米根霉全细胞催化蒎烯环氧化反应的研究

涂 林,覃益民*
(广西大学化学化工学院,广西 南宁 530004)

摘要:通过比较7种不同来源的产脂肪酶菌种催化性能,选用性能较好的 *Rhizopus oryzae* CGMCC 3.5040 细胞催化 α-蒎烯的环氧化反应合成2,3-环氧蒎烷,利用单因素试验法研究了反应过程中反应时间、H_2O_2 体积分数、细胞质量、束酸剂物质的量、辛酸浓度对反应的影响,随后采用正交试验法优化工艺条件。结果表明,最优的工艺反应条件为:反应时间为12 h、双氧水与蒎烯摩尔比为7.5∶1、细胞质量为350 mg、束酸剂物质的量为3.5 mmol、辛酸浓度为1 mol/L,此条件下 Rhizopus oryzae CGMCC 3.5040 细胞催化 α-蒎烯环氧化反应的转化率为(97.9±0.9)%,收率为(85.4±1.1)%。

关键词:α-蒎烯;2,3-环氧蒎烷;全细胞催化;烯烃环氧化;工艺优化
中图分类号:O621.251 **文献标志码**:A **文章编号**:0253-4320(2021)08-0155-04
DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2021.08.031

Epoxidation of α-pinene catalyzed by whole cell of Rhizopus oryzae

TU Lin, *QIN Yi-min**
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Through comparing the catalytic performances of seven lipase producing strains from different sources, *Rhizopus oryzae* CGMCC 3.5040 cells with better performance is screened out and used to catalyze the epoxidation of α-pinene to synthesize α-pinene oxide. Effects of reaction time, H_2O_2 dosage, cell dosage, acid trapping agent dosage and octanoic acid concentration on the reaction are studied by means of single factor test. The process conditions are then optimized via orthogonal test method. The optimal reaction conditions are obtained as follows: reaction time is 12 h, the molar ratio of hydrogen peroxide to pinene is 7.5∶1, the cell dosage is 350 mg, the dosage of acid trapping agent is 3.5 mmol, and the concentration of octanoic acid is 1 mol·L^{-1}. Under the optimal conditions, the conversion rate of α-pinene epoxidation reaches (97.9±0.9)%, and the yield of α-pinene oxide reaches (85.4±1.1)%.

Key words: α-pinene; α-pinene oxide; whole-cell catalysis; olefin epoxidation; process optimization

我国是世界上产松节油最多的国家之一,而广西松节油产量位居全国第一,但国内松节油的深加工水平却较低,总产值仅为25亿元,远低于美国等发达国家[1-2]。占松节油质量75%以上的 α-蒎烯作为合成香料和精细化工的原料,被研究最多的是蒎烯环氧化反应[3],其产物2,3-环氧蒎烷作为合成香料中间体可以合成许多具有特殊功能且价格昂贵的香料或精细化学品[4]。

α-蒎烯的环氧化主要有化学法与生物酶催化法。虽然化学法反应速率快、成本较低,但副反应较多,对设备腐蚀性大,并且严重污染环境[5]。而生物酶法相对而言具有反应条件温和、选择性高、副反应少、绿色环保的特点引起了学者们的重视[6-7]。目前多种脂肪酶具有催化过水解反应能力,考虑到反应系统中高浓度 H_2O_2 和蒎烯的存在会使酶的稳定性变差,故脂肪酶需经固定化后才适合利用[8]。但固定化脂肪酶催化蒎烯环氧化反应的瓶颈是酶的成本较高,因在制备固定化酶过程中酶的分离纯化和固定化的工序会导致大量酶失活[9]。而直接使用全细胞来进行催化可以免去上述繁琐的程序,并且细胞壁和细胞膜对胞内脂肪酶起到保护作用,不仅降低了成本还有利于催化作用的充分发挥[10]。目前国内外暂无关于全细胞催化 α-蒎烯环氧化的研究报道。笔者通过对比从海洋中筛选的4种产脂肪酶真菌以及3种本实验保藏的高产脂肪酶菌种的性能发现,在加入合适的束酸剂后,直接利用产胞内脂肪酶的霉菌 *R.orzae* CGMCC 3.5040 细胞作为催化剂可以有效地催化蒎烯环氧化反应。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 原料与试剂

实验菌种:米根霉 CGMCC 3.5040、米根霉 GIM 3.509、米曲霉 CGMCC 3.5232 为商品菌,本实验室保藏;L-1、L-2、L-3、L-4 为本实验室从海洋中筛选的产脂肪酶真菌,本实验室保藏;α-蒎烯,上海阿

