

## 水相还原氢过氧化亚油酸制备羟基共轭亚油酸

施金金, 夏咏梅, 顾丹, 方云

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**开发了一种绿色、温和的合成羟基共轭酸的方法。以大豆脂肪氧合酶催化氧化亚油酸所得的氢过氧化亚油酸(LA-HPOD)为原料,用亚硫酸钠于水相还原氢过氧化亚油酸,得到羟基共轭亚油酸。分别通过添加乙醇作为辅溶剂以及用碳酸钠适度皂化氢过氧化亚油酸以便于增加氢过氧化亚油酸在水中的溶解度。考察了还原剂用量、温度、时间对氢过氧化亚油酸转化率的影响。0~40℃内,反应温度对氢过氧化亚油酸转化率无显著影响,醇-水体系所得的还原反应转化率与皂化体系的还原反应转化率接近,氢过氧化亚油酸的最高转化率达98.5%。

**关键词:**氢过氧化亚油酸;还原;羟基共轭亚油酸;大豆脂肪氧合酶;皂化

**中图分类号:**0643

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2008)04-0659-04

## Preparation of Hydroxyl Octadecadienoic Acid from Reduction of Hydroperoxy Octadecadienoic Acid in Aqueous Solution

SHI Jin-jin, XIA Yong-mei, GU Dan, FANG Yun

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** To develop a green and mild synthetic process of hydroxyl octadecadienoic acid, the reduction of hydroperoxy octadecadienoic acid with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  in aqueous solution to produce hydroxyl octadecadienoic acid was studied, using hydroperoxy octadecadienoic acid as the starting material that was prepared by oxidation of linoleic acid with soybean lipoxygenase as the catalyst. Two protocols were employed to enhance the solubility of the reactants and therefore to improve the product yield. Ethanol was used as the co-solvent, and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  was used to saponify hydroperoxy octadecadienoic acid partially. The reaction parameters were optimized. The conversion of hydroperoxy octadecadienoic acid obtained with both of the protocols were similar. The highest conversion of hydroperoxy octadecadienoic acid reached 98.5%.

**Key words:** Hydroperoxy octadecadienoic acid; Reduction; Hydroxyl octadecadienoic acid; Soybean lipoxygenase; Saponification

含共轭双键的羧酸如羟基共轭亚油酸能广泛用于药物、润滑油、乳化剂、增塑剂、涂料等方面。天然羧酸的生产不能满足工业需要,而当今羧酸的合成主要为化学法,也有的可用生物化学法制备<sup>[1-3]</sup>。化学合成法可从含羟基的化合物中引入羧基或含羧基的化合物中引入羟基,或同时引入羟基或羧基。主要方法有四种:卤代酸水解<sup>[4-5]</sup>、氰醇水解<sup>[6]</sup>、Reformatsky<sup>[7]</sup>反应、二异丙基氨基锂法。上述四种工艺常涉及高温、高压及强酸、强碱,生产成本低,同时又对环境造成危害。而羟基共轭酸的制备则更为复杂。

用大豆中广泛存在的大豆脂肪氧合酶为催化剂,可以很方便地通过亚油酸的空气氧化制备氢过氧化亚油酸<sup>[8-10]</sup>,而将氢过氧化亚油酸还原,则可

以得到相应的羟基共轭酸—羟基共轭亚油酸,这将大为提高生物技术等高新技术在大豆加工中的应用水平和大豆资源的高附加值利用,并促进羟基共轭酸的合成向绿色、温和发展。试验研究了水相氢过氧化亚油酸的还原及影响因素。由于氢过氧化亚油酸在水中的溶解度较低,因此考虑通过适当添加乙醇或者适度皂化氢过氧化亚油酸来增加氢过氧化亚油酸在水中的溶解度。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

大豆脂肪氧合酶 LOX (酶活  $8.61 \times 10^5 \text{ U} \cdot$

收稿日期:2008-03-24

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2004019);教育部新世纪优秀人才计划资助项目(NCET-05-0487)。

作者简介:施金金(1984-),女,硕士,研究方向为酶催化。

通讯作者:方云,教授,博士生导师。E-mail:yunfang@126.com。

mL<sup>-1</sup>, 自制); 亚油酸 (纯度 ≥96.0%, 自制); 过氧化氢异丙苯 (纯度 80%, Sigma); 2,6-叔-丁基-4-甲基酚(BHT)、无水亚硫酸钠、硫代硫酸钠、硫酸亚铁铵、无水碳酸钠均购自国药集团化学试剂有限公司。二甲酚橙指示剂: 100 μmol · L<sup>-1</sup> 二甲酚橙、250 μmol · L<sup>-1</sup> 六水合硫酸亚铁铵、25 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、μmol · L<sup>-1</sup> 2,6-叔-丁基-4-甲基酚(BHT) 的甲醇-水 (90:10, v/v) 溶液。

