响应面优化试验

根据单因素试验结果,以反应温度(A)、DBSA 用量(B)、醇酸摩尔比(C)、反应时间(D)为因素,以 β -谷甾醇转化率(Y)为指标,利用统计软件 Design-Expert 10 进行响应面试验设计和数据分析。响应面因素与水平见表 1,响应面试验设计及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 响应面因素与水平

水平	A/°C	B/%	C	D/h
-1	60	10	1:1	9
0	70	15	1:1.5	12
1	80	20	1:2	15

表 2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	Y/%
1	0	0	1	-1	90.5
2	0	0	-1	1	88.2
3	-1	0	0	-1	59.0
4	1	0	1	0	77.1
5	0	0	0	0	80.9
6	-1	-1	0	0	80.6
7	0	0	0	0	71.8
8	0	0	0	0	80.9
9	0	0	0	0	80.6
10	0	0	-1	-1	71.8
11	0	-1	1	0	46.1

续表 2

试验号	A	B	C	D	Y/%
12	-1	0	0	1	64.4
13	1	-1	0	0	67.4
14	0	1	1	0	88.9
15	-1	1	0	0	85.6
16	0	0	0	0	78.3
17	0	1	0	1	94.6
18	0	1	0	-1	90.5
19	0	1	-1	0	90.4
20	-1	0	1	0	65.9
21	1	0	0	-1	92.1
22	1	1	0	0	98.1
23	0	-1	0	-1	52.0
24	1	0	0	1	94.5
25	0	-1	-1	0	69.6
26	0	-1	0	1	56.9
27	-1	0	-1	0	66.7
28	0	0	1	1	75.0
29	1	0	-1	0	93.9

表 3 方差分析

来源	总平方和	自由度	均方	F	P
模型	5 460.51	14	390.04	11.42	<0.000 1
A	1 643.95	1	1 643.95	48.15	<0.000 1
B	3 235.76	1	3 235.76	94.77	<0.000 1
C	328.23	1	328.23	16.74	0.036 0
D	264.52	1	264.52	13.15	0.048 7
AB	76.65	1	76.65	3.91	0.068 0
AC	346.29	1	346.29	17.46	0.016 2
AD	0.48	1	0.48	0.025	0.877 5
BC	3.67	1	3.67	0.19	0.672 0
BD	26.94	1	26.94	1.37	0.260 7
CD	7.65	1	7.65	0.39	0.542 4
A ²	0.24	1	0.24	0.002	0.933 6
B ²	103.40	1	103.40	3.03	0.103 7
C ²	40.72	1	40.72	1.19	0.293 2
D ²	108.21	1	108.21	3.17	0.096 7
残差	478.00	14	34.14		
失拟项	403.41	10	40.34	2.16	0.237 8
绝对偏差	74.59	4	18.65		
总和	5 938.92	28			

对表 2 中试验数据进行拟合,得到 β -谷甾醇转化率的二次多项式回归方程: $Y = 81.03 + 11.70A + 16.42B - 3.12C + 2.99D + 1.04AB - 0.67AC - 1.92AD + 5.50BC - 0.20BD - 1.36CD + 0.19A^2 - 3.99B^2 - 2.51C^2 - 4.08D^2$ 。

由表 3 可知,模型极显著($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),说明模型可以很好地预测 β -谷甾醇

醇转化率,具有实际应用意义。反应温度、DBSA用量、醇酸摩尔比、反应时间对 β -谷甾醇转化率影响均显著,且对 β -谷甾醇转化率影响的主次顺序为DBSA用量>反应温度>醇酸摩尔比>反应时间。

由拟合方程得到响应面试验的最佳条件为反应温度76.33℃、DBSA用量15.74%、 β -谷甾醇与亚麻酸摩尔比1:1.66、反应时间12.36 h,在此条件下 β -谷甾醇转化率预测值为98.35%。结合实际条件,选择反应温度76℃、DBSA用量16%、 β -谷甾醇与亚麻酸摩尔比1:1.7、反应时间12 h进行验证试验,得到 β -谷甾醇转化率为97.55%。试验值与预测值相近,表明响应面试验优化得到的方案可靠。

2.3 β -谷甾醇亚麻酸酯的表征

按1.2.1方法在最佳条件下得到合成产物,采用1.2.4方法纯化,可得到纯度为95.36%的 β -谷甾醇亚麻酸酯。采用红外光谱法对纯化 β -谷甾醇亚麻酸酯结构进行表征,结果如图6所示。

