

甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯的合成及抗氧化活性研究

何莉斌, 宁正祥, 李 娜

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘 要:采用直接酯化法,合成了甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯,并从清除羟自由基、超氧阴离子自由基方面对其抗氧化活性进行了研究。结果表明,甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对氧自由基有较好的清除效果,是一种有潜力的食品添加剂。

关键词:L-抗坏血酸,甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯,合成,抗氧化

Study on antioxidant activity and the synthesis of 6-L-ascorbyl methoxycarbonylacrylates

HE Li-bin, NING Zheng-xiang, LI Na

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 6-L-ascorbyl methoxycarbonylacrylates was prepared by esterification. The antioxidant properties were evaluated by these methods: scavenging hydroxyl radical and superoxide radical power. The results showed that 6-L-ascorbyl methoxycarbonylacrylates had significant antioxidant activities and could be a potential food additive.

Key words: L-ascorbic acid; 6-L-ascorbyl methoxycarbonylacrylates; synthesis; antioxidant

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)02-0265-03

V_c 具有还原剂的性质,其用途广泛,既作为一种人体必需的营养素用于医疗保健方面,同时又是一种强抗氧化剂用于食品工业。另外 V_c 还广泛用于美容、畜牧业和水产养殖业等领域。但 V_c 容易被热或氧化剂破坏,光、微量重金属和荧光物质等更能促进其氧化^[1]。同时, V_c 几乎不溶于油相,其应用受到很大的限制。因此,如何提高 V_c 的稳定性和油溶性是国内外研究者所关心的问题。本文通过对 V_c 进行分子修饰,得到甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯,通过实验进一步证明它清除氧自由基的效果。合成的新物质既保留了 L-抗坏血酸的抗氧化性能,同时又能够溶于油相,有可能成为一类具有多种功能的食品添加剂。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-抗坏血酸、马来酸酐、甲醇、浓硫酸(98%)、乙酸乙酯、EDTA、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、邻二氮菲、30%过氧化氢、无水乙醇、 $FeSO_4$ 、Tris、邻苯三酚、盐酸等均为市售国产分析纯试剂。

MercuryPlus300 核磁共振波谱仪 美国 VARIAN 公司;紫外可见光光度计(TU-1810PC) 北京普析

通用仪器公司;旋转蒸发器(RE-52) 上海雅荣生化设备仪器有限公司;循环水式真空泵 巩义市英峪予华仪器厂;分光光度计(721) 上海精密科学仪器有限公司;pH计(pH-25型) 上海雷磁仪器厂;JB-2型恒温磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂新泾分厂;恒温振荡器(THZ-82) 金坛市富华仪器有限公司。

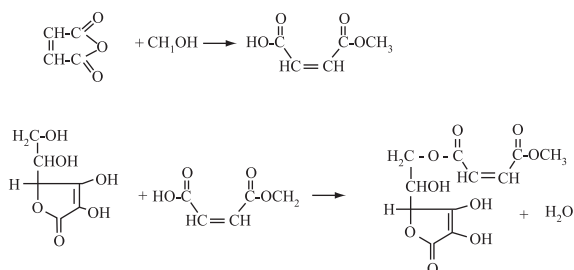
1.2 实验方法

1.2.1 马来酸单甲酯的制备 空间位阻对酯化反应影响很大,酯化反应速度随醇分子中烷基体积增大而降低,所以不同的醇应采用不同的反应时间、反应温度和反应物配比^[2]。将摩尔比 1:1 的马来酸酐和甲醇(0.05mol)加入 100mL 锥形瓶中,在 40℃ 水浴中搅拌至马来酸酐完全溶解,60℃ 保温反应 2.5h。

1.2.2 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯的合成 采用直接酯化法^[3]。向装有 20mL 浓硫酸的三角瓶中缓慢加入摩尔比为 2.5:1 的 V_c 和马来酸单甲酯(0.015mol),室温下搅拌 1h,待 V_c 完全溶解后,放入恒温振荡器中,25~26℃ 下反应 32h。反应结束后,将反应体系倒入快速搅拌的 50g 碎冰中,待冰块完全融化后,分三次用 40mL 乙酸乙酯萃取,第三次萃取时乙酸乙酯层基本为无色,合并乙酸乙酯层,用无水 Na_2SO_4 干燥过夜。0.08~0.09MPa 下 33~35℃ 旋转蒸发,蒸发直至重量不再变化,得黄色粘稠物质。合成技术路线如下:

收稿日期:2008-06-06

作者简介:何莉斌(1984-),女,研究生,研究方向:食品化学。



1.2.3 测定方法

1.2.3.1 马来酸单甲酯酯化率的测定 按马来酸单甲酯制备的条件进行保温反应,每隔半小时测定,加入 20mL 水,以 0.1% 酚酞为指示剂,应用 1mol/L NaOH 溶液滴定至微红色,记录消耗 NaOH 溶液的体积,以此计算酯化率^[4]。

1.2.3.2 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对羟自由基清除能力的测定 参照刘本国等^[5]、贾之慎等^[6]所述方法,将 50mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液稀释至 5mmol/L,取该液 1.2mL,加 0.8mL 的 0.2mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4),充分混匀后加入 5mmol/L 硫酸亚铁溶液 1.2mL,15mmol/L 的 EDTA 溶液 1.2mL,每加 1 管立即混匀,加入 1.2mL 蒸馏水以补充体积,最后加入 0.1% H_2O_2 1.6mL,为对照样;反应液在 37℃ 保温 1h,于 536nm 处测定吸光度。依上法,加入 5mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液 1.2mL,加入 0.8mL 的 0.2mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4),充分混匀后,加入 5mmol/L 硫酸亚铁溶液 1.2mL,15mmol/L 的 EDTA 溶液 1.2mL,加入 1.2mL 不同浓度的 V_c 酯样品和 V_c 溶液,为处理样;最后加入 0.1% H_2O_2 1.6mL。空白对照不加 0.1% H_2O_2 ,以蒸馏水补充体积。样品对羟自由基的清除率 (E) 按下式计算:

$$E(\%) = (A_{536} \text{ 处理} - A_{536} \text{ 对照}) / (A_{536} \text{ 空白对照} - A_{536} \text{ 对照}) \times 100\%$$

1.2.3.3 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对超氧阴离子自由基清除能力的测定 参照何玲玲等所述方法^[7],取 50mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH8.2) 4.5mL,加 4.2mL 去离子水,混匀后 25℃ 水浴保温 20min,取出立即加入 25℃ 水浴中预热的 3mmol/L 邻苯三酚 0.3mL (以 10mmol/L HCl 代替邻苯三酚作为空白),混匀立即倒入比色杯,于 325nm 处每隔 30s 测 A 值 1 次,共测 5min,计算对照溶液吸光度随时间的变化率 F_0 。依上法,在加入邻苯三酚前加入 4.2mL 不同浓度的 V_c 酯样品和 V_c 溶液,混匀后 25℃ 保温 20min,取出立即加入 25℃ 水浴中预热的 3mmol/L 邻苯三酚 0.3mL,混匀立即倒入比色杯,于 325nm 处每 30s 测 A 值 1 次,共测 5min,计算溶液吸光度随时间的变化率 F_x 。将 F_0 和 F_x 代入公式,计算样品和 V_c 溶液对超氧阴离子自由基的清除率。

$$\text{清除率}(\%) = (F_0 - F_x) / F_0 \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 产物性状与结构的鉴定

产物为黄色粘稠状固体,微溶于水,易溶于乙醇、乙酸乙酯等有机溶剂,不溶于乙醚。通过紫外扫描图谱 (图 1) 可以看出,马来酸单酯结构中含有碳碳

双键共轭体系,在 210nm 有强吸收峰, V_c 具有明显的环状结构,在 260nm 附近有紫外吸收峰。通过乙酸乙酯萃取出的产物中不含有 V_c ,并且经过纯化后排除微量马来酸单酯的干扰,从图 1 中可以看出,产物的紫外图谱具有这两个特征的吸收峰,初步确定得到目标产物。

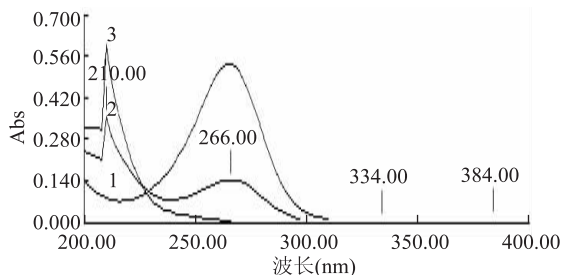


图 1 V_c (线 1)、马来酸单酯 (线 3)、 V_c 酯 (线 2) 的紫外扫描图谱

通过 ^1H NMR 对其结构进一步鉴定,见图 2,核磁共振谱数据如下: (氘代氯仿, $\delta/\text{m} \times 10^{-6}$): 6.35~6.47 (m, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$), 4.31~4.38 (m, $\text{H}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$), 3.90 (s, $\text{H}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$), 3.70~3.82 (m, $\text{H}_2\text{C}-\text{O}-$), 2.10 (s, CH_3)。