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司。高效液相色谱仪, Waters 515, 2487 双波长紫外检测器, Waters 2690。电喷雾质谱仪, ZMD 4000, Waters。

## 1.2 方法

1.2.1 氢过氧化亚油酸的制备<sup>[8]</sup> 将 9.0 g 亚油酸置于带恒温搅拌的气/液反应器中, 加入 5 mL DMF, 并在快速搅拌下缓慢加入 5 mol · L<sup>-1</sup> NaOH, 中和至 pH 7 后使碱过量 5%, 然后加入适量的硼酸缓冲液 (0.2 mol · L<sup>-1</sup>, pH 9), 使其达到设定的底物浓度。10℃ 下通氧 (15 mL · min<sup>-1</sup>) 搅拌 10 min, 然后加入脂氧酶 ([E] = 3.35 × 10<sup>5</sup> U · mL<sup>-1</sup>)。反应体系总体积为 100 mL。反应结束后, 用 1 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节反应液至 pH 3.5, 立即用乙醚萃取粗产品 3 次, 合并萃取液除去乙醚。

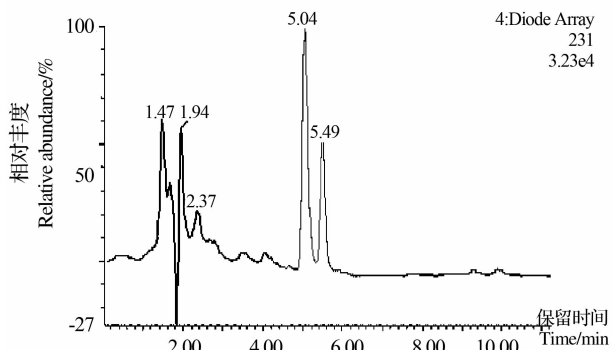
1.2.2 氢过氧化亚油酸的还原 将 0.8 g 上述氢过氧化亚油酸置于 50 mL 烧杯中, 加入一定量的乙醇溶解或者加入一定量的碳酸钠皂化氢过氧化亚油酸。然后再加入还原剂的饱和水溶液。在一定温度下, 搅拌反应一定时间后, 加入 20 mL 去离子水稀释, 用 1 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节反应液至 pH 3, 而后用乙醚萃取, 合并萃取液, 有机相先后经水、饱和食盐水洗, 挥发除去乙醚, 即得反应产物。

1.2.3 氢过氧化亚油酸含量的测定 反应结束后采用二甲酚橙法测定产物中氢过氧化亚油酸的含量, 计算得氢过氧化亚油酸的转化率: 还原产物溶于 50 μL pH 9 硼酸缓冲液中, 加入 4 mL 二甲酚橙指示剂, 再加入无水乙醇使测定液总体积达到 4.2 mL。室温下放置 45 min 后, 测量 590 nm 处吸光度。空白为 4 mL 指示剂中加入 200 μL 无水乙醇。以过氧化氢异丙苯为标准物作标准曲线, 测定还原产物中氢过氧化亚油酸的含量。计算出氢过氧化亚油酸的转化率, 取 3 次实验平均值。