收稿日期:2020-09-29;**修回日期**:2021-06-02
作者简介:涂林(1995-),男,硕士研究生,主要从事生物催化合成方面的研究,634606736@qq.com;覃益民(1962-),男,博士,教授,主要从事生物加工过程与分离方向的研究,通讯联系人,qym6298@sina.com。

拉丁试剂公司生产,其他试剂均为市售分析纯。

1.1.2 仪器与设备

冷冻干燥器(Sigma);平行合成仪 ZHWY-113H4F(智诚);气相色谱仪 6890N(Aglient)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养

斜面培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

液体培养基(g/L):橄榄油 20、酵母浸粉 20、$NaNO_3$ 1.0、KH_2PO_4 1.0、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5。

1.2.2 全细胞催化剂的制备

将斜面孢子以每 100 mL 培养基接种 10^6 个孢子的接种量接入到液体培养基中,置于 28℃恒温摇床 120 r/min 下培养 48 h 后进行过滤,重复水洗 3 次,收集菌体细胞于-45℃下冷冻干燥 24 h 得到菌体干粉,作为全细胞催化剂备用。

1.2.3 全细胞催化蒎烯环氧化反应

结合课题组前期实验工作[7,12]以及本实验预实验结果,确定初始反应条件为 1 mmol 的 α-蒎烯、1 mmol 的辛酸作为反应物加入到甲苯中得到 1.5 mL 的有机相溶液,随后加入 0.75 mL 30% H_2O_2 作为反应的水相溶液,反应时保持双相液体总体积为 2.25 mL。体系在平行合成仪中预热至 30℃后,加入 2 mmol 的柠檬酸钠后再加入 200 mg 干重的菌体启动反应,180 r/min 反应一定时间后,在有机相样品中加入适量的 $Na_2SO_4-Na_2SO_3$ 混合物粉末,震荡后于 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液用异丙醇稀释至合适的倍数,α-蒎烯及其环氧化物浓度用气相色谱仪测定,每个样品设置 3 个平行样。

1.2.4 气相色谱分析

气相色谱条件为:初始温度 80℃保留 3 min 后,以 30℃/min 升温至 200℃,检测温度为 260℃,进样温度为 270℃,分流比为 50∶1。色谱柱为 HP-1(Aglient,30 m×0.25 mm×0.25 μm),正丁醇为内标物。反应转化率与收率的计算式为:

$$\alpha\text{-蒎烯转化率} = [(C_0 - C_{残})/C_0] \times 100\% \quad (1)$$

$$2,3\text{-环氧蒎烷收率} = [(C_1 \times 136.24)/(C_0 \times 152.24)] \times 100\% \quad (2)$$

式中:C_0 为 α-蒎烯的初始浓度,mol/L;$C_{残}$ 为样品中残留的 α-蒎烯浓度,mol/L;C_1 为样品中 2,3-环氧蒎烷的浓度,mol/L;其中 136.24 和 152.24 分别为 α-蒎烯和 2,3-环氧蒎烷的相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 实验菌种的优选

不同来源菌种催化 α-蒎烯环氧化的反应结果如表 1 所示。

表 1 不同来源菌种催化 α-蒎烯环氧化的反应转化率

催化剂	转化率/%	相对标准偏差/%
L-1	15.47	4.84
L-2	58.98	1.59
L-3	65.54	2.81
L-4	27.87	4.16
GIM 3.509	59.62	1.93
CGMCC 3.5040	84.90	3.24
CGMCC 3.5232	46.71	2.31
Novezymes435	92.17	2.65

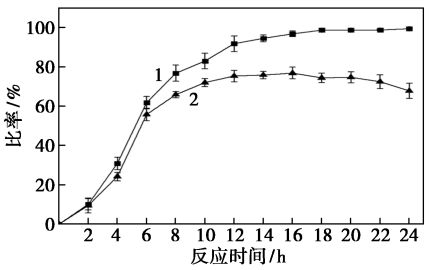
由表 1 中可以看出,CGMCC 3.5040 更适于蒎烯环氧化反应,其全细胞催化的转化率接近于固定化的 Novezymes435 脂肪酶,后续实验均使用 CGMCC 3.5040 作为实验菌种。

