

羟基化大豆磷脂酰化改性的研究

祝品, 李桂华, 康雪梅, 毛程鑫

(河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001)

摘要:以顺丁烯二酸酐为酰化试剂,对羟基化大豆磷脂进行酰化改性。考察了反应时间、反应温度和酰化试剂加入量对羟基化大豆磷脂酰化率的影响。通过响应面优化实验,最终确定了羟基化大豆磷脂酰化改性的最佳工艺条件。结果表明,当反应时间为30 min、反应温度为55℃、顺丁烯二酸酐加入量为4%时,改性后大豆磷脂的酰化率为61.60%。采用红外图谱分析得出改性后的磷脂有酰胺基的生成,通过乳化稳定性实验得出羟基化中和后磷脂的乳化稳定性有一定程度的提高。

关键词:羟基化磷脂;酰化;酰化率;乳化稳定性

中图分类号:TS 229 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)03-0040-05

Study on modification of hydroxylated soybean phospholipids by acylation

ZHU Pin, LI Gui-hua, KANG Xue-mei, MAO Cheng-xin

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

Abstract: Taking maleic anhydride as acylating agent, hydroxylated soybean phospholipids were acylated. The influences of reaction time, reaction temperature and anhydride dosage on the acylating rate of modified phospholipids were studied. The reaction conditions were optimized by response surface methodology as follows: reaction time 30 min, reaction temperature 55℃, and acylating reagent dosage 4%. Under the optimum conditions, the acylating rate was 61.60%. Infrared spectrum characterized that amide groups were generated in the acylated modified phospholipids. Compared with raw phospholipids, the emulsifying stability of hydroxylated and acylated phospholipids were improved in a certain degree.

Key words: hydroxylated phospholipid; acylation; acylating rate; emulsifying stability

大豆磷脂是天然的表面活性剂^[1],广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料及其他工业行业^[2-3]。但因其亲水性能和乳化分散性不是很理想,需对其进行改性来更好地满足市场需求^[4]。大豆磷脂在适当的温度下,磷脂中的不饱和和脂肪酸双键与过氧化氢在乳酸的催化下发生羟基化反应生成羟基化大豆磷脂^[5]。羟基化大豆磷脂是很好的纺织品软化剂,在色泽、分散性、耐热性和HLB值方面相对大豆浓缩磷脂均得到很大的改善^[6-7],但乳化稳定性不是很好,所以其应用也有一定的局限性。

羟基化磷脂的酰化改性就是将磷脂中的磷脂酰乙醇胺带正电的氨基上引入一个酰基,使两性磷脂酰乙醇胺只带负电,从而改变原有磷脂的功能与性质^[8],提高羟基化磷脂油包水的乳化能力和乳化稳定性。本实验采用无介质溶剂的方法对羟基化大豆

磷脂进行酰化改性,探讨反应时间、反应温度及酰化试剂(顺丁烯二酸酐)加入量对酸价和酰化率的影响,并确定最佳改性条件。对改性后的大豆磷脂进行结构分析和乳化稳定性测试,为大豆磷脂的深度开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

羟基化大豆磷脂:郑州四维磷脂技术有限公司;顺丁烯二酸酐、乙酸酐、吡啶、石油醚、95%乙醇、冰乙酸、异辛烷、丙酮、无水乙醚、碘化钾、溴化钾、甲醛、氢氧化钠(均为分析纯),天津科密欧化学试剂有限公司。

RE52CS-1 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;B-260 恒温水浴锅:上海亚荣生化仪器厂;CSCL-3 型智能恒温磁力搅拌器:上海豫康科教仪器设备有限公司;PHS-3C 型 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司;WQF-510 傅立叶变换红外光谱仪(FTIR):北京瑞利分析仪器公司。

收稿日期:2014-12-16

作者简介:祝品,1988年出生,女,河南信阳人,硕士研究生。

通讯作者:李桂华,1952年出生,男,河南信阳人,教授。

1.2 实验方法

水分按照 GB/T 5009.3—2003 直接干燥法中规定的方法测定;酸值测定按照 GB/T 5530—2005 中规定的方法测定;乙醚不溶物按照 SN/T 0802.1—1999 中规定的方法测定;丙酮不溶物按照 SN/T 0802.2—1999 中规定的方法测定;过氧化值按照 GB/T 5538—2005 中规定的方法测定;碘值按照 GB/T 5532—2008 中规定的方法测定;羟值按照 GB/T 7383—2007 中规定的方法测定。

