

# 离子液体 – 甲苯溶剂体系中酶催化 合成阿魏酰丁酸酯

杨宏黎<sup>1,3</sup>, 窦义莲<sup>1</sup>, 韩琳娜<sup>1</sup>, 肖志刚<sup>1,3</sup>, 阮有志<sup>1</sup>, 韩旭<sup>2</sup>

(1. 沈阳师范大学粮食学院, 沈阳 110034; 2. 朝阳师范高等专科学校生化工程系, 辽宁朝阳 122000;

3. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150038)

**摘要:**以三丁酸甘油酯和阿魏酸乙酯为原料, 采用酶催化方法合成阿魏酰丁酸酯, 通过单因素实验和正交实验研究溶剂体系、脂肪酶种类、溶剂配比、底物(三丁酸甘油酯与阿魏酸乙酯)摩尔比、反应温度、反应时间对阿魏酰丁酸酯转化率的影响, 优化反应条件。结果表明: 合成阿魏酰丁酸酯的最佳反应条件为脂肪酶 Novozym 435 为催化剂, 酶添加量 50 mg/mL, [EMIM][TF<sub>2</sub>N] – 甲苯溶剂体系, [EMIM][TF<sub>2</sub>N] 与甲苯质量体积比 1:1, 反应温度 50 °C, 底物摩尔比 3:1, 反应时间 6 d。在最佳反应条件下, 阿魏酰丁酸酯转化率达 76.24%。

**关键词:**阿魏酰丁酸酯; 离子液体; 酶催化; 阿魏酸乙酯; 三丁酸甘油酯

中图分类号: TQ245; R285

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)09-0030-04

## Enzyme catalysis synthesis of ferulyl butyrate in ionic liquid – toluene solvent system

YANG Hongli<sup>1,3</sup>, DOU Yilian<sup>1</sup>, HAN Linna<sup>1</sup>, XIAO Zhigang<sup>1,3</sup>,  
RUAN Youzhi<sup>1</sup>, HAN Xu<sup>2</sup>

(1. College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China;

2. Department of Biochemical Engineering, Chaoyang Teachers College, Chaoyang 122000,

Liaoning, China; 3. College of Food Science, Northeast Agricultural University,

Harbin 150038, China)

**Abstract:** Ferulyl butyrate was synthesized by enzyme catalysis with glyceryl tributyrates and ethyl ferulate as raw materials. The influences of solvent system, lipase type, solvent ratio, molar ratio of substrate (molar ratio of glyceryl tributyrates to ethyl ferulate), reaction temperature and reaction time on the conversion rate of ferulyl butyrate were studied. The results showed that the optimal preparation conditions were obtained as follows: lipase Novozym 435 as catalyst, lipase dosage 50 mg/mL, [EMIM][TF<sub>2</sub>N] – toluene as solvent system, ratio of [EMIM][TF<sub>2</sub>N] mass to toluene volume 1:1, reaction temperature 50 °C, molar ratio of substrate 3:1 and reaction time 6 d. Under these conditions, the conversion rate of ferulyl butyrate was 76.24%.

**Key words:** ferulyl butyrate; ionic liquid; enzyme catalysis; ethyl ferulate; glyceryl tributyrates

收稿日期: 2020-03-29; 修回日期: 2020-05-25

基金项目: 博士后面基金(2017M611343); 辽宁省教育厅一般项目(L201609); 沈阳师范大学创新创业项目(201910166243); 农业攻关及产业化指导计划(2019JH8/10200020)

作者简介: 杨宏黎(1982), 女, 讲师, 博士, 主要从事油脂改性方面的科研及教学工作(E-mail) yanghongli1982@qq.com.

通信作者: 韩旭, 讲师, 硕士(E-mail) 231767504@qq.com.

