

# 铜氨法生产叶绿素铜钠盐工艺优化

喻 薇, 纪平雄\*

(华南农业大学理学院 生物材料研究所, 广东 广州 510642)

**摘 要:** 叶绿素铜钠盐作为一种安全无毒的水溶性叶绿素衍生物, 具有良好的稳定性和着色性, 被广泛应用于食品添加剂。本研究对以蚕沙叶绿素为原料制备叶绿素铜钠盐的传统工艺进行了改进, 以碱性铜氨置换法半合成叶绿素铜钠盐。选择铜代过程中乙醇质量分数、pH 值、反应温度及加铜量 4 个试验因素, 通过正交试验和 SAS 统计软件进行优化分析, 得出最适工艺条件为加铜量为理论值的 2.5 倍、乙醇质量分数 75%、温度 55℃、pH11.5。减少置铜过程溶剂乙醇用量 10%, 得到的产品质量符合国家规定食品添加剂标准。

**关键词:** 蚕沙; 铜氨法; 叶绿素铜钠盐; 工艺条件; SAS 统计

## Optimization of Synthesis of Sodium Copper Chlorophyllin by Alkaline Cuprammonium Replacement

YU Wei, JI Ping-xiong\*

(Institute of Biomaterial, College of Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Chlorophyll copper sodium salt as a non-toxic water soluble chlorophyll derivative has excellent stability and colorability and is widely used as a food additive. In the present study, the traditional preparation process for sodium copper chlorophyllin from silkworm excrement chlorophyll was modified to develop a semi-synthesis method based on alkaline cuprammonium replacement. Four reaction conditions such as ethanol concentration, pH, reaction temperature and copper amount were chosen for synthesis process optimization based on orthogonal array design using SAS statistical software. The optimal copper amount, ethanol concentration, reaction temperature and pH were 2.5 times higher than the theoretic value, 75%, 55 °C, and 11.5, respectively. Under these conditions, the ethanol consumption for copper replacement was reduced by 10%, and the quality of the product obtained was in accordance with the national standard of food additives.

**Key words:** silkworm excrement; cuprammonium method; sodium copper chlorophyllin; process conditions; SAS statistical software

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)12-0119-04

叶绿素铜钠盐作为一种安全无毒的水溶性叶绿素衍生物, 是联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和我国食品添加剂标准委员会批准使用的一种天然食用色素<sup>[1]</sup>, 由于较之叶绿素具有良好的稳定性和着色性<sup>[2]</sup>, 被广泛应用于食品添加剂、化妆品添加剂、着色剂、药品、光电转换材料等领域<sup>[3-4]</sup>。此外, 可从废弃蚕沙中提取叶绿素, 再由叶绿素制备叶绿素铜钠盐, 不仅促进我国蚕业产生的蚕粪这一大宗废弃副产物资源的充分利用, 而且创造了更高的经济效益和社会效益<sup>[5]</sup>。

迄今为止, 国内外有关叶绿素铜钠盐制备方法研究报道大多采用酸性置铜法<sup>[6-9]</sup>, 该法需要消耗较多的溶剂汽油、丙酮和乙醇等有机溶剂, 并且未见有碱性铜氨置换法生产叶绿素铜钠盐的相关报道<sup>[10-11]</sup>。本实验用铜氨法在碱性条件下半合成叶绿素铜钠盐, 大大降低了生产消耗, 为蚕沙生产叶绿素铜钠盐的进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

干蚕沙由华南农业大学亚太蚕桑研究中心提供。

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 华南农业大学“211 工程”三期重点建设项目(2009B010100001)

作者简介: 喻薇(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为应用有机化学。E-mail: ywbaxia@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 纪平雄(1956—), 男, 副教授, 研究方向为应用化学与生物资源利用。E-mail: xiongpj16591@163.com

无水乙醇、石油醚(60~90℃)、浓盐酸、氨水、氢氧化钠、硫酸铜(均为分析纯试剂)。

JJ300精密电子天平 常熟双杰测试仪器厂; 恒温水浴锅 江苏省金坛市江南仪器厂; UV2550紫外可见分光光度计 日本岛津公司; ACATAR360 FT-IR-670红外光谱仪 美国Nicolet公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 叶绿素的提取