1.3 羟基化大豆磷脂酰化改性方法

称取 100 g 羟基化大豆磷脂,置于 500 mL 的三口烧瓶中,置于电热套上搅拌加热至一定温度,再加入一定量的顺丁烯二酸酐,在真空条件下搅拌反应至规定时间。测定反应产物的酸价、酰化率。

称取 80 g 未中和酰化改性磷脂,缓慢滴加一定量浓度为 40% 的氢氧化钠溶液,加热搅拌反应,反应温度为 50 ℃,反应时间为 0.5 h。将中和后的反应产物置于旋转薄膜蒸发器中,进行真空脱水,水温为 90 ℃,脱水时间为 3 h。

1.4 酰化改性磷脂酰化率的测定

称取 1.0 g 磷脂样品于 100 mL 的烧杯中,加入 50 mL 温水,置于恒温磁力搅拌器上搅拌至磷脂完全溶解,测定溶液的 pH 值。缓慢滴加浓度为 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液至溶液的 pH 为 8.7,然后加入 8 mL 浓度为 40% 的甲醛溶液,溶液的 pH 会渐渐下降至一定数值。在溶液的 pH 稳定后,用浓度为 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定,至样品溶液 pH 8.7 为终点,记录实验消耗的氢氧化钠溶液的体积。同时做空白实验。酰化实验的酰化率 (f) 计算方法为:

$$f = (V_{\text{原料}} - V_{\text{样品}}) / (V_{\text{原料}} - V_{\text{空白}}) \times 100\%$$

$V_{\text{原料}}$ 、 $V_{\text{样品}}$ 、 $V_{\text{空白}}$ 分别为羟基化大豆磷脂、羟酰化改性磷脂和空白实验消耗的氢氧化钠溶液的体积。

1.5 傅立叶变换红外光谱仪扫描红外光谱测定磷脂结构

涂膜法制样,将样品置于红外光谱仪中进行扫描,扫描的范围为 400~4 000 cm^{-1} ,分辨率为 4,扫描次数为 8 次。

1.6 乳化稳定性测试

将 1.00 g 磷脂样品加入 50 mL 的一级大豆油中,混合均匀后,在 6 500 r/min 的条件下经高速分散均质机乳化,边乳化边缓慢加入 50 mL 蒸馏水,均质 60 s 制成乳化液。倒入 100 mL 的具塞量筒中,在恒温烘箱中 60 ℃ 保存,定时观察记录量筒中的乳化液油水析出状态,计算出乳化液层比例,乳化液层所占的比例越大,说明磷脂的乳化稳定性越

好,可以用乳化液层比例的大小衡量磷脂的乳化稳定性。

2 结果与分析

2.1 羟基化大豆磷脂的理化指标

对羟基化大豆磷脂原料进行常规的理化分析,结果见表 1。

表 1 羟基化大豆磷脂原料的理化指标

理化指标	数值
水分/%	0.99
酸价/(mg KOH/g)	32.23
乙醚不溶物/%	0.57
丙酮不溶物/%	56.80
过氧化值/(mmol/kg)	11.55
碘值/(g/100 g)	81.26
羟基值/(mg KOH/g)	191.33

2.2 单因素实验

研究反应时间、反应温度和顺丁烯二酸酐加入量对羟基化大豆磷脂酰化改性程度的影响,为响应面实验提供一个合理的数据范围。

2.2.1 反应时间对羟基化大豆磷脂酰化改性的影响

称取羟基化大豆磷脂 100 g,设定反应温度为 60 ℃,顺丁烯二酸酐加入量为羟基化大豆磷脂的 4%,反应时间分别为 20、40、60、80、100 min,考察反应时间对羟酰化改性磷脂酰化率和酸价的影响,结果见图 1。

