

叶绿素钠盐的稳定性及体外抗氧化性活性研究

北京林业大学 占汝真, 武健

(北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系, 北京 100083)

(发表期刊: 食品工业科技, 2014 年第 35 期; Food Technology and Biotechnolog, 2014 年第 52 期)

指导教师: 欧阳杰 副教授

摘要: 以松针为原料提取叶绿素, 再经皂化、纯化和取代反应分别合成叶绿素铜钠盐, 叶绿素锌钠盐和叶绿素铁钠盐, 比较了它们对光、热、pH及氧化剂的稳定性, 结果表明叶绿素铜钠对光照的稳定性最好; 叶绿素锌钠对温度稳定性较好; pH会引起三者的异构化造成吸光值的改变。体外抗氧化性活性测试结果表明, 叶绿素锌钠盐在三者之中显示良好的抗氧化性。在抑制 β -胡萝卜素的漂白能力测定中, 叶绿素锌钠、铁钠、铜钠盐的EC₅₀均小于抗坏血酸; 在O₂⁻清除能力的实验中, 三种盐的抗氧化性都略好于抗坏血酸。

Abstract: Chlorophyll was extracted from pine needles, and then followed by saponification, purification and substitution reaction to synthesize sodium zinc chlorophyllin (SZC) and sodium iron chlorophyllin (SIC), with sodium copper chlorophyllin (SCC) as a control. Moreover, their stabilities to light irradiation, thermal processing, pH and oxidants were determined. The results showed that SCC had the best stability to light irradiation and SZC was stable to high temperature. Different concentrations of hydrogen ion resulted in structural isomerization. SZC revealed good antioxidant properties by presenting much less dosage in all assays. In the β -carotene bleaching assay, EC₅₀ of SZC, SIC and SCC were much less than that of ascorbic acid. SZC, SIC, and SCC showed slightly better results than ascorbic acid in the O₂⁻-scavenging activity.

关键词: 叶绿素铜钠; 叶绿素锌钠; 叶绿素铁钠; 稳定性; 抗氧化性

一、引言

叶绿素是一种从绿叶中提取的天然食用色素, 其安全无毒, 除被广泛用作食品、化妆品的着色剂外, 还具有抗诱变、抗氧化等活性^[1]。叶绿素铜钠盐是联合国粮农组织、世界卫生组织(FAO/WAO)和我国食品添加剂标准委员会批准使用的天然绿色素, 也是我国食品工业中唯一允许使用的绿色素^[2-4]。但基于Cu²⁺的毒性, 如果能将叶绿素制成其它金属盐, 安全性将更高。锌是人体所必需的微量元素, 是体内多种酶的组成部分, 参与机体内的各种新陈代谢, 若将叶绿素改造为叶绿素锌钠盐, 可以使其兼具色素和锌制剂的双重作用^[5]。

作者简介: 占汝真 (1993-), 女, 江西人, 食品科学与工程专业本科生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程。

叶绿素不仅能清除羟基自由基和单线态的氧 (1O_2), 还能通过阻止脂质的氧化损伤来阻止脂类物质的氧化。而且, 叶绿素的金属螯合作用, 更加增强了其作为四吡咯化合物的抗氧化活性, 这些发现都增强了叶绿素的金属络合物作为抗氧化活性物质的可能性。国内外已有针对叶绿素钠盐稳定性的研究, 但将三者进行对比的研究较少。因此, 本研究以松针为原料制备叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠, 并比较它们对光、热、pH 和氧化剂在一段时间内的稳定性, 并进行抗氧化性研究。

二、材料和方法

(一) 材料与仪器

松针采集于北京郊区。硫酸铜、硫酸锌、硫酸亚铁、抗坏血酸、 β -胡萝卜素等化学试剂均为分析纯, 购于北京化学试剂公司。DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼), 购于阿法埃莎(中国)化学有限公司。