参照文献[12]对蚕沙中的叶绿素进行提取,并按正交试验法得出最佳提取工艺,提取制备糊状叶绿素,按照黄自然等[13]的方法对糊状叶绿素的质量进行检验。

### 1.2.2 叶绿素铜钠盐制备

铜代过程反应机理:  $C_{34}H_{32}O_5N_4Mg \xrightarrow{[Cu(NH_3)_4]SO_4} C_{34}H_{32}O_5N_4Cu$

在碱性条件下,叶绿素酸中的中心镁离子与卟啉环共轭体系结合不稳定,易被取代。且铜氨络合物在碱性条件下易离解,释放出 $Cu^{2+}$ ,由于铜离子的离子半径大于镁离子,它和配体中心可以离得更近,结果静电引力增强,稳定性增加。

取一定量的糊状叶绿素,用约1:5(V/V)倍的石油醚使之溶解,再加入一定浓度的NaOH乙醇溶液,调节pH12~13,65℃水浴皂化,回流。将皂化液移置分液漏斗,按1:20(V/V)加入的石油醚,振摇,静置分层,收集下层墨绿色叶绿素皂化液于500mL圆底烧瓶中,用盐酸调节pH6~8,然后加入配好的铜氨络合物,搅拌滴加氨水,调节pH值,水浴回流1h,进行置铜反应。将反应液过滤,反复水洗得叶绿素铜酸。将叶绿素铜酸溶于丙酮中,加入含有NaOH的乙醇溶液,调pH11~12,析出晶体,晶体经过滤和干燥后得到墨绿色有金属光泽的叶绿素铜钠盐[14-15]。

### 1.2.3 叶绿素铜钠盐制备正交试验设计和数据处理

采取 $L_9(3^4)$ 正交试验法对影响铜代过程的4个因素进行研究,选择乙醇质量分数(A)、pH值(B)、反应温度(C)及加铜量(D)4个主要生产条件作为试验因素。其中每个因素各设3个水平:乙醇质量分数55%、65%、75%;pH10.5、11、11.5;反应温度45、55、60℃水平;加铜量分别为理论加铜量的1.5、2、2.5倍。进行4因素3水平正交试验。并参照文献[12]计算得出置铜率,以置铜率判定反应进行程度。所得结果数据使用SAS统计软件进行分析[16],得出最适工艺条件。

### 1.2.4 叶绿素铜钠盐质量的检定

叶绿素铜钠盐主要质量指标是产品的紫外吸收光谱、最大吸收波长、消光比、特殊消光值、总铜和游离铜,均参照国家标准GB 3262—1982《食品添加剂叶绿素铜钠盐》规定方法进行检验[17-18]。另外以KBr

粉末压片法定性测定了叶绿素铜钠盐红外光谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚕沙中叶绿素含量及质量检验

称取除去杂质的干燥蚕沙5.0g,在一定的时间和温度下用提取液进行提取,并分别在645nm和663nm处用分光光度计测定吸光度。计算叶绿素的含量[12]:

$$C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}, C_b = 22.9A_{645} - 4.68A_{663}$$

$$C_t = C_a + C_b$$

式中: $C_a$ 、 $C_b$ 、 $C_t$ 分别为叶绿素a、叶绿素b的质量浓度及叶绿素总质量浓度/(mg/L)。

$$\text{叶绿素含量}/(\text{mg/g}) = \frac{C_t \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}} = 0.57 \text{mg/g}$$

利用最佳工艺提取的糊状叶绿素,为墨绿色油状物,带有特殊胺类的气味。经过检验,消光比( $A_{405nm}/A_{630nm}$ )=3.36,符合企业标准规定[13]。