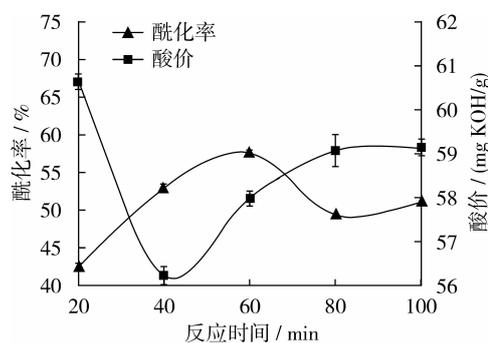


图 1 反应时间对羟基化磷脂酰化改性酰化率和酸价的影响

由图 1 可以看出,反应 40 min 后,酸价降到最低。在整个反应过程中,反应体系的酸价处于 56.24~60.62 mg KOH/g 之间,酸价变化不大,这是因为酰化反应过程既有酸酐键断裂又有羧基的生成,每消耗一分子的酸酐(酸酐水解后相当于两分子羧酸)会产生一分子的羧酸,酰化程度高,酸价会略有下降。随着羟基化大豆磷脂酰化反应时间的延长,酰化率先逐渐增高,反应 60 min 时,酰化率最高,然后略有下降,最后趋于平缓。这是因为随着反应时间的延长,顺丁烯二酸酐和磷脂的接触更加充

分,有利于反应向着正方向进行。反应 60 min 后,酰化产物增多,原料减少,抑制了酰化反应的进行,从而使酰化率降低。

2.2.2 反应温度对羟基化大豆磷脂酰化改性的影响

称取羟基化大豆磷脂 100 g,固定反应时间 60 min,顺丁烯二酸酐用量为 4%,设定反应温度分别为 45、60、75、90、105 °C,考察反应温度对羟基化大豆磷脂酰化改性反应的酸价和酰化率的影响,结果如图 2 所示。

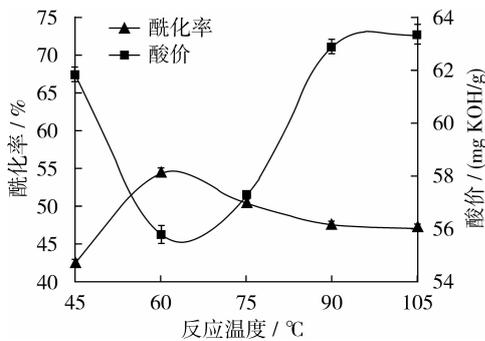


图2 反应温度对羟基化磷脂酰化改性酰化率和酸价的影响

由图 2 可知,随着反应温度的升高,体系的酸价先降低后升高,60 °C 左右酸价达到最低。磷脂的酰化率先随着温度的升高而增大,这是由于温度升高,顺丁烯二酸酐处于熔融状态,在搅拌的条件下,与磷脂的接触面积增大,酰化反应进行得更彻底。当温度为 60 °C 时,酰化率达到最高,为 54.40%,反应温度继续升高,酰化率逐渐降低,然后趋于平缓。这是因为温度过高对酰化反应有抑制作用。

2.2.3 顺丁烯二酸酐加入量对羟基化大豆磷脂酰化改性的影响

称取羟基化大豆磷脂 100 g,固定反应时间 60 min,反应温度为 60 °C,设定顺丁烯二酸酐用量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%,考察顺丁烯二酸酐加入量对羟基化大豆磷脂酰化改性反应的酸价和酰化率的影响,结果如图 3 所示。

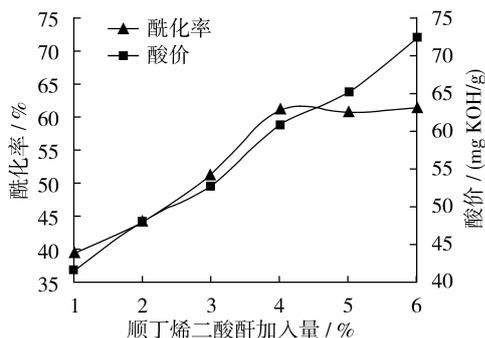


图3 顺丁烯二酸酐加入量对羟基化磷脂酰化改性酰化率和酸价的影响

由图 3 可以看出:磷脂的酸价随着顺丁烯二酸酐加入量的增加而升高,当加入量为 6% 时,酸价达到 72.55 mg KOH/g,这是因为酰化试剂顺丁烯二酸酐的酸价很高,达到 815.43 mg KOH/g,反应过程酰化试剂会有一定的减少,但还会有羧酸基团的生成。所以酰化试剂加入量增加,酸价也会明显增加。酰化反应过程中,随着顺丁烯二酸酐加入量的增加,参与酰化反应的酸酐基团增加,酰化率也会增加,当加入量为 4% 时,酰化率达到最大 (61.01%),再加入顺丁烯二酸酐,酰化率波动很小。这是因为原料羟基化磷脂中磷脂酰乙醇胺是一定量的,反应平衡后酰化率基本维持不变。