UV2550紫外可见分光光度计: 日本岛津公司; iCE 3500原子吸收光谱仪: 赛默飞世尔科技有限公司; 752 紫外可见分光光度计: 上海美谱达仪器有限公司。

(二) 实验方法

1. 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠盐的制备

将新鲜松针用水洗净风干, 粉碎后过 60 目筛即得松针粉。称取 100g 松针粉, 置于 1000mL 烧瓶中, 加入 450mL 无水乙醇和 50mL 水拌匀, 静置 12h, 再用闪式提取器提取 300s, 抽滤; 把滤液转入蒸馏装置浓缩, 55℃减压蒸馏, 蒸至原滤液体积的 1/3。向叶绿素软膏中加入 0.3mol/L NaOH 调节 pH 至 10~11, 65℃皂化 40min, 稍冷却转入分液漏斗中, 加入等体积的石油醚, 激烈振摇, 以萃取其中不皂化物, 静止分层。将得到的叶绿素钠盐用 0.5mol/L HCl 调节 pH 为 6.0~6.5, 65℃搅拌 1h, 此时生成脱镁叶绿素钠。再调节 pH 为 2.0~3.0, 搅拌反应 1h。再滴加 20g/100mL $CuSO_4$ 溶液, 逐渐析出结晶; 当整体颜色由黄绿色变成墨绿色时, 再多加 2~3mL $CuSO_4$ 液体, 结晶 1h, 过滤、水洗、干燥得叶绿素铜酸^[6]。将上述叶绿素铜酸溶于适量丙酮中, 加入 5% NaOH-乙醇溶液, 随着溶液的加入叶绿素铜酸逐渐溶解, 当调至 pH=10.0 时, 又开始变稠, 析出结晶, 调到 pH=11.0 时结晶 1h, 过滤、用丙酮洗涤三次、真空干燥得蓝黑色的叶绿素铜钠结晶^[7]。分别用 $ZnSO_4$ 和 $FeSO_4$ 代替 $CuSO_4$, 以同样的方法分别制备得到墨绿色有金属光泽的叶绿素锌钠和墨色有金属光泽叶绿素铁钠结晶^[8-9]。

2. 叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的稳定性研究

分别将叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠配制成 1×10^{-4} g/mL 的溶液, 分别: a. 置于黑暗、实验室自然光 (500Lux) 和灯箱 (4000Lux) 中; b. 置于 50、60、70、80℃下; c. 各用 HCl 和 NaOH 调节成 pH 为 3.0、5.0、7.0、10.5 和 12.5; d. 以 H_2O_2 (30%) 为氧化剂, 配制含有不同质量分数 H_2O_2 的叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠稀溶液。每隔一定的时间间隔, 分别在其最大吸收波长处测吸光度。

3. DPPH 自由基清除能力的测定

取 2mL 的样品与同体积的 5×10^{-5} mol/L 的 DPPH-乙醇溶液混合, 在黑暗条件下置于 37℃ 的恒温箱中保存 30min, 在 517nm 波长下测量三者的吸光值。自由基清除能力 (RSA) 计算方法: $RSA \% = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{DPPH}}) \times 100$, 其中 $A_{\text{样品}}$ 为样品的吸光值, A_{DPPH} 为 DPPH 溶液的吸光值。对照组将样品换成抗坏血酸, RSA 的 EC_{50} 表示清除率为 50% 所需样品的浓度。

4. 还原力的测定

以无水乙醇为溶剂, 将叶绿素铜钠、锌钠、铁钠盐配制成 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 和 1 mg/mL 五个浓度的溶液。1.5mL 的样品溶液与 2.5 mL 浓度为 0.2 M 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.6) 混合, 并往混合液中加入 2.5 mL 的 1% 铁氰化钾溶液。将上述混合溶液在 50℃ 下反应 20min。分别向反应后的溶液中加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸, 并在 650g 条件下离心 10min。取 5mL 离心后的上清液于等量的蒸馏水中, 并加入 1 mL 0.1% 的氯化铁溶液, 在 700nm 波长下测量其吸光值。

