

浊点萃取法结合超声波提取连翘叶中叶绿素

栗亚云, 陈廷贵*, 张立伟

化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西大学分子科学研究所, 太原 030006

摘要: 本实验以连翘叶为材料, 首次对浊点萃取法结合超声波提取叶绿素进行了研究。首先采用单因素考察及正交试验筛选, 以 665 nm 处的吸光度值作为考察指标, 得叶绿素最佳提取条件是: Triton X-114 浓度为 4%, 超声时间为 11 min, 料液比为 1:10; 其次对该提取方法与传统提取方法进行比较, 得叶绿素的提取率比传统有机溶剂提取法提高了 9.92%, 与超声波提取法相比, 提取率提高了 11.58%。本研究为叶绿素的提取提供了一种新的方法, 该方法提取温度低(室温)、提取过程不使用挥发或有毒溶剂, 具有经济、安全、高效、简便、省时、环保等优点, 且适用于任何绿色植物茎和叶中叶绿素的提取。

关键词: 连翘叶; 浊点萃取; 超声波提取; 叶绿素; 紫外可见分光光度法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.005

Extraction of Chlorophyll from *Forsythia suspensa* Leaves Using Cloud Point Extraction Coupled with Ultrasonication

LI Ya-yun, CHEN Ting-gui*, ZHANG Li-wei

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Extraction of chlorophyll from *Forsythia suspensa* leaves using cloud point extraction coupled with ultrasonication was investigated in the present study. Single factor test and orthogonal design were used to determine the optimal conditions with absorbance values of 665 nm as the index of evaluation. The optimal conditions for the extraction of chlorophyll were as follows: Triton X-114 concentration of 4%, ultrasonic power of 250 W, ultrasonic time of 11 min, and solid-liquid ratio of 1:10. Comparing the developed extraction method with the traditional organic solvent extraction methods and ultrasonic extraction method, the extraction rate improved 9.92% and 11.58%, respectively. This study provided a new method for the extraction of chlorophyll with the following advantages: low temperature (room temperature) of extraction, no using volatile or toxic organic solvents, economical, safe, efficient, convenient, time-saving, environmental protection, etc. In addition, the method can be applied for the extraction of chlorophyll from other natural resources.

Key words: *Forsythia suspensa* leaves; cloud point extraction; ultrasonic extraction; chlorophyll; UV-VIS spectrophotometry

叶绿素用途非常广泛, 可用于医药、保健品、化妆品、食品色素以及化工等领域^[1,4]。在药用方面, 叶绿素是强抗氧化剂, 可防止各种氧自由基所造成的氧化损害, 从而减少 DNA 损伤^[5,6]; 此外, 叶绿素还能有效抑制黄曲霉毒素的致癌效应, 具有显著的抗癌作用^[7,8]; 同时叶绿素以及叶绿素铜钠盐等还具有抗贫血、抗溃疡、抗菌、抗病毒、保肝排毒等诸多药理作用^[9]。在化妆品方面, 近年来人工合成色素导致皮肤病急剧增加, 由合成色素而引起的皮肤功能障碍占 43.9%, 长期使用会使皮肤对光线敏感, 从

而导致色素沉着, 还伴有皮肤潮红、丘疹等炎症现象^[10]。在食品色素方面, 国内由于苏丹红事件, 合成色素受到严格的限制, 美国批准的合成色素从 700 种锐减到了 7 种^[11], 人们越来越多的开始重视天然色素的研究应用。除上述应用之外, 叶绿素还可应用于军事伪装和光动力学治疗癌症等方面^[12,13]。

常用的叶绿素的提取方法, 主要有以下几种: 丙酮研磨法、溶剂加热提取法、浸渍压榨法、超声波提取法、微波辅助提取法、超临界流动萃取法和生物工程法等。溶剂提取法最常使用, 该方法工艺简单, 但试剂用量大。浸渍压榨法浸渍时间长, 产品得率低, 溶剂消耗量也很大。超临界流体萃取法萃取温度低、速度快, 但超临界萃取设备投资费用过高, 影响

其应用推广。生物工程法步骤多,工作量较大^[14]。上述各方法提取所使用的溶剂一般包括乙醇、丙酮、苯、氯仿、乙醚、石油醚等有机溶剂,这些溶剂易燃、易爆、有挥发性,有的还有毒性,安全性差^[2,15,16]。