2.3 羟基化大豆磷脂酰化改性响应面分析

2.3.1 响应面因素水平及实验设计

在单因素实验的基础上,运用 Box - Behnken 中心组合实验设计原理,以反应时间(A)、反应温度(B)、顺丁烯二酸酐用量(C)为自变量。由于酰化反应既有酸酐的减少又有羧基的生成,且反应物顺丁烯二酸酐的酸价高达 815.43 mg KOH/g,加入量不同对体系的酸价影响很大,所以响应面设计不考虑酸价,只以酰化率(Y)为响应值,采用 Design - Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平共 17 个实验点的响应面分析实验。实验因素水平见表 2,实验设计及结果见表 3。

表2 响应面分析因素水平表

水平	A 时间/min	B 温度/°C	C 顺丁烯二酸酐 用量/%
1	30	55	3
2	60	65	4
3	90	75	5

表3 响应面分析实验设计和结果

序号	A	B	C	酰化率/%
1	2	1	3	60.41
2	1	2	3	59.7
3	3	2	3	48.14
4	2	3	1	46.21
5	3	2	1	43.11
6	1	2	1	57.03
7	2	2	2	58.28
8	3	1	2	52.08
9	1	1	2	62.07
10	1	3	2	50.17
11	2	2	2	56.55
12	2	2	2	56.03
13	2	2	2	57.76
14	2	2	2	57.83
15	2	1	1	57.46
16	2	3	3	50.03
17	3	3	2	41.38

2.3.2 模型的建立及显著性分析

利用软件 Design - Expert 8.0.6 对表3中的实验数据进行二次多项式回归拟合,可得到响应值 Y 和各因素(A、B、C)之间的回归方程:

$$Y = 57.29 - 5.53A - 5.53B + 1.81C + 0.30AB + 0.59AC + 0.22BC - 3.70A^2 - 2.17B^2 - 1.60C^2$$

此数学模型的可靠性通过响应面回归系数显著性分析来考察,结果见表4。

表4 回归统计分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P>F	显著性
模型	614.303 8	9	68.255 98	50.481 06	<0.000 1	极显著
A	244.868 5	1	244.868 5	181.100 9	<0.000 1	极显著
B	244.536 6	1	244.536 6	180.855 5	<0.000 1	极显著
C	26.172 61	1	26.172 61	19.356 86	0.003 2	极显著
AB	0.36	1	0.36	0.266 25	0.621 8	
AC	1.392 4	1	1.392 4	1.029 797	0.344 0	
BC	0.189 225	1	0.189 225	0.139 948	0.719 4	
A ²	57.603 16	1	57.603 16	42.602 4	0.000 3	极显著
B ²	19.758 48	1	19.758 48	14.613 06	0.006 5	极显著
C ²	10.728 48	1	10.728 48	7.934 617	0.025 9	显著
残差	9.464 775	7	1.352 111			
失拟	5.836 975	3	1.945 658	2.145 276	0.237 3	
纯误差	3.627 8	4	0.906 95			
总和	623.768 6	16				

注:“P>F”值小于0.05时,表示该指标显著;“P>F”值小于0.01时,表示该指标极显著。

由表4可看出:模型P<0.000 1,此模型是高度显著的,失拟项不显著(P=0.237 3>0.05),同时响应面分析的相关系数R的R-Sq为0.981 7,校正后的R-Sq为0.970 7,表明该二次多项模型拟合程度较好,实验误差小,可以用来对羟基化大豆磷脂酰化改性实验数据进行分析与预测。

2.3.3 响应曲面分析

根据回归方程,做响应面曲面图。考察了拟合响应面的形状,分析了时间、温度和顺丁烯二酸酐加入量3个因素两两交互作用对改性磷脂酰化率的影响。其响应曲面如图4~图6所示。图中的曲面变化均较陡峭,说明时间、温度和酰化试剂加入量对改性后磷脂酰化率的影响均较为显著。等高线图均近