5.抑制β-胡萝卜素漂白的能力的测定

取 2 mg β-胡萝卜素溶解于 50 mL 的氯仿中，向混合溶液中加入 50 μL 的亚油酸和 0.37 mL 的吐温-80 试剂，将该混合液转移进入 500 mL 的圆底烧瓶中，在 40℃ 条件下回转蒸发除去氯仿。当圆底烧瓶中只剩下极少量液体时，停止回转蒸发，并向其中加入 400 mL 蒸馏水并剧烈震荡。取 4.5 mL 的此混合液体分别加入含有 0.5 mL 不同浓度样品溶液的试管中，并在 50 °C 水浴条件下震荡反应。混合液加入试管中的时间记为时间的起始点，每 20min 测一次吸光值，直到样品的颜色变得很浅，包括起始点的所有数据均 470 nm 波长下测定。抑制脂质氧化能力的计算方法： $LPO_{抑制} \% = (A_2/A_1) \times 100$ ，其中 A_1 为最初的吸光值， A_2 为实验 2h 后的吸光值。以没有加入胡萝卜素的一组为空白对照，对照组将样品换成抗坏血酸。 EC_{50} 表示清除率为 50%所需样品的浓度。

6.O₂^{·-}清除能力的测定

超氧阴离子(O₂^{·-})由含有 50 mL pH7.8 磷酸钾缓冲液、7.7×10⁻⁹ M 核黄素、1.3×10⁻² M 蛋氨酸、6.3×10⁻⁵ M NBT 和 1×10⁻⁴ M EDTA 的混合溶液在光照条件下触发生成，15min 光照后，在 560nm 波长下测量溶液的吸光值。

三、结果与讨论

(一) 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的合成及分析

分别用 100g 松针粉为原材料，可分别制得叶绿素铜钠 1.99g，叶绿素锌钠 1.74g，叶绿素铁钠 2.24g。经过原子吸收光谱的测定，三者的金属含量分别为铜 9.00%、锌 9.14%、铁 8.00%，此结果与理论值 8.70%，8.93% 和 7.73%接近。经紫外-可见吸收光谱分析，测定出叶绿素铜钠的最大吸收波长为 402nm，叶绿素锌钠的最大吸收波长为 415nm，叶绿素铁钠的最大吸收波长为 405nm，结果与文献中的结果相近。

(二) 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的稳定性研究

1.光照对叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠稳定性的影响

将叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠放置在不同光照条件下检查其稳定性，结果见图 1。叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠在黑暗条件下稳定性较好，10h 后保存率均在 80%以上；在室内自然光和强光照下，三者均加快分解，其中叶绿素铜钠的稳定性最好。叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的光稳定性明显不如叶绿素铜钠。

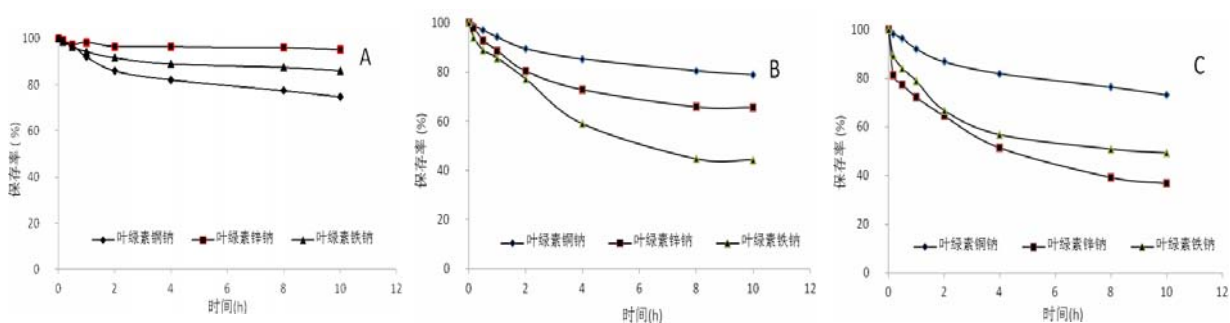


图 1 不同光照条件对叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠稳定性的影响 (A: 黑暗; B: 500lux; C: 4000lux)