2.2 全细胞催化蒎烯环氧化反应的工艺优化

2.2.1 单因素试验

(1)反应时间对环氧化反应的影响

在初始反应条件下,探究反应时间对环氧化反应的影响,结果如图 1 所示。



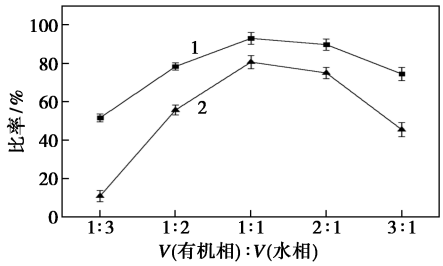
1—转化率;2—产率

图 1 反应时间对蒎烯环氧化反应的影响

由图 1 可以看出,在 0~20 h 反应时间内其转化率与收率随时间的增加而提高,反应在 16 h 时有最大收率 77.0%,随后由于底物被耗尽不再生成产物,而产物水解导致收率下降。考虑到过长的反应时间会影响总体的选择性,故选择 12 h 作为最佳反应时间段来进一步进行优化。

(2)H_2O_2 用量对环氧化反应的影响

在保证双相总体积以及 α-蒎烯与辛酸浓度不变的条件下,通过调整有机相与水相的配比从而改变底物与 H_2O_2 用量的配比来探究 H_2O_2 用量对环氧化反应的影响,结果如图 2 所示。



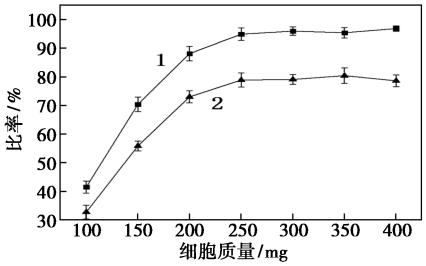
1—转化率;2—产率

图 2　H_2O_2 用量对环氧化反应的影响

由图 2 中可以看出,H_2O_2 用量对环氧化反应的影响结果和预想的一致,也与 Orellana - Coca 等[13-14]研究结果类似,在低双氧水用量下,过水解反应受到影响导致过酸生成不足,从而导致环氧化反应效率低。而在高双氧水用量下又会造成体系中过酸的积累,其不仅会对细胞有毒害作用同时造成酶的失活,还会影响产物的水解。故最佳有机相与水相配比为 1∶1,即 n(α-蒎烯)∶n(辛酸)∶$n(H_2O_2)$=1∶1∶15。

(3)细胞添加质量对环氧化反应的影响

细胞添加质量的改变也就是反应催化剂量的改变,在初始条件不变的情况下,探究细胞添加质量对环氧化反应的影响,结果如图 3 所示。



1—转化率;2—产率

图 3　细胞添加质量对环氧化反应的影响

从图 3 可以看出,在细胞添加质量大于 250 mg 时由于底物不足,形成催化剂饱和的现象,导致反应的转化率与收率没有较大的变化。考虑到过多的细胞添加质量会导致水相黏度高、传质阻力明显、反应速率降低。故最佳细胞添加质量为 250 mg。

(4)束酸剂物质的量对环氧化反应的影响

环氧化反应过程中会产生过酸,从而导致反应体系整体呈酸性,而产物 2,3-环氧蒎烷在酸性条件下会使蒎烷上的氧原子质子化,氧带上正电荷,需要向相邻的碳原子吸引电子,削弱 C—O 键,并使碳原子带部分正电荷,增加与亲核试剂的结合能力,亲核试剂就向 C—O 键背面进攻,从而产物开环使得收率大幅减少,其机理如图 4 所示[15-16]。

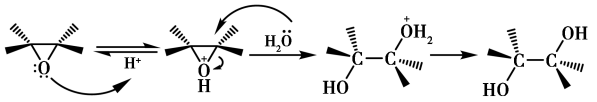


图 4　环氧化物酸性开环机理

为了避免产物 2,3-蒎烷的酸性开环反应,需要向体系中加入束酸剂来调节体系的酸度,从而达到抑制产物开环反应的目的,课题组通过前期实验选定柠檬酸钠作为本实验的有效束酸剂,由此在初始反应条件不变的情况下探究束酸剂柠檬酸钠物质的量对反应的影响,结果如图 5 所示。