### 2.2 工艺条件优化

置铜过程是叶绿素铜钠盐整个生产工艺流程的关键,置铜率的大小直接影响到产品的消光比、特殊消光值、总铜等主要指标。置铜率越低,产品中所含的脱镁叶绿素类化合物就越多,而脱镁叶绿素类化合物呈灰褐色,这样就直接影响到产品的色泽度,甚至使其呈现枯叶黄色,从而影响其作为天然着色剂的产品质量。因此,为了提高产品的置铜率,需对影响铜代过程极显著的4个工艺条件加铜量、醇度、温度、pH值进行优化。首先,加铜量是铜代反应的关键影响因素,加铜量太少会使铜代不完全,导致总铜含量减少,太多则浪费且铜氨络合物中游离铜不易清除,导致产品不合格;乙醇体积分数太低,则叶绿酸不易溶解,太高则会导致叶绿素中所含的脂类溶入过多且铜氨络合物容易析出;pH值偏低,则铜酸黏度过大,导致洗涤过滤困难,且不利于反应的进行,导致难以置铜,偏高则浪费溶剂,且易使溶液中的少量游离铜离子产生沉淀;温度太高影响醇度控制的稳定性,且易使调节pH值的氨水挥发过快,过低则反应不完全。在这4个因素中,以乙醇体积分数和pH值最难控制,是整个生产过程中的难点,两者在生产过程中贯穿全线,直接影响试验结果。因此,选择铜代过程中乙醇质量分数、pH值、反应温度及加铜量4个主要生产条件作为试验因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,试验设计及结果见表1。

从表1数据分析可以得出,第3号试验的生产工艺条件下的置铜率最低,为31.1%,第9号试验的置铜率最高,为59.4%。

表1 叶绿素铜钠盐制备 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平、试验设计及结果

Table 1 Factors and levels of  $L_9(3^4)$  orthogonal array design

试验号	$X_1$ 加铜倍数	$X_2$ 乙醇质量分数/%	$X_3$ 反应温度/℃	$X_4$ pH	置铜率/%
1	1(1.5)	1(55)	1(45)	1(10.5)	42.9
2	1	2(65)	2(55)	2(11.0)	48.9
3	1	3(75)	3(60)	3(11.5)	31.1
4	2(2)	1	2	3	32.9
5	2	2	3	1	38.5
6	2	3	1	2	47.7
7	3(2.5)	1	3	2	50.7
8	3	2	1	3	50.1
9	3	3	2	1	59.4

表2 不同因素对置铜率影响的方差分析

Table 2 Variance analysis of copper replacement rate with various reaction conditions

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
$X_1$	2	1050.406667	525.203333	2399.41	0.0001
$X_2$	2	81.646667	40.823333	186.50	0.0001
$X_3$	2	276.126667	138.063333	630.75	0.0001
$X_4$	2	628.506667	314.253333	1435.68	0.0001

注： $P < 0.05$  为影响显著； $P < 0.01$  为影响极显著。

表3 各因素对置铜率的影响效果分析

Table 3 Duncan's new multiple range test of the effects of various reaction conditions on copper replacement rate

水平	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
1	41.0000 $\pm$ 7.85 <sup>B</sup>	42.2889 $\pm$ 7.91 <sup>B</sup>	46.9556 $\pm$ 3.22 <sup>A</sup>	46.9222 $\pm$ 9.54 <sup>B</sup>
2	39.7000 $\pm$ 6.54 <sup>C</sup>	45.8556 $\pm$ 5.58 <sup>A</sup>	47.0556 $\pm$ 11.57 <sup>A</sup>	49.2556 $\pm$ 1.50 <sup>A</sup>
3	53.5333 $\pm$ 4.41 <sup>A</sup>	46.0889 $\pm$ 12.30 <sup>A</sup>	40.2222 $\pm$ 8.74 <sup>B</sup>	38.0556 $\pm$ 9.12 <sup>C</sup>

使用 SAS 统计软件<sup>[13]</sup>对表1进行分析，由表2可知，加铜量( $X_1$ )、乙醇质量分数( $X_2$ )、反应温度( $X_3$ )、pH 值( $X_4$ )4个因素的尾概率 $P$ 均小于0.01，且均在0.0001水平上，说明它们对置铜率的影响差异极显著。

由表3可知，对影响极显著的各因素使用邓肯氏新复极差检验法(DMRT法)，检验结果表明，加铜量( $X_1$ )以水平3(加铜量为理论值的2.5倍)的效果最好；乙醇体积分数( $X_2$ )中水平1和水平2、3之间差异明显，而水平2和3之间差异不明显，但水平3的效果更好些，因此三者中以水平3(乙醇体积分数75%)的效果最好；反应温度( $X_3$ )以水平2(温度55℃)效果较好；pH值( $X_4$ )以水平2(pH11)的效果最好，水平3效果最差。所以叶绿素铜钠盐最佳工艺条件为加铜量按理论值的2.5倍、乙醇质量分数75%、温度55℃、pH11为生产的最适工艺条件。