2.温度对叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠稳定性的影响

将叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠放置在不同温度下处理，检测其稳定性，结果见图 2。叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠在 50℃ 下稳定性较好，其中叶绿素锌钠的稳定性最好。在 70℃ 以下叶绿素锌钠和叶绿素铜钠的保存率均在 80%以上。叶绿素铁钠对温度的稳定性较差，70℃ 条件下 12h 后保存率只有 57.40%。超过 80℃ 后，三者均分解加剧，溶液褪色^[10-11]。

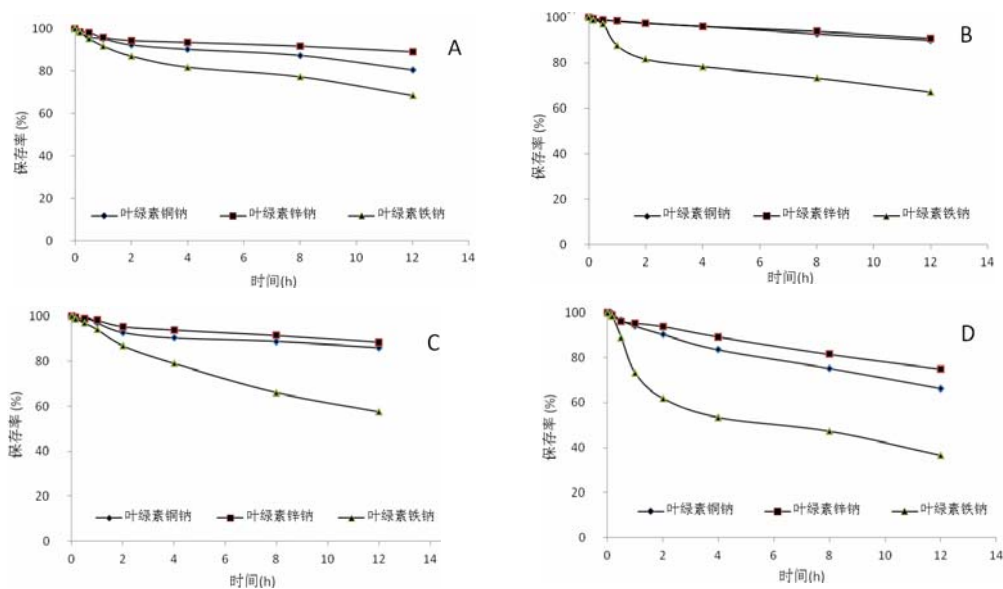


图2 不同温度对叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠稳定性的影响 (A: 50°C; B:60°C; C:70°C; D:80°C)

3.pH 和氧化剂对叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠稳定性的影响

pH 的变化会引起叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的异构化。对于叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠来说 pH 越高, 异构化后得到的物质吸光值越大, 在酸性条件下, 溶液的吸光值降低, 且酸度越高, 溶液的颜色越浅, 吸光值越小。H₂O₂ 会使叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠分解, 且浓度越高分解越剧烈。在不同浓度情况下, 叶绿素铁钠相对较为稳定, 叶绿素铜钠稳定性较差。当 H₂O₂ 的溶液浓度为 0.02%时, 8h 后叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的保存率均在 50%左右; 当 H₂O₂ 的溶液浓度为 0.1%时, 8h 后只有叶绿素铁钠的保存率大于 50%; 当 H₂O₂ 的溶液浓度为 0.5%时叶绿素铜钠只有 21.17%。