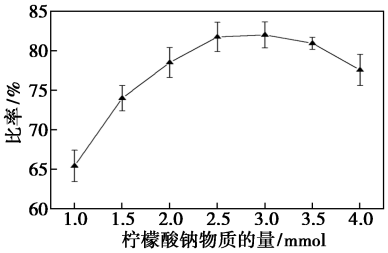
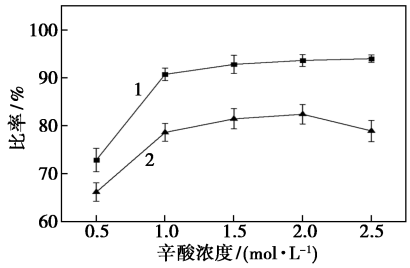


图 5　柠檬酸钠物质的量对环氧化反应的影响

由图 5 可以看出,束酸剂物质的量对收率有着非常积极的影响,柠檬酸钠物质的量在 3.0 mmol 时达到最大收率 94.0%,之后收率下降,原因是过多的柠檬酸钠会导致初始反应体系呈弱碱性,同样不利于 2,3-环氧蒎烷的产生。收率相差不大的情况下考虑到工业化成本选择最佳束酸剂物质的量为 2.5 mmol。

(5)辛酸浓度对环氧化反应的影响

在实验前期研究中,根据实验效果确定了双相体系里正辛酸作为优良的酰基供体,由此在初始反应条件不变的情况下探讨辛酸浓度对环氧化反应的影响,结果如图 6 所示。



1—转化率;2—产率

图 6　辛酸浓度对环氧化反应的影响

从图 6 中可以看出,反应体系中适当提高辛酸浓度可以明显提高反应的转化率与产率,原因是辛酸极性较弱,改变了有机相整体的极性,从而影响 H_2O_2 在有机相的分配,而在一定范围内辛酸浓度越

高其有机相中 H_2O_2 越高,促进了反应的进行。在辛酸浓度 2.5 mol/L 时,柬酸剂浓度不足导致体系酸失衡,产物开始酸水解开环,收率相应减少,因此,辛酸浓度为 2.0 mol/L。

2.2.2 正交试验优化工艺条件

根据单因素试验结果,固定对结果影响不大的因素,考察影响较为显著的因素:反应时间(A)、H_2O_2 用量/V(有机):V(水)(B)、细胞添加质量(C)、柠檬酸钠物质的量(D)、辛酸浓度(E)。以 2,3-环氧蒎烷收率作为考察指标,设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验优化蒎烯环氧化反应的工艺条件。其正交试验因素水平表如表 2 所示,正交试验设计及结果如表 3 所示。

表 2 正交试验因素水平

水平	反应时间 (A)/h	V(有机):V(水) (B)	细胞添加质量 (C)/mg	柬酸剂物质的量 (D)/mmol	辛酸浓度 (E)/(mol·L^{-1})
1	6	2:1	200	2.0	1.0
2	8	1.5:1	250	2.5	1.5
3	10	1:1	300	3.0	2.0
4	12	1:1.5	350	3.5	2.5

表 3 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	E	收率/%
1	1	1	1	1	1	54.27
2	1	2	2	2	2	51.63
3	1	3	3	3	3	55.95
4	1	4	4	4	4	58.27
5	2	1	2	3	4	62.91
6	2	2	1	4	3	68.88
7	2	3	4	1	2	61.90
8	2	4	3	2	1	58.72
9	3	1	3	4	2	72.03
10	3	2	4	3	1	71.82
11	3	3	1	2	4	64.84
12	3	4	2	1	3	48.78
13	4	1	4	2	3	81.82
14	4	2	3	1	4	72.42
15	4	3	2	4	1	82.87
16	4	4	1	3	2	58.01
K_1	55.03	67.76	61.50	59.34	66.92	
K_2	63.10	66.19	61.55	64.25	60.89	
K_3	64.36	66.39	64.78	62.17	63.86	
K_4	73.78	55.95	68.45	70.51	64.61	
R	18.75	11.82	6.96	11.10	6.03	

由表 3 可以看出,影响收率的主次顺序是反应时间>H_2O_2 用量>柬酸剂添加质量>细胞物质的量>辛酸浓度,这与 Ranganathan 等[17]进行田口实验优化结果类似。其中最佳的组合为 $A_4B_1C_4D_4E_1$,也就是反应时间为 12 h、双氧水与蒎烯摩尔比为 7.5:1、细胞添加质量为 350 mg、柬酸剂物质的量为 3.5 mmol、辛酸浓度为 1.0 mmol/L。此时在最佳工艺的条件下进行实验验证,其转化率为(97.9±0.9)%,收率为(85.4±1.1)%,从结果看,优化后全细胞催化 α-蒎烯环氧化工艺无论是转化率还是收率均高于或接近文献报道的固定化酶催化 α-蒎烯环氧化工艺水平[8-11]。与化学法工艺相比虽然反应用时较长,但同样能达到接近完全转化,收率尚有提高空间[18-20]。