相对于传统酸性置铜法制备叶绿素铜钠盐，需要消耗较多的有机溶剂汽油、丙酮和乙醇，且在铜代过程要控制乙醇质量分数85%左右，碱性铜氨法只需控制乙醇的质量分数75%，节约了10%以上的乙醇含量，大大降低了生产成本，提高了生产效率。

### 2.3 叶绿素铜钠盐产品检验结果

按最优工艺条件制备叶绿素铜钠盐3次，所得产品均为墨绿色带金属光泽的粉末，有特殊的胺类气味，易溶于水。所得产品主要指标检验结果见表4，用UV2550紫外可见分光光度计，在300~800nm波长范围内进行光谱扫描，UV光谱特征见图1。

表4 叶绿素铜钠盐产品各项指标测定结果

Table 4 Major quality indexes of sodium copper chlorophyllin

试验号	特殊消光值	消光比	pH值	铜络含量/%	理论铜络含量/%	游离铜/%	置铜率/%
1	625	3.61	9.71	5.55	9.35	0.010	59.36
2	624	3.70	9.65	5.47	9.35	0.009	58.50
3	627	3.76	9.69	5.64	9.35	0.013	60.32

由表4可知，处理1、2、3的叶绿素铜钠盐的各项主要指标均符合国家标准。由图1可知，在405nm和630nm处有两个最大吸收峰，且在405nm处的波峰最高。查文献得叶绿素及其盐有两个最大吸收峰范围404~406nm和629~631nm，而图1的最大吸收峰正好落在文献的最大吸收峰范围内，而且 $A_{405} = 0.624$ ， $A_{630} = 0.173$ ，消光比 $A_{405nm}/A_{630nm} = 3.61$ ，与文献要求相符<sup>[14]</sup>。和叶绿素的紫外吸收谱图比较<sup>[12]</sup>，两者都有两个吸收峰和相似形状，只是叶绿素铜钠盐的吸收峰位置明显蓝移，且叶绿素铜钠盐在630nm的吸收峰与叶绿素在665nm的吸收峰强度相比大大下降，这就是叶绿素铜钠盐的消光比比叶绿素大得多的原因。通过计算特殊消光值、消光比都符合标准，由此可见，所制备的叶绿素铜钠盐纯度高。

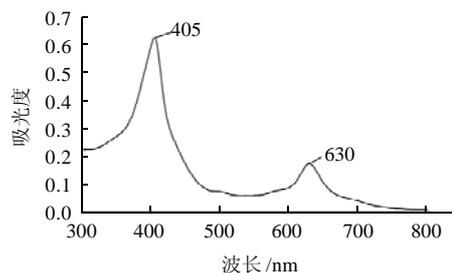


图1 叶绿素铜钠盐的吸收光谱图

Fig.1 UV spectrum of sodium copper chlorophyllin

### 2.4 叶绿素铜钠盐产品的IR光谱检测

由图2可知，3440 $cm^{-1}$ 处为叶绿素铜钠盐中O—Na键的伸缩振动吸收峰，2920 $cm^{-1}$ 和2850 $cm^{-1}$ 为饱和C—H键的非对称和对称伸缩振动峰，1570 $cm^{-1}$ 为C=C双键的伸缩振动吸收峰，1430 $cm^{-1}$ 为—CH<sub>2</sub>—的弯曲振动吸

收峰,  $1061\text{cm}^{-1}$  为  $\text{C}=\text{N}$ 、 $\text{C}-\text{N}$ 、 $\text{C}-\text{C}$  的面内弯曲振动峰,  $662\text{cm}^{-1}$  为  $\text{C}-\text{H}$  键的弯曲振动峰。叶绿素经置铜反应生成叶绿素铜酸后, 在  $1570\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰强度降低并分裂为 2 个弱峰  $1570\text{cm}^{-1}$  和  $1430\text{cm}^{-1}$ 。根据查阅的文献和红外图谱分析可证实制备的化合物具有叶绿素铜钠盐的官能团特征<sup>[19-21]</sup>。