阿魏酸是广泛存在于多种植物中的一种酚酸, 其中在中药原料如阿魏、当归等植物的叶、茎、根中含量较高, 同时在食品原料如米糠和麦麸中含量也较高<sup>[1-3]</sup>。阿魏酸是一种天然的抗氧化剂, 同时还具有清除自由基、保护细胞、抑制血栓素释放、抗癌、抗菌消炎等功能。但由于阿魏酸在油相和水相体系中的溶解度都较低, 很难渗透进

入生物膜细胞膜发挥其功能,因此阿魏酸衍生物的制备得到广泛关注。

三丁酸甘油酯是一种无色油状的短链脂肪酸,广泛存在于药物中,具有低黏度、低熔点、低热量的功能特性。此外,在药理学及营养学方面,三丁酸甘油酯已被证实具有修复小肠绒毛,抑制肠道有害菌的功效,并且对多种癌细胞如前列腺癌、乳腺癌等细胞增殖具有抑制作用<sup>[4-5]</sup>。

将阿魏酸分子结合至三丁酸甘油酯可有效改善其脂溶性和水溶性。由于阿魏酸为热敏性物质,生物催化以其反应条件温和、副产物少、可降低对底物的损害等优点<sup>[6-9]</sup>,被广泛应用于阿魏酸衍生物的制备。

本课题前期研究中以甲苯为反应介质合成阿魏酰丁酸酯,但甲苯具有毒性。被称为“绿色溶剂”的离子液体,具有蒸气压低、热稳定性强、环境友好等优点。离子液体作为环境友好溶剂替代传统挥发性有机溶剂具有广阔前景。因此,本实验在前期研究基础上,探究了在离子液体-甲苯溶剂体系中酶催化合成阿魏酰丁酸酯工艺,研究了各因素对阿魏酰丁酸酯转化率的影响,优化了反应条件,以期为阿魏酰丁酸酯的工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

阿魏酸乙酯(EF,纯度>99%),购自苏州常通化学有限公司;三丁酸甘油酯(TB,纯度>95%),购

自阿拉丁试剂有限公司;3 Å 分子筛,购自上海环球分子筛有限公司;固定化脂肪酶 Novozym 435 和 Lipozyme TL IM,购自诺维信公司上海分公司;甲苯、丙酮、甲醇、冰醋酸、乙腈、乙醇,分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;[EMIM][TF<sub>2</sub>N],[OMIM][PF<sub>6</sub>],[HMIM][BF<sub>4</sub>],[BMIM][PF<sub>6</sub>],[BMIM][BF<sub>4</sub>]等离子液体均购自西格玛(上海)贸易有限公司。

JD2000-2L型电子分析天平,沈阳龙腾电子有限公司;气浴摇床,顺华仪器股份有限公司;SH23-2恒温磁力搅拌器,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;LC1200高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;TKRE-1000A旋转蒸发器,天津市天科玻璃仪器制造有限公司;JW-1042型低速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 阿魏酰丁酸酯的制备

取2 mL甲苯,按一定溶剂配比滴加离子液体。将溶剂置于反应容器中形成稳定的溶剂体系,加入反应的原料三丁酸甘油酯与阿魏酸乙酯,之后再加入一定量的脂肪酶催化反应的进行,在一定温度下空气浴振荡反应一段时间。反应体系在加酶前用分子筛(50 mg/mL)除水48 h。反应后过滤除去脂肪酶和分子筛,剩余混合物通过柱层析(硅胶柱,层析液体为正己烷-甲醇)分离纯化。脂肪酶催化阿魏酸乙酯与三丁酸甘油酯酯化反应原理见图1。