(三) 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的体外抗氧化性活性研究

1.叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的 DPPH 清除能力

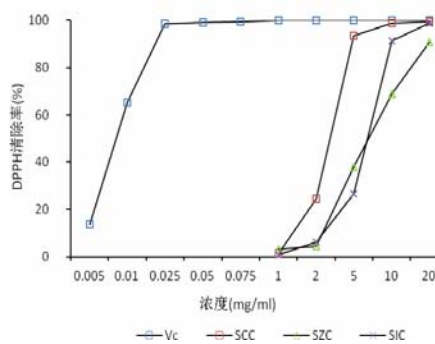


图3 抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠的 DPPH 清除能力关系图

抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力最好, 只需要 2.5×10^{-2} g/mL 的浓度就能达到 98.5% 的清除率, 相比之下, 在浓度均为 10 mg/mL 时, 叶绿素铜钠的 DPPH 自由基清除能力为 98.8%, 叶绿素锌钠的为 69.9%, 叶绿素铁钠的为 91.4% (图 3)。三者之间叶绿素铜钠表现出最好的 DPPH 自由基的清除能力, 在浓度均为 5 mg/mL 时, 叶绿素铜钠的清除能力为 93.5%, 叶绿素锌钠的为 37.9%, 叶绿素铁钠的为 26.5%。DPPH 自由基清除率为 50%时的抗坏血酸的浓度为 9×10^{-3} mg/mL, 叶绿素铜钠的浓度为 2.6 mg/mL, 叶绿素锌钠、铁钠的浓度很接近, 约为 7mg/mL。

2.叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的还原能力

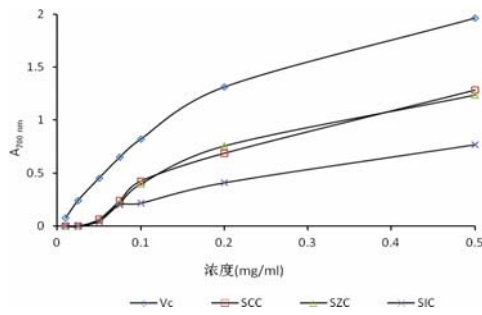


图4 抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠的还原能力关系图

三种样品的还原能力随着溶液浓度的增高而增强，且还原能力都很强。在四种溶液的浓度均为0.5mg/mL时，除了叶绿素铁钠，剩余三种溶液的吸光值均在1.0以上，并且叶绿素铜钠和叶绿素锌钠呈现相似的吸光值，但仍均低于抗坏血酸的吸光值（图4）。有研究指出还原能力与还原酮的存在有关，并且是通过提供一个氢原子来破坏自由基间的原子键实现的。然而叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的还原能力并不是靠提供氢离子来实现的，而有可能是阻止了亚油酸的氧化或是阻止了氢过氧化物的分解来达到的。

3. 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的抑制β-胡萝卜素的漂白能力

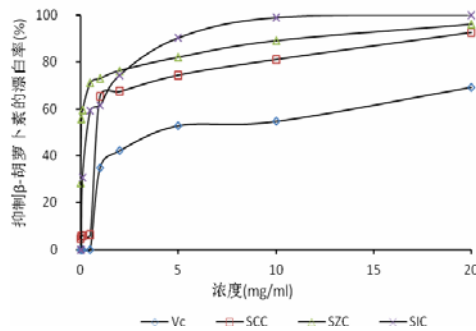


图5 抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠的抑制β-胡萝卜素漂白的能力关系图

三种样品均表现出很好的抗氧化性，当样品的浓度只有5 mg/mL时，抗坏血酸的抗氧化率为52.8%，叶绿素铜钠、锌钠和铁钠的抗氧化率分别为74.4%、82.0%和90.2%（图5）。叶绿素铜钠、锌钠、铁钠盐均可能通过中和反应体系中产生的亚油酸的自由基和其他自由基来抑制β-胡萝卜素的漂白。当抗氧化能率为50%时，抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的浓度分别为4.0、0.04、0.38和0.90 mg/mL。显然，三种样品在此试验中的抗氧化能力均好于抗坏血酸且叶绿素锌钠的能力最为突出。