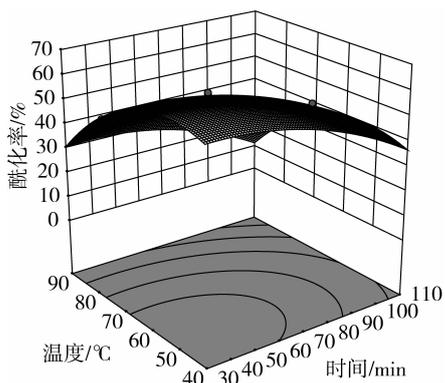


图4 反应时间和温度对改性后磷脂酰化率的影响

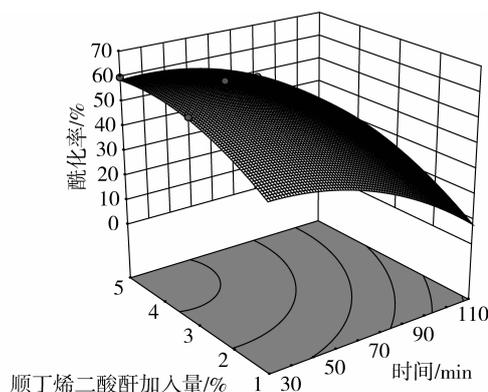


图5 反应时间和顺丁烯二酸酐用量对改性后磷脂酰化率的影响

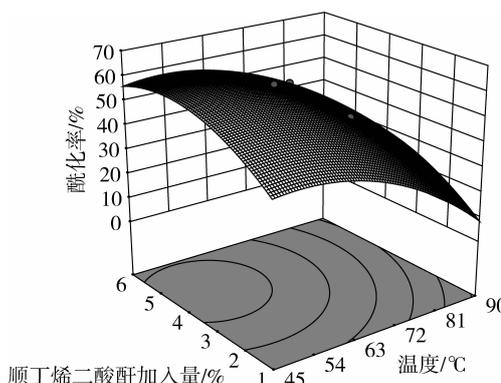


图6 反应温度和顺丁烯二酸酐用量对改性后磷脂酰化率的影响
似为圆形,说明时间、温度和酰化试剂加入量两两交互作用均不显著。

2.3.4 羟基化大豆磷脂酰化改性最佳工艺条件的确定

本研究结合三个变量因素与响应值等高图的叠加,通过分析软件的模拟优化,得到羟基化大豆磷脂酰化改性最佳工艺条件为:反应时间30 min,反应温度55℃,顺丁烯二酸酐加入量4%,在此条件下酰化率预测值为62.79%。以响应面实验优化得到的最佳条件进行3次验证性实验,实验结果见表5。

表5 验证实验

实验序号	酯化率/%
1	61.53
2	61.24
3	62.02
平均值	61.60

通过验证实验,得出磷脂酰化率为61.60%,与预测值较吻合,表明用响应面法研究羟基化大豆磷脂酰化的最佳改性条件是切实可行的。

2.4 羟化大豆磷脂改性前后红外光谱表征

对酰化改性前后的羟化大豆磷脂进行红外光谱扫描,结果见图7。通过对比酰化改性前后的羟化大豆磷脂的红外吸收光谱图可以看出,在波数为1 510~1 620 cm⁻¹和1 650~1 690 cm⁻¹之间分别出现了新的吸收峰,即酰胺I带和酰胺II带的吸收峰。

这就说明顺丁烯二酸酐与羟化大豆磷脂发生了酰化反应。

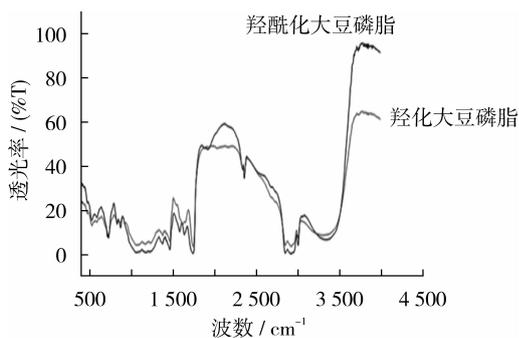


图7 酰化改性前后羟化大豆磷脂红外光谱图

2.5 羟酰化改性大豆磷脂的中和

羟酰化后的磷脂的酸价较高,乳化效果不好,需要进行酸碱中和使其酸价降至 30 mg KOH/g 左右。对羟酰化改性最佳条件下得到的样品用 40% 的 NaOH 溶液进行中和脱水,得到改性后的磷脂,其理化指标见表 6。

表6 经 NaOH 溶液中和后的羟酰化磷脂理化指标

理化指标	数值
水分/%	0.79
酸价/(mg KOH/g)	33.01
乙醚不溶物/%	0.54
丙酮不溶物/%	56.96
过氧化值/(mmol/kg)	7.56
碘值/(g/100 g)	86.40
羟基值/(mg KOH/g)	185.14