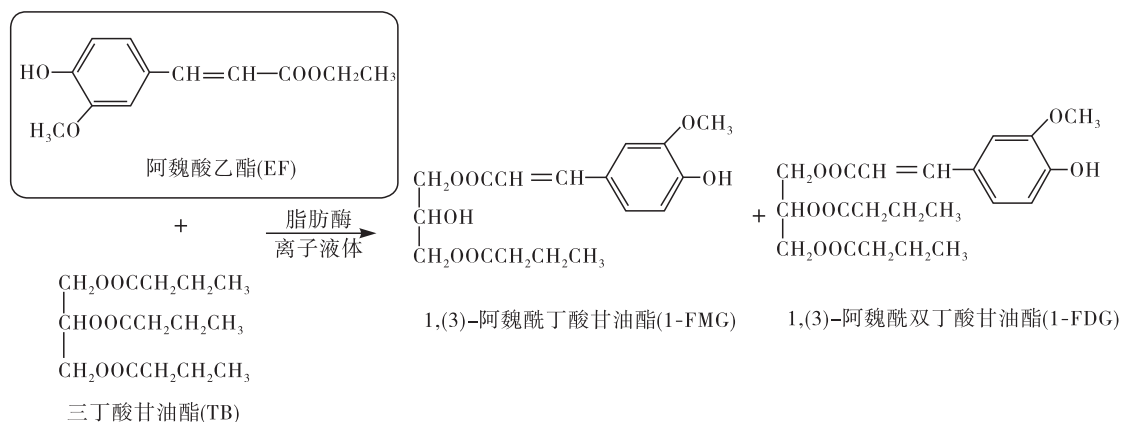


图1 脂肪酶催化阿魏酸乙酯与三丁酸甘油酯酯化反应原理

#### 1.2.2 阿魏酰丁酸酯转化率的测定

采用高效液相色谱法对阿魏酰丁酸酯转化率进行测定。液相色谱条件:ZorbaxODS-C18色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);UV/DAD检测器;柱温30℃;流动相由冰醋酸-水(体积比3:100,A)和乙腈(B)组成,洗脱程序为0~10 min,B由10%升至70%,10~20 min,B维持在70%,20~20.5 min,B

由70%降至10%;流速1 mL/min;检测波长325 nm;进样量10 μL。

阿魏酰丁酸酯转化率=(1,(3)-阿魏酰丁酸甘油酯峰面积+1,(3)-阿魏酰双丁酸甘油酯峰面积)/总峰面积×100%。

#### 1.2.3 数据处理

采用SPSS18.0和Origin 8.5软件进行数据处

理和分析;  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。每组实验重复进行 3 次, 取平均值。实验数据以“平均值  $\pm$  标准偏差”表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 溶剂体系对转化率的影响

前期对有机溶剂的筛选中发现, 甲苯既可以溶解阿魏酸乙酯又可以溶解三丁酸甘油酯而成为该反应的反应介质。但甲苯具有一定的毒性, 将誉为“绿色溶剂”的离子液体引入化学反应, 可有效降低反应的毒性。由此, 对离子液体-甲苯溶剂体系进行了筛选, 考察溶剂体系对阿魏酰丁酸酯转化率的影响, 结果见表 1。

表 1 溶剂体系对阿魏酰丁酸酯转化率的影响

溶剂体系	转化率/%
甲苯	$54.35 \pm 1.32$
[EMIM][TF <sub>2</sub> N]-甲苯	$63.26 \pm 1.02$
[OMIM][PF <sub>6</sub> ]-甲苯	$45.35 \pm 0.95$
[HMIM][BF <sub>4</sub> ]-甲苯	-(酶在下方)
[BMIM][PF <sub>6</sub> ]-甲苯	-(酶在中间)
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]-甲苯	-(酶在上方)

注: 脂肪酶 Novozym 435, 底物(三丁酸甘油酯与阿魏酸乙酯)摩尔比 5:1, 酶添加量 50 mg/mL, 溶剂配比(离子液体与甲苯质量体积比, 下同)1:2, 反应温度 50 °C, 反应时间 5 d。

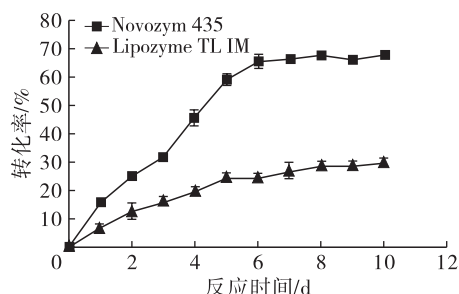
从表 1 可以看出, 不同溶剂体系下的阿魏酰丁酸酯转化率不同。由于离子液体具有一定的黏度, 作为反应介质还需与甲苯同时使用, 以减小黏度。在 [HMIM][BF<sub>4</sub>]-甲苯、[BMIM][PF<sub>6</sub>]-甲苯和 [BMIM][BF<sub>4</sub>]-甲苯 3 种体系中, 没有产物的生成。可能是由于脂肪酶 Novozym 435 在以上离子液体中的存在状态不同, 不能发挥催化特性。在 [EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系中阿魏酰丁酸酯的转化率最高, 显著高于单独以甲苯为反应介质的。因此, 选取 [EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯为后续实验的反应介质。