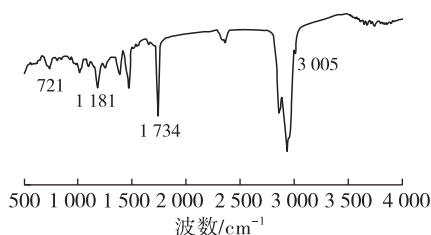


图6 β -谷甾醇亚麻酸酯的红外光谱图

由图6可知:1734 cm^{-1} 和1181 cm^{-1} 处的吸收峰分别为C=O和C—O—C的伸缩振动引起的特征峰,代表存在酯基;在3005 cm^{-1} 处的吸收峰是—C=C—H中C—H的特征吸收峰;721 cm^{-1} 处的弱吸收峰表明存在4个或更多的 CH_2 基团,表明合成的产物为 β -谷甾醇亚麻酸酯。

3 结论

本文研究了无溶剂体系下酸性催化剂催化亚麻酸和 β -谷甾醇酯化反应合成 β -谷甾醇亚麻酸酯的工艺条件。通过单因素试验和响应面优化得到酯化反应的最佳条件为:DBSA为催化剂,反应温度76℃,DBSA用量16%,醇酸摩尔比1:1.7,反应时间12 h。在最佳条件下, β -谷甾醇转化率高达97.55%。通过红外光谱表征验证了目标产物的分子结构,实现了低温化学法合成 β -谷甾醇亚麻酸酯。

参考文献:

[1] KLINGBERG S, ANDERSSON H, MULLIGAN A, et al. Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2008, 62(6):695-703.
[2] 郑淑敏. 玉米油精炼过程中游离甾醇和甾醇酯含量变化研究[D]. 郑州:河南工业大学,2016.

[3] 韩军花,胡叶梅,王雷,等. 我国保健食品常用植物资源中植物甾醇含量研究[J]. *营养学报*, 2010, 32(1):82-85.
[4] CHAWLA R, SIVAKUMAR S, GOEL N. Phytosterol and its esters as novel food ingredients: a review[J]. *Asian J Dairy Food Res*, 2016, 35(3):217-226.
[5] BRADGORD P G, AWAD A B. Phytosterols as anticancer compounds[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51:161-170.
[6] 吴时敏,吴谋成,马莉. 植物甾醇在菜籽高级烹调油中的抗氧化作用(I):常温下抗氧化作用的研究[J]. *中国油脂*, 2003, 28(4):52-54.
[7] 毛勇. 棕榈酸植物甾醇酯的酶法合成、分离纯化与性质研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.
[8] 何文森. 植物甾醇的改性研究进展[J]. *中国油脂*, 2015, 40(11):85-90.
[9] YANG Y B, HE W S, JIA C S, et al. Efficient synthesis of phytosterol esters using the Lewis acidic ionic liquid[J]. *J Mol Catal A Chem*, 2012, 357:39-43.
[10] ZHENG M M, LU Y, HUANG F H, et al. Lipase immobilization on hyper-cross-linked polymer-coated silica for biocatalytic synthesis of phytosterol esters with controllable fatty acid composition [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(1):231-237.
[11] DENG Q C, ZHANG P, HUANG Q D, et al. Chemical synthesis of phytosterol esters of polyunsaturated fatty acids with ideal oxidative stability [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011, 113(4):441-449.
[12] 赵岩,唐国胜,侯莹莹,等. 植物甾醇酯合成工艺研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(2):585-590.
[13] KIM B H, AKOH C C. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosterol esters of oleic acid by response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1):336-342.
[14] MENG X, PAN Q, YANG T. Synthesis of phytosterol esters by using alumina-supported zinc oxide ($\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$) from esterification production of phytosterol with fatty acid [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2011, 88(1):143-149.
[15] MANABE K, IIMURA S, SUN X M, et al. Dehydration reactions in water. Brønsted acid-surfactant-combined catalyst for ester, ether, thioether, and dithioacetal formation in water [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2002, 124(40):11971-11978.
[16] HE W S, HU D, WANG Y, et al. A novel chemoenzymatic synthesis of hydrophilic phytosterol derivatives [J]. *Food Chem*, 2016, 192:557-565.
[17] 陈茂彬,黄琴. 植物甾醇硬脂酸酯的合成研究[J]. *湖北工业大学学报*, 2005, 20(1):1-3.