浊点萃取技术(Cloud Point Extraction, CPE),以水代替有机溶剂作为萃取剂,通过加入少量表面活性剂产生浊点现象而实现高效提取^[17,18]。连翘叶为木犀科连翘属植物连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl] 的叶子,连翘作为一种常用中药,具有抗炎、抗病毒、解热、抗肝损伤、抑制 cAMP 磷酸二酯酶等作用,我国连翘年产量约在 7500 吨左右^[19,20],资源丰富,人们在对连翘果实利用的同时往往忽略了叶子的利用,造成资源的极大浪费,因此开发连翘叶具有重要意义。

本研究首次使用 Triton X-114 水溶液作为提取溶剂,结合超声波技术,以连翘叶为例提取叶绿素,取得了成功。该方法打破了长期以来只能使用有机溶剂提取叶绿素的限制,为叶绿素的开发利用提供了一种经济、安全、高效、简便、省时、环保新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

连翘叶,采于山西大学校园内,经山西大学张立伟教授鉴定为木犀科连翘属植物连翘的叶子。采样后,将新鲜连翘叶洗净、沥水,摊开放置于阴凉处,阴干,粉碎。

Triton X-114 购买于 Solarbio 科技有限公司,95% 乙醇、无水乙醇等均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

微型高速万能试样粉碎机(黄烨市齐家荣科学仪器厂)、OHAUS CP114 电子天平(美国奥豪斯仪器有限公司)、KQ-250 DB 数控超声波清洗器(巩义市英峪予华仪器厂)、SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂)、Varian Cary 50 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司)、10 mm 石英荧光比色皿(江苏晶禾光学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 叶绿素浊点萃取

准确称取连翘叶粉末 10 g,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 5% 的 Triton X-114 水溶液,盖塞,振荡混匀,250 W 超声处理 15 min,抽滤,得滤液,将其倒入分液漏斗,静置分层,去除下层水相,取上层表面活性剂富集相。加入 30 mL 95% 乙醇以降

低体系粘度,用 0.45 μm 滤膜过滤除去 Triton X-114,将滤液浓缩,得叶绿素浸膏。

取少量叶绿素浸膏溶于 95% 乙醇,用紫外可见分光光度计对 400 ~ 800 nm 波段进行扫描,然后根据 Amon 公式对叶绿素含量进行计算^[2]。

1.3.2 单因素考察

1.3.2.1 Triton X-114 浓度的确定

准确称取 0.5 g 连翘叶粉末 6 份,分别置于 10 mL 锥形瓶中,依次加入 5 mL 浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、8% 的 Triton X-114 水溶液,盖塞,振荡混匀,250 W 超声处理 15 min,抽滤,将滤液转移至 250 mL 容量瓶中,用 95% 乙醇定容,分别测定其在 665 nm 处的吸光度值。重复 3 次实验。

1.3.2.2 超声时间的确定

按上述方法,设定料液比为 1:10, Triton X-114 水溶液浓度为 4%,分别测定超声时间为 8、10、13、15、18、20 min 时,665 nm 处的吸光度值。重复 3 次实验。

1.3.2.3 料液比的确定

按上述方法,设定 Triton X-114 水溶液浓度为 4%,超声时间为 13 min,分别测定料液比为 1:6、1:8、1:10、1:12、1:15 时,665 nm 处的吸光度值。重复 3 次实验。

1.3.3 正交试验设计

根据各单因素实验所得的 Triton X-114 浓度、超声时间、料液比 3 个因素的最佳条件,进行三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验,设计结果见表 1。

表 1 正交试验水平因素

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factors		
	A Triton X-114 浓度 Triton X-114 concentration(V/V)	B 超声时间 Ultrasonic time(min)	C 料液比 Solid-liquid ratio(W/V)
1	3%	11	1:8
2	4%	13	1:10
3	5%	15	1:12

1.3.4 与传统溶剂提取法和超声波提取法比较

准确称取 0.5 g 连翘叶粉末 3 份,置于锥形瓶中,分别按照本实验提取方法、刘邻渭等^[4]的传统溶剂提取法和超声波提取法(以乙醇替代本实验提取方法中的提取溶剂,其它条件不变)提取叶绿素,提取完毕后,分别将提取液转移至 250 mL 容量瓶