3 结论

通过对不同来源的菌种进行优选确定 Rhizopus oryzae CGMCC 3.5040 细胞作为生物催化剂并证实其能有效地催化蒎烯的环氧化反应。在经过单因素试验优化以及正交试验优化后,得到最佳反应条件为:反应时间为 12 h、双氧水与蒎烯摩尔比为 7.5:1、细胞添加质量为 350 mg、柬酸剂物质的量为 3.5 mmol、辛酸浓度为 1.0 mmol/L。此条件下反应的转化率为(97.9±0.9)%,收率为(85.4±1.1)%。

参考文献

[1] 黄敏.2018 年数据下的广西松脂林化产业现状及应对[J].中国石油和化工标准与质量,2019,39(14):151-153.

[2] 王浩浩,蒋丽红,王丽媛.松节油的深加工研究进展[J].化工科技,2013,21(3):81-86.

[3] 廖圣良,商士斌,司红燕,等.松节油加成反应的研究进展[J].化工进展,2014,33(7):1856-1863.

[4] Ilinai V,Volcho K P,Salakhutdinovn F.Acid-catalyzed transformations of pinane terpenoids New prospects[J].Russ J Org Chem,2008,44(1):1-2.

[5] Denicourt A,Rauchdi M.Catalytic oxidation processes for the upgrading of terpenes:State-of-the-art and future trends[J].Catalysts,2019,9(11):893.

[6] Tudorache M,Gheorghe A,Viana A S,*et al*.Biocatalytic epoxidation of alpha-pinene to oxy-derivatives over cross-linked lipase aggregates[J].J Mol Catal B-Enzym,2016,134:9-15.

[7] Zou C,Liu Y Y,Qin Y M,*et al*.Chemoenzymatic epoxidation of alpha-pinene catalyzed by Novozym 435[J].Advances in Chemical,Material and Metallurgical Engineering,Pts 1-5,2013,634-638:896-900.

[8] Meyer-wassewita J,Hohmann D,Amsprge-scji,acjer,*et al*.An organic-single-phase CSTR process for the chemo-enzymatic epoxidation of alpha-pinene enables high selectivity and productivity[J].Biochem Eng J,2017,126:68-77.

(下转第 164 页)

[7] Li C, Brewe D, Lee J Y. Effects of impregnation sequence for Mo-modified V-based SCR catalyst on simultaneous Hg(0) oxidation and NO reduction[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2020, 270(5): 1-13.

[8] 晁晶迪,何洪,宋丽云,等.Pr 掺杂对 V_2O_5-MoO_3/TiO_2 催化剂 NH_3-SCR 反应活性的影响[J].高等学校化学学报,2015,36(3):523-530.

[9] Casagrande L, Lietti L, Nova I, *et al*. SCR of NO by NH_3 over TiO_2-supported V_2O_5-MoO_3 catalysts: Reactivity and redox behavior[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 1999, 22(1): 63-77.

[10] Chang H Z, Li J H, Chen X Y, *et al*. Effect of Sn on MnO_x-CeO_2 catalyst for SCR of NO_x by ammonia: Enhancement of activity and remarkable resistance to SO_2[J]. Catalysis Communications, 2012, 27: 54-57.

[11] Huang L, Zong Y H, Wang H, *et al*. Influence of calcination temperature on the plate-type V_2O_5-MoO_3/TiO_2 catalyst for selective catalytic reduction of NO[J]. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2018, 124(2): 603-617.

[12] 黄力,王虎,纵宇浩,等.Y 改性对 V_2O_5-MoO_3/TiO_2 催化剂脱硝性能的影响[J].现代化工,2020,40(3):162-166.

[13] Dong G J, Bai Y, Zhang Y F, *et al*. Effect of the $V^{4+(3+)}/V^{5+}$ ration on the denitration activity for V_2O_5-WO_3/TiO_2 catalysts[J]. New Journal of Chemistry, 2015, 39: 3588-3596.

[14] Yu W C, Wu X D, Si Z C, *et al*. Influences of impregnation procedure on the SCR activity and alkali resistance of V_2O_5-WO_3/TiO_2 catalyst[J]. Applied Surface Science, 2013, 283: 209-214.