4. 叶绿素铜钠、锌钠、铁钠的β-胡萝卜素的O₂[·]清除能力

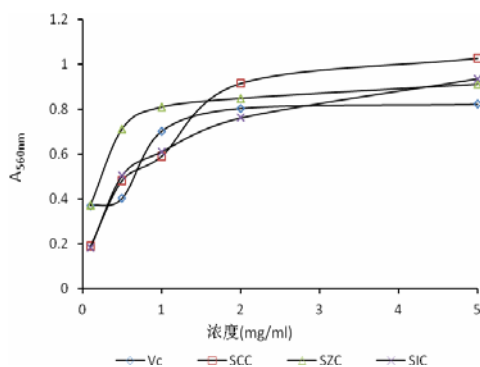


图6 抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠的O₂[·]清除能力关系图

由图 6 可以看出, 样品 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力随着溶液浓度升高而增强, 且抗坏血酸、叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力均较好。在溶液浓度为 1mg/mL 时, 四者的吸光值均大于 0.5, 且叶绿素铜钠表现出略强于抗坏血酸的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力。

四、结论

叶绿素铜钠的光稳定性较好, 叶绿素锌钠对温度的稳定性好, 叶绿素铁钠对氧化稳定性较好。由松针提取出叶绿素并合成出的叶绿素铜钠、叶绿素锌钠、叶绿素铁钠均表现出一个与剂量成正比的体外抗氧化活性。在抑制 β -胡萝卜素的漂白作用和 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力这两个实验中, 叶绿素铜钠、叶绿素锌钠和叶绿素铁钠三者均表现出比抗坏血酸还要好的体外抗氧化活性, 特别是叶绿素锌钠。但在 DPPH 自由基的清除试验中, 这三种盐虽然能表现出抗氧化活性, 但若想达到相同的抗氧化效果, 叶绿素铜钠的用量上却大约为抗坏血酸的十倍, 叶绿素锌钠和叶绿素铁钠的用量则更多。

参考文献

- [1] Pimentel E, Cruces M, Zimmering S. A study of the inhibition/promotion effects of sodium-copper chlorophyllin (SCC)-mediated mutagenesis in somatic cells of *Drosophila* [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, 722(1): 52-55.
- [2] 杨立荣, 胡斌, 韩兆熊, 等. 叶绿素铜钠盐的制备[J]. *浙江大学学报*, 1998, 32(6):745-752.
- [3] Tadashi Kunieda, Toyoki Amano, Yuzo Shioi. Search for chlorophyll degradation enzyme, Mg²⁺-chelataase, from extracts of *Chenopodium album* with native and artificial substrates [J]. *Plant Science*, 2005, 169:177-183.
- [4] Simon D, Hellwell S. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae [J]. *Water Research*, 1998, 32(7): 2220-2223.
- [5] 王效山. 新型食品添加剂叶绿素锌研究[J]. *食品科学*, 1995(9): 48-49.
- [6] Owen R, Fennema. *Food Chemistry* [M]. Beijing: Light industry Press, 2003: 552-557.
- [7] 张海英, 蒋申蓉, 朱嘉玉, 等. 荷叶叶绿素铜钠盐的制备和稳定性研究[J]. *内江师范学院学报*, 2010, 25(10):55-57.
- [8] 曾家豫, 武伟国, 孔维宝, 等. 红三叶叶绿素锌钠的制备及其稳定性研究[J]. *西北师范大学学报*, 2012, 48(6):82-88.
- [9] 李祥, 文星, 房媛, 等. 叶绿素铁钠盐的制备[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(4):77-81.
- [10] 王修东, 楼飞群, 贾天亮, 等. 叶绿素铜钠稳定性影响因素研究[J]. *中国药业*, 2012, 21(14):20-21.
- [11] Ferruzzi M G, Schwartz S J. Thermal degradation of commercial grade sodium copper-chlorophyllin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18):7098-7102.