中,用95%乙醇定容,测定其在665 nm处的吸光度值。重复3次实验。

2 结果与讨论

2.1 叶绿素提取物光谱分析

用紫外-可见吸收分光光度计对实验所得叶绿素提取物进行扫描,得紫外可见吸收光谱如图1。由图可知提取液在665 nm处有明显的吸收峰,610、430、410 nm处均有吸收峰,与文献报道叶绿素a出峰位置一致,因此可判定该提取方法成功地从连翘叶中提取到了叶绿素。本文选用665 nm处的吸光度值作为进一步分析叶绿素提取效率高低的指标。

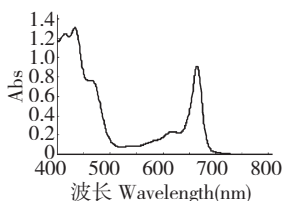


图1 连翘叶提取物紫外可见吸收光谱图

Fig. 1 UV-VIS spectrum of *F. suspensa* leave extract

2.2 单因素筛选结果

对该提取方法中的Triton X-114浓度、超声时

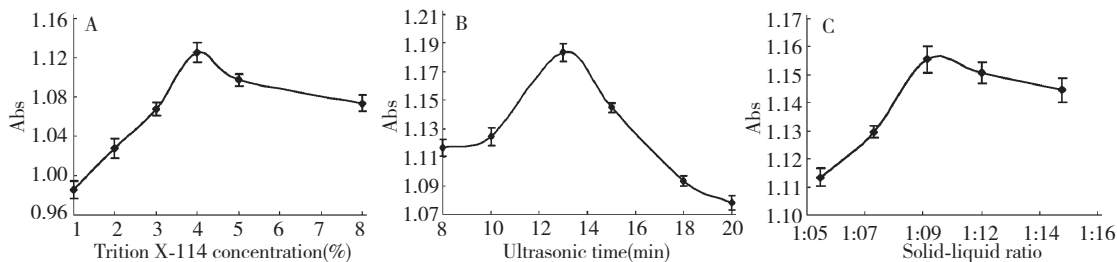


图2 Triton X-114浓度(A)、超声时间(B)、料液比(C)对叶绿素提取效果的影响

Fig. 2 Effects of Triton X-114 concentration (A), ultrasonic time (B), Solid-liquid ratio (C) on the extraction yield of chlorophyll

2.3 正交试验结果

采用Minitab软件设计 $L_9(3^3)$ 正交试验,对其结果进行方差分析,结果见表2、表3。

表2 正交试验结果分析
Table 2 Orthogonal test results

试验号 No.	Triton X-114 浓度 Triton X-114 concentration (A)	超声时间 Ultrasonic time (B)	料液比 Solid-liquid ratio (C)	吸光度 Absorbance
1	1	1	1	1.1554
2	1	2	2	1.0951
3	1	3	3	0.9375
4	2	1	2	1.1556
5	2	2	3	1.1405

6	2	3	1	1.0813
7	3	1	3	1.0953
8	3	2	1	1.0967
9	3	3	2	1.1367
K_1	3.1880	3.4063	3.3334	
K_2	3.3774	3.3323	3.3874	
K_3	3.3287	3.1555	3.1733	
\bar{K}_1	1.0627	1.1354	1.1111	
\bar{K}_2	1.1258	1.1108	1.1291	
\bar{K}_3	1.1096	1.0518	1.0578	
R	0.0631	0.0836	0.0713	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源 Sources of variation	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P
A	0.006424	2	0.003212	0.63	>0.05
B	0.011071	2	0.005535	1.08	>0.05
C	0.008258	2	0.004129	0.81	>0.05
误差 Error	0.010204	2	0.115102		

从表2中可知,因素A(Triton X-114浓度)的K值: $K_2 > K_3 > K_1$;因素B(超声时间)的K值: $K_1 > K_2 > K_3$;因素C(料液比)的K值: $K_2 > K_1 > K_3$;说明最优水平为: $A_2B_1C_2$ 。在所选因素水平范围内,因素B的极差R最大,因此超声时间是主要影响因素;其次是因素C和A,故各因素对叶绿素得率的影响程度依次为 $B > C > A$ 。