对比表 6 和表 1(原料磷脂)可知:改性前后磷脂的酸价、乙醚不溶物和丙酮不溶物变化不大,改性后的磷脂水分与过氧化值均略有降低,碘值略有升高,羟基值略有降低。这是因为整个反应是在负压搅拌的条件下进行的,羟基化磷脂中小分子的氢过氧化物被抽出,所以过氧化值有所降低;酰化试剂顺丁烯二酸酐容易吸收磷脂中残留的水分生成顺丁烯二酸,所以水分含量也略有降低;顺丁烯二酸酐本身含有一个双键,羟基化磷脂中的磷脂酰乙醇胺与之反应后分子量增加,且有双键接入,所以碘值会有所升高;羟基化磷脂是复杂的混合物,和顺丁烯二酸酐发生酰化反应的同时还会有副反应产生如酯化反应、接枝化反应等,可能是这些副反应使得磷脂羟基值有所减少。

2.6 羟酰化改性磷脂的乳化稳定性研究

以羟化磷脂、羟酰化未中和的磷脂和羟酰化中和过的磷脂为乳化剂,在相同条件下制备乳化液,通过测试不同时间各乳化液的乳化层比例来评价改性前后磷脂的乳化能力和乳化稳定性能,结果如图 8 所示。

由图 8 可以看出,随着乳化液放置时间的延长,乳化层比例均逐渐减少。前 1~8 d,三种乳化液乳化层比例减少较慢,放置 8 d 之后,以羟酰化未中和

磷脂和羟化大豆磷脂原料为乳化剂的乳化层比例迅速减少,而羟酰化中和过的磷脂的乳化层比例变化较为平缓。这是因为羟酰化未中和的磷脂在酸性环境下容易发生水解,另外,乳化剂的酸价过高,生成的乳化液容易破乳,乳化稳定性减弱。羟酰化中和过的磷脂的乳化层比例大于羟化大豆磷脂,说明酰化改性后的磷脂,乳化稳定性比改性之前好。

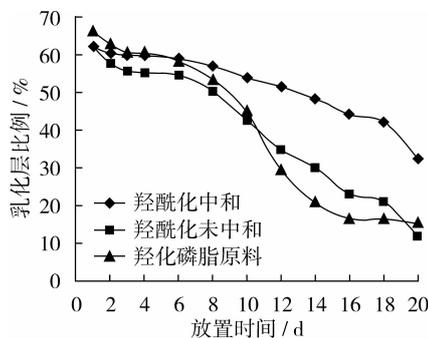


图8 各磷脂乳化液的乳化层比例随时间变化的趋势图

3 结论

本实验对羟基化大豆磷脂进行酰化改性研究,分别探讨了反应时间、反应温度和顺丁烯二酸酐加入量对酸价和酰化率的影响,并在此基础上进行响应面优化实验。得到酰化改性的最佳条件为:反应时间 30 min,反应温度 55 °C,顺丁烯二酸酐加入量 4%,得到羟基化大豆磷脂的酰化率为 61.60%。

羟酰化改性磷脂克服了磷脂单一改性的不足,对水的包覆能力增强,乳化稳定性得到一定程度的提高,在化妆品及脂质体包封等方面的应用有重要意义。鉴于羟基化大豆磷脂中参与反应的磷脂酰乙醇胺含量有限,后续实验可以先将磷脂酰乙醇胺富集,然后对其进行酰化改性以提高反应机率,进一步改善磷脂的物化性能。

参考文献:

[1]胡兴中. 大豆磷脂酰羟化改性技术[J]. 黑龙江粮食, 2012, (6):53-55.
 [2]Rydhal L, Wilton I. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1981, 58:830-837.
 [3]李红, 孙东弦, 刘延奇. 大豆磷脂改性研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 37(9):70-75.
 [4]田志茗, 初阳. 磷脂的乙酰化羟化改性工艺及其表面活性研究[J]. 精细石油化工, 2004(2):14-16.
 [5]毕艳兰. 油脂化学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:138-143.
 [6]Joshia A, Paratkar S G, Thorata B N. Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006, 108(4):363-373.
 [7]宋玉卿, 于殿宇, 罗淑年, 等. 大豆磷脂改性技术综述[J]. 大豆科技, 2007(4):22-25.
 [8]张海峰, 谷克仁, 张燕飞, 等. 大豆浓缩磷脂中磷脂酰乙醇胺的乙酰化改性[J]. 中国油脂, 2009(9):51-54. ㊟