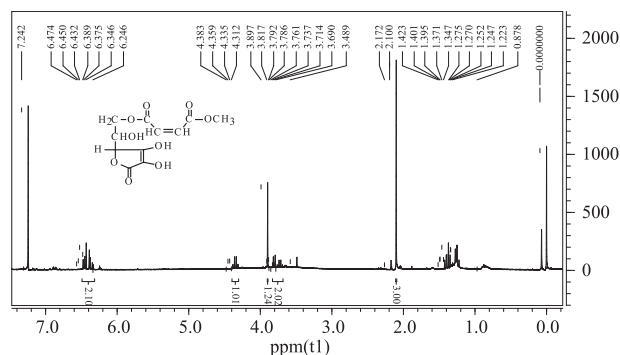


图 2 V_c 酯的核磁图谱

2.2 反应时间、反应温度对马来酸单甲酯酯化率的影响

从图 3 可以看出,随着温度的升高和时间的延长, V_c 酯化率不断提高。不同温度下,当反应达到 2.5h 时,酯化率均无明显提高。因此选用 60℃ 反应 2.5h,酯化率可达到 91.86%。由于甲醇的位阻小,马来酸酐与甲醇的醇解反应极容易进行。但反应温度过低,反应缓慢;提高反应温度可以加速反应,反应温度过高,容易形成二酯,使产率降低。

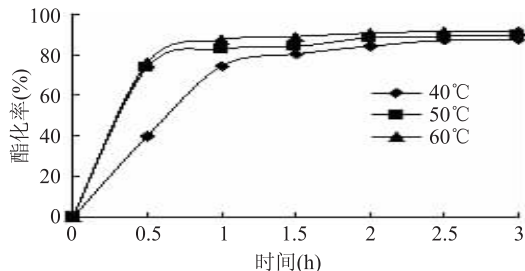


图 3 温度、时间对酯化率的影响

2.3 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯制备条件的选择

V_c 的耐热性较差,高温下易氧化,因此反应温度不能太高。但温度太低,反应难以进行。 V_c 酯化一般都选用室温 25~26℃ 条件下进行,通过实验也证明这个温度条件下反应能够顺利进行, V_c 的氧化速度也较慢。当温度升到 30℃ 时, V_c 氧化加速,反应体系颜色加深,反应产率降低。由于马来酸单甲酯的空间位阻较大,影响了反应活性, V_c 又容易被氧化,因此通过提高 V_c 与马来酸单甲酯的摩尔比来提高反应的产率。从图 4 可以看出,在室温 25~26℃、反应时间 32h 的条件下, V_c 与马来酸单甲酯的摩尔比增至 2.5:1 时,产率无明显增加趋势,因此选用摩尔比 2.5:1。

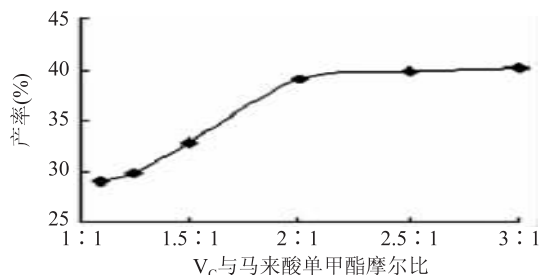
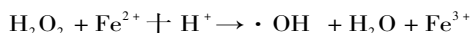


图4 摩尔比对 V_c 酯产率的影响

2.4 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对羟自由基清除能力的测试结果

$\cdot OH$ 是造成组织脂过氧化、蛋白质解聚与聚合、核酸断裂、多糖解聚的重要活性氧。因此 $\cdot OH$ 清除率是反映物质抗氧化作用的重要指标。能产生 $\cdot OH$ 的体系很多,其中 Fenton 反应是体内产生自由基的重要反应^[8],其原理如下:



邻二氮菲与 Fe^{2+} 能形成红色的络合物,在 536nm 处有最大吸收峰。当加入 H_2O_2 后, Fe^{2+} 被 $\cdot OH$ 氧化为 Fe^{3+} ,从而使溶液在 536nm 处的最大吸收峰消失。若加入的抗氧化剂清除羟自由基能力越强,则溶液在 536nm 处的吸光值就越低^[3]。 EC_{50} 值表示清除 50% 自由基时所需抗氧化剂的量,是衡量抗氧化剂效果的有效指标。

由图 5 可见, V_c 、 V_c 酯对羟自由基均有清除作用,其中 V_c 酯清除能力要优于 V_c 。 V_c 、 V_c 酯清除羟自由基的 EC_{50} 值分别为 5.58、4.39mmol/L。

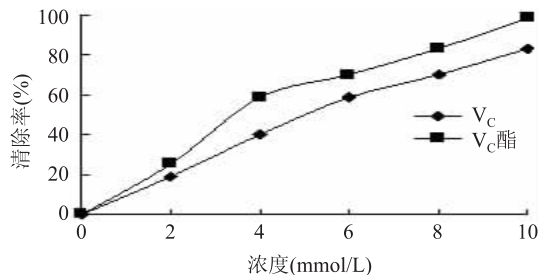


图5 V_c 、 V_c 酯对羟自由基清除能力的结果

2.5 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对超氧阴离子自由基清除能力的测试结果

$O_2^{\cdot -}$ 在油脂酸败、食品氧化变质中扮演重要的

角色,它可以引起其它的氧化反应,缩短食品的货架期,是一种破坏性极强的自由基。根据邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化,产生 $O_2^{\cdot -}$ 及有色中间物质的原理,本文采用邻苯三酚自氧化法,对 V_c 酯清除超氧阴离子自由基能力进行测定。由图 6 可见,浓度较低时 V_c 酯对超氧阴离子自由基的清除率略逊于 V_c ,随着浓度的增加其清除率大于 V_c 。 V_c 、 V_c 酯清除超氧阴离子自由基的 EC_{50} 值分别为 0.1、0.091mmol/L。

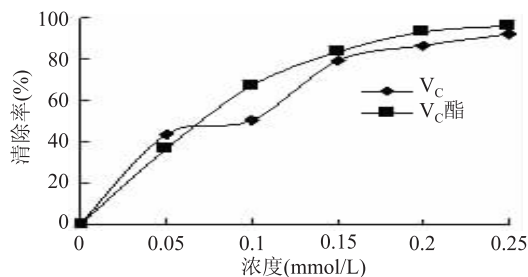


图6 V_c 、 V_c 酯对超氧阴离子自由基清除能力的结果

3 结论

3.1 马来酸酐和甲醇在 60℃、摩尔比 1:1 的条件下反应 2.5h 得到马来酸单甲酯,产率可达到 91.86%。

3.2 采用直接酯化法, V_c 与马来酸单甲酯在室温 25~26℃、摩尔比 2.5:1 的条件下反应 32h 得产物,产率为 39.8%。本文通过化学改性增加了 V_c 的脂溶性,从而扩展了其应用范围,为新型 V_c 衍生物的研究开发提供了依据。

3.3 甲氧羰基丙烯酸-6-L-抗坏血酸酯对羟自由基、超氧阴离子自由基均有较好的清除效果,随着浓度的增加其清除率不断提高,清除效果优于 V_c ,是一种有潜力的食品抗氧化剂。

参考文献:

- [1] 张彦玲,刘建峰,齐永斌. 维生素 C 衍生物的现状与发展[J]. 河北化工,2005(3):18~21.
- [2] 吴跃焕,杨卓如,曾汉维. 富马酸烷 3-PG 的合成研究[J]. 精细化工,2002(19):268~272.
- [3] 巫晓琴,乔薇,闫素君,黎峰,李宁琳,马林. L-抗坏血酸-6-对羟基苯甲酸酯的合成及抗氧化活性研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),2007,46(4):59~62.
- [4] 战宇. 丁烯二酸桂醇甲酯的合成及在荔枝防腐保鲜中的应用研究[D]. 广州:华南理工大学博士学位论文,2003.
- [5] 刘本国. 亮叶杨桐叶中类黄酮的提取、鉴定与修饰[D]. 广州:华南理工大学博士学位论文,2007.
- [6] 贾之慎,邬建敏,唐孟成. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(2):184~186.
- [7] 何玲玲,王新,石中亮,等. 醇提板栗壳色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 安徽农业科学,2006,34(10):2054~2058.
- [8] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553~555.