#### 2.1.2 脂肪酶种类对转化率的影响

生物催化剂脂肪酶应用越来越广泛, 选择固定化脂肪酶 Lipozyme TL IM 和 Novozym 435 进行酯化反应, 考察脂肪酶种类对阿魏酰丁酸酯转化率的影响, 结果见图 2。

从图 2 可以看出, 两种脂肪酶均能催化阿魏酰丁酸酯的生成, 但是反应体系中两种酶的催化活性不同。随着反应时间的延长, 脂肪酶 Novozym 435 催化的反应, 在反应 6 d 时阿魏酰丁酸酯转化率达到 65.54%, 明显高于脂肪酶 Lipozyme TL IM 催化

的反应。因此, 选用 Novozym 435 进行后续研究。同时, 在反应 6 d 后, 阿魏酰丁酸酯转化率不再有显著提高, 因此选取反应时间为 6 d。

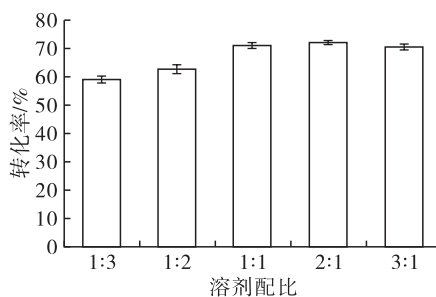


注: 底物摩尔比 5:1, 酶添加量 50 mg/mL, [EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系, 溶剂配比 1:2, 反应温度 50 °C。

图 2 脂肪酶种类对阿魏酰丁酸酯转化率的影响

#### 2.1.3 溶剂比对转化率的影响

甲苯和离子液体的配比不同, 对反应的影响也不同, 因此考察了不同溶剂比对阿魏酰丁酸酯转化率的影响, 结果见图 3。



注: 脂肪酶 Novozym 435, [EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系, 底物摩尔比 5:1, 酶添加量 50 mg/mL, 反应温度 50 °C, 反应时间 6 d。

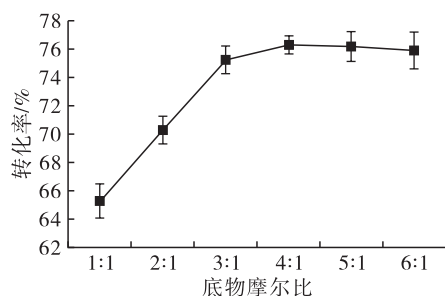
图 3 溶剂比对阿魏酰丁酸酯转化率的影响

从图 3 可以看出, 随着溶剂配比由 1:3 升至 1:1, 阿魏酰丁酸酯转化率由 59.24% 提高至 71.24%, 这可能是由于离子液体中的阴、阳离子可提高酶催化效率。但随着离子液体 [EMIM][TF<sub>2</sub>N] 占比继续增大, 阿魏酰丁酸酯转化率不再有明显升高, 这可能与离子液体的黏度有关, 离子液体的添加量增加, 反应体系的黏度增加, 降低了酶催化效率。因此, 选择溶剂配比为 1:1。

#### 2.1.4 底物摩尔比对转化率的影响

考察了不同的底物摩尔比对阿魏酰丁酸酯转化率的影响, 结果见图 4。

从图 4 可以看出: 随着底物摩尔比从 1:1 增加至 3:1, 阿魏酰丁酸酯转化率有很大的提高; 但当底物摩尔比由 3:1 升至 6:1 时, 阿魏酰丁酸酯转化率变化较小, 这可能是由于底物的量已趋于饱和。因此, 从经济成本角度考虑, 选择最佳底物摩尔比为 3:1。



注:脂肪酶 Novozym 435,酶添加量 50 mg/mL,[EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系,溶剂配比 1:2,反应温度 50℃,反应时间 6 d。

图4 底物摩尔比对阿魏酰丁酸酯转化率的影响

## 2.2 正交实验

在前期实验的基础上,在脂肪酶 Novozym 435 为催化剂、酶添加量 50 mg/mL,[EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系,[EMIM][TF<sub>2</sub>N]与甲苯质量体积比 1:1 条件下,以底物摩尔比、反应温度、反应时间为因素,以阿魏酰丁酸酯转化率为指标,进行三因素三水平正交实验。正交实验因素水平见表 2,正交实验设计及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 正交实验因素水平