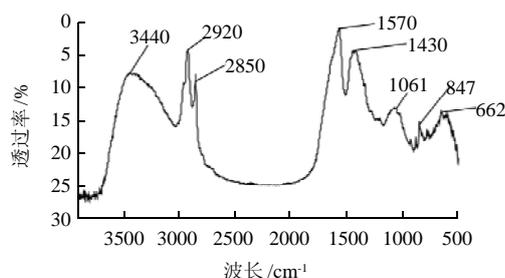


图2 所得叶绿素铜钠盐产品的红外光谱图  
Fig.2 IR spectrum of sodium copper chlorophyllin

### 3 结论

本实验探讨了在碱性条件下利用铜氨置换法合成叶绿素铜钠盐, 通过使用 SAS 统计软件对正交试验结果进行分析, 得出了最适置铜工艺条件: 加铜量为理论值 2.5 倍、乙醇质量分数 75%、温度  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}11.5$ 。

置铜是叶绿素铜钠盐合成的重要步骤, 而置铜过程中乙醇体积分数的把握最为关键。传统方法需控制乙醇体积分数在 85% 左右<sup>[2]</sup>, 而碱性铜氨置换法只需在 75% 左右, 大大降低了乙醇的含量, 可节约生产成本, 本实验结果为企业生产叶绿素铜钠盐提供了重要的理论和实用依据, 有良好的应用前景。

#### 参考文献:

[1] 林秀兰, 郑德勇, 高君强. 香蕉叶制取叶绿素铜钠盐工艺研究[J]. 福建林学院学报, 2000, 20(1): 34-37.  
[2] 胡军华. 蚕粪中提取叶绿素铜钠盐的稳定性研究[J]. 蚕业科学, 2005,

31(3): 370-373.

- [3] LIU S, MANSON J E, LEE I M, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease the Women's Health Study[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(4): 922-9281.  
[4] GOMES B B, BARROS S B M, ANDRADE-WARTHA E R S, et al. Bioavailability of dietary sodium copper chlorophyllin and its effect on antioxidant defence parameters of wistar rats[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(12): 2003-2010.  
[5] 黄持都, 胡小松, 廖小军, 等. 叶绿素研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2007(2): 114-118.  
[6] 卢景顺, 吴贻群, 邓素英, 等. 水葫芦叶制取叶绿素铜钠的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 173-174.  
[7] 黄晓德, 钱骅, 赵伯涛. 西兰花叶叶绿素提取及叶绿素铜钠盐制备工艺研究[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(3): 45-47.  
[8] 丁利君, 周燕芳, 谢晓玲. 芥蓝叶制取叶绿素铜钠盐的工艺参数及其性质研究[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 36-37.  
[9] 丁琳, 张万忠, 刘宁, 等. 以榆树叶制备叶绿素铜钠的工艺条件和稳定性研究[J]. 辽宁化工, 2003, 32(7): 277-279.  
[10] 金春雪, 金晓红, 龙林. 蚕沙中叶绿素的提取及叶绿素铜钠的制备[J]. 信阳师范学院学报, 2000, 13(1): 88-89.  
[11] FERRUZZI M G, BLAKASLEE J D. Igestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives[J]. Nutrition Research, 2007, 27(1): 1-12.  
[12] 喻薇, 欧阳宇, 吴泳麟, 等. 蚕沙制备糊状叶绿素的工艺研究[J]. 广东化工, 2010, 37(3): 73-75.  
[13] 黄自然, 张迎新, 朱祥瑞. 蚕桑综合利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.  
[14] 杨国恩, 陈丛瑾. 毛竹叶叶绿素铜钠的制备[J]. 食品与机械, 2009, 25(2): 128-129.  
[15] AMON D L. Copper enzymes in isolated chloiooplasts, polyphenol oxidase in beta vulgaris[J]. Plant Physiology, 1949(24): 1-15.  
[16] 翁何霞, 张庆远. 在正交试验设计中 SAS 编程处理的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(4): 326-327.  
[17] 方建军. 食品卫生检验新技术标准规程手册[M]. 北京: 光明日报出版社, 2004.  
[18] MORTENSEN A, GEPPPEL A. HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(3): 419-425.  
[19] CASTANO A P, DEMIDOVA T N, HAMBLIN M R. Mechanism in photodynamic therapy part one photo-sensitizers, photochemistry and cellular localization[J]. Photodiagon Ther, 2004(1): 279-293.  
[20] 王爽, 姚秉华. 超声波提取松针叶叶绿素及稳定性研究[J]. 纺织高校基础科学学报, 2010, 23(1): 87-90.  
[21] 朱淮武. 有机分子结构波谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.