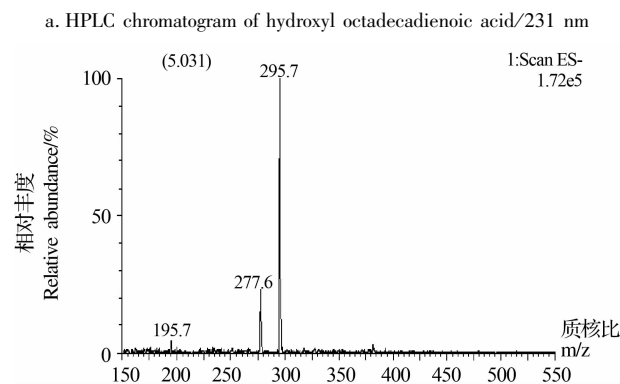
## 2 结果与讨论

### 2.1 液相色谱及质谱分析鉴定还原产物

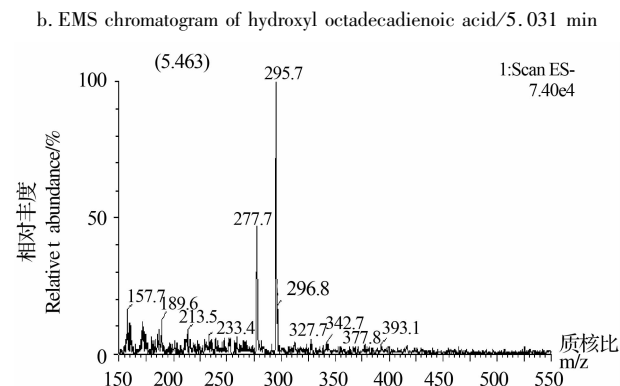
图 1 为羟基共轭亚油酸的 LC-EMS 图, 其中 a 为羟基共轭亚油酸于 231 nm<sup>[11]</sup> 扫描的液相色谱图, b 和 c 分别为对应于 a 的羟基共轭亚油酸质谱图。



a. 羟基共轭亚油酸的 HPLC 图



b. 羟基共轭亚油酸的 EMS 图



c. 羟基共轭亚油酸的 EMS 图

c. EMS chromatogram of hydroxyl octadecadienoic acid/5.463 min  
Nova-Pak C18 柱; 流动相 ACN: water: Hac = 70:30:0.1; 流速: 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; 样品溶剂: 甲醇, 柱温: 室温  
Nova-Pak C18 column; mobile phase: ACN: water: Hac = 70:30:0.1; flow rate: 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; sample solvent: methanol; column temperature: room temperature

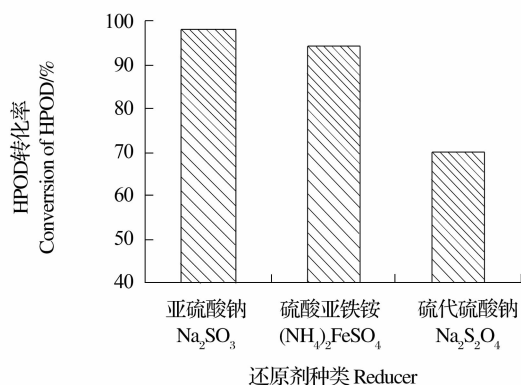
图 1 羟基共轭亚油酸的 LC-EMS 图

Fig. 1 LC-EMS chromatogram of hydroxyl octadecadienoic acid

图。通过对图 1-a 中每个峰的紫外可见光吸收光谱的检测,5.04 min、5.49 min 对应的峰的紫外最大吸收均在 232 nm。以图 1-b、1-c 对应的峰对 HPLC 各出峰进行鉴定。质谱图 1-b 中  $m/z = 295.7 ([M-H]^-)$ 、277.6 ( $[M-H]^- - H_2O$ ), 图 1-c 中  $m/z = 295.7 ([M-H]^-)$ 、277.7 ( $[M-H]^- - H_2O$ ), 分别对应于 HPLC 图中 5.04 min、5.49 min 的峰,此二峰对应的物质的分子量一致。由于所使用的液相色谱柱不是手性柱,因而这两个出峰对应的物质应该是 13-羟基共轭亚油酸和 9-羟基共轭亚油酸的异构体。由 LC-EMS 图谱的解析,可知氢过氧化亚油酸经还原得到羟基共轭亚油酸。下面对水相氢过氧化亚油酸的还原及影响因素进行了研究。

## 2.2 还原剂的选择

分别选用 3 种还原剂,即亚硫酸钠,硫酸亚铁铵和硫代硫酸钠,在文献<sup>[9-10]</sup>报道的条件下进行反应。如图 2 所示,在相同反应条件下,亚硫酸钠还原性最强,故以下实验均用亚硫酸钠还原氢过氧化亚油酸。



0℃, 20 min, 20℃, 40 min, 0.8 g HPD, 20 mL ethanol,  $n(\text{reducer}) : n(\text{HPD}) = 2:1$

图 2 乙醇-水体系中还原剂性能的比较

Fig. 2 Comparison of reducer in alcohol-water system

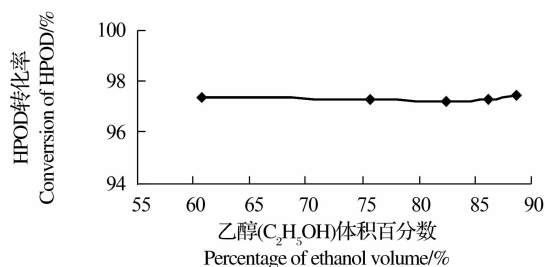
## 2.3 乙醇-水体系中乙醇浓度的影响

由图 3 可知,反应 40 min 后,乙醇量的增加对反应影响不大。为方便溶解计,以下实验中乙醇-水体系的乙醇浓度均选用 90% (v/v)。

## 2.4 皂化体系中碳酸钠加入量的影响

除了用乙醇作辅溶剂还原氢过氧化亚油酸外,将氢过氧化亚油酸部分皂化也可以增溶氢过氧化亚油酸。在皂化反应完成的前提下,碳酸钠加入量实际上反映了总氢过氧化亚油酸的皂化程度。