水平	A 底物摩尔比	B 反应温度/℃	C 反应时间/d
1	2:1	50	5
2	3:1	60	6
3	4:1	70	7

表 3 正交实验设计及结果

实验号	A	B	C	空列	转化率/%
1	1	1	1	1	69.07
2	1	2	2	2	68.03
3	1	3	3	3	63.71
4	2	1	2	3	73.79
5	2	2	3	1	69.79
6	2	3	1	2	65.57
7	3	1	3	2	65.51
8	3	2	1	3	59.63
9	3	3	2	1	59.79
$k_1$	66.94	69.46	64.76	66.22	
$k_2$	69.72	65.82	67.20	66.37	
$k_3$	61.64	63.02	66.34	65.71	
R	8.08	6.44	2.44	0.66	

表 4 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	100.926	2	50.463	140.997	0.008 05**
B	62.440	2	31.220	87.231	0.018 89*
C	9.000	2	4.500	12.573	
误差	0.716	2	0.358		
总变异	173.316	8			

注:\*\* $P < 0.01$ ,差异极显著;\* $P < 0.05$ ,差异显著。

由表 2 和表 3 可知,各因素对阿魏酰丁酸酯转化率影响大小依次为  $A > B > C$ ,最佳工艺组合为  $A_2B_1C_2$ ,即底物摩尔比 3:1,反应温度 50℃,反应时间 6 d。在最佳条件下进行验证实验,阿魏酰丁酸酯的转化率为 76.24%。

## 3 结论

采用离子液体-甲苯溶剂体系酶法合成阿魏酰丁酸酯。通过单因素实验及正交实验得到阿魏酰丁酸酯的最佳合成工艺条件为:以脂肪酶 Novozym 435 为催化剂,酶添加量 50 mg/mL,[EMIM][TF<sub>2</sub>N]-甲苯溶剂体系,[EMIM][TF<sub>2</sub>N]与甲苯质量体积比 1:1,反应温度 50℃,底物摩尔比 3:1,反应时间 6 d。在最佳反应条件下,阿魏酰丁酸酯转化率为 76.24%。

## 参考文献:

- [1] 周文雅. 不同反应体系中酶催化阿魏酸乙酯与甘二酯酯交换反应规律的研究[D]. 郑州:河南工业大学, 2014.
- [2] 杨宏黎. 脂肪酶催化制备中碳链结构脂和阿魏酰结构磷脂[D]. 辽宁 大连:大连理工大学, 2014.
- [3] SHI Y G, WU, Y, LU X Y, et al. Lipase-catalyzed esterification of ferulic acid with lauryl alcohol in ionic liquids and antibacterial properties in vitro against three food-related bacteria[J]. Food Chem, 2017, 220: 249-256.
- [4] MAIER S, RECH E, MARTIN R, et al. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines[J]. Int J Cancer, 2000, 88: 245-251.
- [5] HEERDT B G, HOUSTON M A, ANTHONY G M, et al. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity [J]. Cancer Res, 1999, 59: 1584-1591.
- [6] 付晶晶. 双溶剂体系中脂肪酶催化合成蔗糖月桂酸酯的研究[D]. 南宁:广西大学, 2009.
- [7] PEI K H, OU J Y, HUANG C H, et al. Derivatives of ferulic acid: structure, preparation and biological activities [J]. Annu Res Rev Biol, 2015, 5: 512-528.
- [8] PAUL C E, FERNANDEZ V C. Biocatalysis and biotransformation in ionic liquid [M]//XU X B, GUO Z, CHENG L Z. Ionic liquids in lipid processing and analysis: opportunities and challenges. Champaign:AOCS Press, 2016:11-58.
- [9] KAKI S S, KUNDURU K R, KANJILAL S, et al. Synthesis and characterization of a novel phenolic lipid for used as potential lipophilic antioxidant and as a prodrug of butyric acid[J]. J Oleo Sci, 2015, 64(8):845-852.