[15] Qiu Y, Liu B, Du J, *et al*. The monolithic cordierite supported V_2O_5-MoO_3/TiO_2 catalyst for NH_3-SCR[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 294: 264-272.

[16] Broclawik E, Góra A, Najbar M. The role of tungsten in formation of active sites for no SCR on the V-W-O catalyst surface-Quantum chemical modeling (DFT)[J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2001, 166: 31-38.

[17] Al-Kandari H, Al-Kharafi F, Al-Awadi N, *et al*. The catalytic active sites in partially reduced MoO_3 for the hydroisomerization of 1-pentene and n-pentane[J]. Applied Catalysis A: General, 2005, 295: 1-10.

[18] Jing L Q, Xu Z L, Sun X J, *et al*. The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles[J]. Applied Surface Science, 2001, 180: 308-314.

[19] Shawn D L, Andreea C G, Bernard E N. Ammonia oxidation over Au/MO_x/γ-Al_2O_3-activity, selectivity and FT-IR measurements[J]. Catalysis Today, 2004, 9: 3-14.

[20] Zhao L K, Li C T, Zhang J, *et al*. Promotional effect of CeO_2 modified support on V_2O_5-WO_3/TiO_2 catalyst for element mercury oxidation in simulated coal-fired flue gas[J]. Fuel, 2015, 153: 361-369.

[21] Tang X F, Li J H, Wei L S, *et al*. MnO_x-SnO_2 catalysts synthesized by a redox coprecipitation method for selective catalytic reduction of NO with NH_3[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2008, 29(6): 531-536.

[22] Martín J A, Yates M, Ávila P, *et al*. Nitrous oxide formation in low temperature selective catalytic reduction of nitrogen oxides with V_2O_5/TiO_2 catalysts[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2007, 70: 330-334.

[23] 程广文,张强,白博峰.一种改性选择性催化还原催化剂及其对零价汞的催化氧化性能[J].中国电机工程学报,2015,35(3):623-630.

[24] Kim M H, Han S W, Lee J B. Oxidation of gaseous elemental mercury by hydrochloric acid over $CuCl_2$/TiO_2-based catalysts in SCR process[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2010, 99: 272-278.■

(上接第 158 页)

[9] Ban K, Hama S, Nishizuka K, *et al*. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2002, 17(3-5): 157-165.

[10] 石红璆,查代明,张炳火,等.全细胞脂肪酶研究进展[J].中国生物工程杂志,2018,38(11):51-58.

[11] Potumarthi R. Surface immobilization of Rhizopus oryzae (ATCC 96382) for enhanced production of lipase enzyme by multiple responses optimization[J]. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2012, 7: S285-S295.

[12] 熊阳,覃益民,唐爱星,等.在 α-蒎烯生物环氧化反应过程中酯对反应的影响及机理探讨[J].化工进展,2016,35(1):220-226.

[13] Orellana-coca C, Camocho S, Adlercreuta D, *et al*. Chemo-enzymatic epoxidation of linoleic acid; Parameters influencing the reaction[J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2005, 107(12): 864-870.

[14] Tornvall U, Orellana-coca C, Hatti-kaul R, *et al*. Stability of immobilized Candida antarctica lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids[J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 40(3): 447-451.

[15] Wohl R A. The mechanism of the acid-catalyzed ring opening of epoxides-a reinterpretative review[J]. Chimia, 1974, 28(1): 1-5.

[16] Pastor I, Yus M. Asymmetric ring opening of epoxides[J]. Current Organic Chemistry, 2005, 9(1): 1-29.

[17] Ranganathan S, Tebbe J, Wiemann L, *et al*. Optimization of the lipase mediated epoxidation of monoterpenes using the design of experiments-Taguchi method[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10): 1479-85.

[18] 夏坤,王艺,周丹,等.CoSAPO-5 分子筛的快速合成及高效催化 α-蒎烯与空气环氧化反应[J].高等学校化学学报,2018,39(5):941-948.

[19] Lu X H, Tao P P, Huang F F, *et al*. Nano-SnO_2 as highly efficient catalyst for epoxidation of cyclic olefins with aqueous H_2O_2[J]. Chem J Chinese U, 2019, 40(3): 528-535.

[20] Yamazki S. An effective procedure for the synthesis of acid-sensitive epoxides: Use of 1-methylimidazole as the additive on met hyl-trioxorhenium catalyzed epoxidation of alkenes with hydrogen peroxide[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, (10): 2377-2385.■