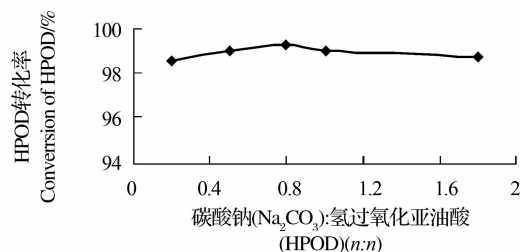
图 4 表明碳酸钠的加入量对反应影响不大,部分皂化即可满足要求。以下实验均选用碳酸钠:氢



20℃, 40 min, 0.8 g HPD,  $n(Na_2SO_3) : n(HPD) = 1:1$

图 3 乙醇含量对醇-水体系还原反应的影响

Fig. 3 Effect of ethanol on reducing reaction in alcohol-water system



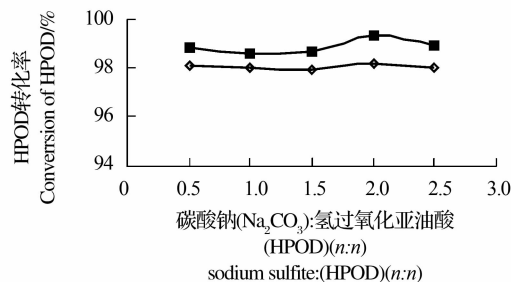
20℃, 40 min,  $n(Na_2SO_3) : n(HPD) = 1:1$

图 4 碳酸钠加入量对皂化体系还原反应的影响

Fig. 4 Effect of sodium carbonate on reducing reaction in saponify system

过氧化亚油酸 = 0.2:1 ( $n:n$ )。

## 2.5 亚硫酸钠加入量的影响



20℃, 40 min, ◇90% 乙醇(v/v), ■ $n(Na_2CO_3) : n(HPD) = 0.2:1$

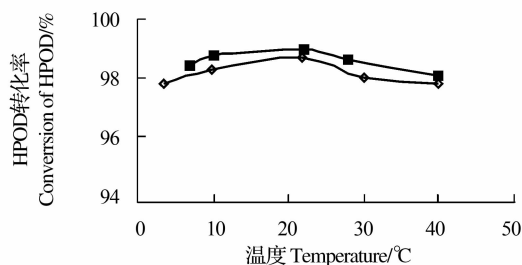
图 5 亚硫酸钠加入量对还原反应的影响

Fig. 5 Effect of sodium sulfite on reducing reaction

由图 5 可知,当亚硫酸钠:氢过氧化亚油酸 ( $n:n$ )  $\geq 1$  后,亚硫酸钠与氢过氧化亚油酸摩尔比的增加对反应没有显著影响。

## 2.6 温度对氢过氧化亚油酸还原反应的影响

氢过氧化亚油酸是一种热不稳定的物质,在较高温度下有分解的可能。蔡燕等在前期的研究中表明,氢过氧化亚油酸在 60℃ 以下是稳定的<sup>[12]</sup>,所以选择 0~40℃ 还原反应氢过氧化亚油酸。从图 6 可以看出不同反应温度下氢过氧化亚油酸的转化率基



60 min,  $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(\text{HPD}) = 1:1$ ,

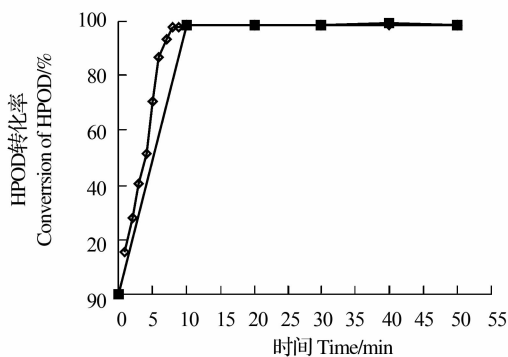
◇90% 乙醇(v/v), ■ $n(\text{Na}_2\text{CO}_3):n(\text{HPD}) = 0.2:1$

图6 温度对水相体系还原反应的影响

Fig.6 Effect of temperature on reducing reaction in aqueous solution

本相同,略高于事先在冰浴反应 20 min 时的转化率(95%)。这表明反应 60 min 时温度效应不明显,因此可以在室温下进行反应。反应 60 min 后,醇-水体系所得的还原反应转化率与皂化体系的还原反应转化率接近。

## 2.7 时间进程



20°C,  $n(\text{Na}_2\text{SO}_3):n(\text{HPD}) = 1:1$ ,

◇90% 乙醇(v/v), ■ $n(\text{Na}_2\text{CO}_3):n(\text{HPD}) = 0.2:1$

图7 反应时间对水相体系还原反应的影响

Fig.7 Effect of time on reducing reaction in aqueous solution

从图7可看出,反应初期(10 min 以内),转化率随时间几乎成直线上升,为拟一级反应。10 min 以内醇-水体系的还原反应速度略高于皂化体系的还原反应速度,这是因为 10 min 以内氢过氧化亚油酸的皂化尚未完成;而 10 min 后,醇-水体系所得的还原反应转化率与皂化体系的还原反应转化率接近。

## 3 结论

LC-EMS 分析结果表明还原氢过氧化亚油酸得到了目标产物羟基共轭亚油酸。醇-水体系所得的还原反应转化率与皂化体系的还原反应转化率接近。0

~40°C 内,反应温度对氢过氧化亚油酸的转化率无显著影响,氢过氧化亚油酸的最高转化率达 98.5%。

## 参考文献

- [1] Kaul P, Banerjee A, Mayilraj S, et al. Screening for enantioselective nitrilases; kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, 15: 207-211.
- [2] Sarita C, Robert D, Robert D F, et al. Method for producing  $\alpha$ -hydroxy acid from  $\alpha$ -hydroxy nitrile using nitrilase [P]. US, 6383786, 2002.
- [3] 薛建萍, 罗积杏, 李还宝, 等. 生物催化生产羟基乙酸 [P]. 中国: 1772912A. 2006 (Xue J P, Luo J X, Li H B, et al. Production of hydroxyacetic acid by hydrolyzing hydroxyacetone nitrile with nitrilase as catalyst [P]. CN: 1772912A. 2006.)
- [4] 陈栋梁, 瞿美臻, 白宇新, 等. 乙醇酸的合成及应用 [J]. 合成化学, 2001, 9(3): 194-198. (Chen D L, Qu M Z, Bai Y X, et al. Advance on synthesis and application of glycolic acid [J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2001, 9(3): 194-198.)
- [5] 杨晓辉, 彭银仙. 羟基乙酸的合成研究 [J]. 江苏石油化工学院学报, 2002, 14(2): 17-18. (Yang X H, Peng Y X. The study of synthesis of hydroxyacetic acid [J]. Journal of Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, 2002, 14(2): 17-18.)
- [6] Barton D H R, Kirby G W. Phenol oxidation and biosynthesis. Part V. Synthesis of Galanthamine [J]. Journal of Chemical Society, 1962, 62(2): 806-817.
- [7] Sorger K, Petersen H, Stohrer J. Enantioselective reformatsky process for preparing optically active alcohols, amines and derivatives thereof [P]. US: 6924386, 2005.
- [8] 蔡琨, 方云, 夏咏梅, 等. 大豆脂肪氧合酶酶促合成亚油酸氢过氧化物 [J]. 精细化工, 2005, 22(1): 74-77. (Cai K, Fang Y, Xia Y M, et al. Synthesis of linoleic acid hydroperoxide catalyzed by soybean lipoxygenase [J]. Fine Chemicals, 2005, 22(1): 74-77.)
- [9] Nuala M M, Mary F M, Kieran C M, et al. Chemoenzymatic synthesis of some macrocyclic C<sub>13</sub>-Lactones [J]. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions, 1991, 8: 2054-2055.
- [10] Jose M L N, Manuela P G, Francisco G C. Rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of the regiospecificity of lipoxygenase products on linoleic acid [J]. Journal of Chromatography A, 1999, 859: 107-111.
- [11] 蔡琨. 大豆脂肪氧合酶好氧催化合成亚油酸氢过氧化物 [D]. 无锡: 江南大学, 2004. (Cai K. Synthesis of linoleic acid hydroperoxide catalyzed by soybean lipoxygenase under aerobic condition [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004.)
- [12] 蔡燕, 方云, 孟君. 大豆脂氧酶催化亚油酸氢过氧化反应产物的漂白特性 [J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 235-239. (Cai Y, Fang Y, Meng J. The bleaching performance of the product obtained from hydroperoxidation of linoleic acid catalyzed by soybean lipoxygenase [J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 235-239.)