从表3,F值大小依次为 $B > C > A$,与极差分析结果一致。各因素对实验结果均无显著性影响。因此,浊点萃取法结合超声波提取叶绿素的最佳条件为 $A_2B_1C_2$,即Triton X-114浓度为4%,超声时间为

11 min,料液比为1:10。

以正交试验所得最佳提取条件重复提取3次,检测得665 nm处的平均吸光度值为1.1805,计算得叶绿素平均提取率为6.65 mg/g,详见表4。

2.4 与传统方法和超声波提取法比较讨论

按“1.3.4”项方法进行实验,重复3次,结果如表4所示。从表中可知,该提取方法与传统工艺相比,平均提取率提高了9.92%,同时该方法具有安全、无污染、经济、省时、无需加热、节约能源等优点;与超声波提取法相比,在相同条件下,平均提取率提高了11.58%。

表4 不同提取方法提取叶绿素比较

Table 4 Comparison of different chlorophyll extraction methods

方法 Method	溶剂 Solvent	温度 Temperature	提取时间 Extraction time	吸光度值 Absorbance	提取率 Extraction rate (mg/g)
本实验方法 The developed method	4% Triton X-114	室温 RT	11 min	1.1805 ± 0.05	6.65 ± 0.43
传统方法 Traditional method	80% 乙醇 80% Ethanol	50 °C	2 h	1.0746 ± 0.02	6.05 ± 0.17
超声波提取 Ultrasonic extraction	无水乙醇 Ethanol	室温 RT	11 min	1.0489 ± 0.02	5.96 ± 0.17

3 结论与展望

本研究提供了一种新的提取叶绿素的方法。首

先,本提取方法以Triton X-114水溶液为提取剂,具有工艺设备简单、不使用挥发性有毒试剂、安全、环保、省时、无需加热、节约能源、提取率高等优点,这

为企业安全、经济、高效生产叶绿素提供了保证。其次,连翘以果实入药,但连翘叶大都被弃之不用,造成了资源的极大浪费,本研究从连翘叶中提取叶绿素,为综合开发连翘资源打下了基础。第三,对于含叶绿素茎叶的中草药,要提取它们的有效成分,首要任务就是去除叶绿素,本研究为去除连翘叶及其它中草药中叶绿素提供了一种新手段。第四,该方法适用于从任何含叶绿素的植物的茎和叶中提取叶绿素,且使叶绿素的获取变得更加容易,这将会促进叶绿素在医药、保健品、化妆品、食品色素以及化工等领域的广泛应用。

参考文献

- Xie HB(谢惠波), Yang ZW(杨宗伟), Chen L(陈丽), *et al.* Natural pigment-a review on the extraction, development and utilization of chlorophyll. *China Food* (中国食品工业), 2010, 2: 58-60.
- Huang CD(黄持都), Hu XS(胡小松), Liao XJ(廖小军), *et al.* The advancement of chlorophyll. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2007, 3: 114-118.
- Huang SW(黄寿吾). Pharmacology and clinical application of chlorophyll. *Food Drug A* (食品与药品 A), 2006, 8(4): 5-8.
- Liu LW(刘邻渭), Yuan L(袁琳), Sun LF(孙丽芳), *et al.* Comparison of extraction rates, stabilities and application properties of chlorophyll from 8 kinds of leaves. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2012, 1: 245-249.
- Cervantes B, Yahia EM, Victoria C, *et al.* Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeno peppers at intermediate stages of ripening. *Food Chem*, 2014, 146: 188-196.
- Ursula M, Lanfer M, Rosa MC, *et al.* Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res Int*, 2005, 38: 885-891.
- Mario G, Ferruzzi, Joshua BD, Absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutr Res*, 2007, 27: 1-12.
- Patricia AE, Wang JB, Zhu YR, *et al.* Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *P Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14601-14606.
- Zheng GD(郑国栋), Ouyang W(欧阳文), Yan M(颜苗), *et al.* The pharmacological advancement of chlorophyll and its derivatives. *Cent South Pharm* (中南药学), 2006, 4: 146-148.
- Wu J(吴晶), Huang L(黄澜), Lv GY(吕圭源), *et al.* Review in the research of pharmacological activities of natural pigment. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16: 915-916.
- Shen GQ(沈国强), Yang CX(杨春霞), Zhang D(张栋), *et al.* Research and development of nature colorant (dyestuff). *Dyest Color* (染料与染色), 2009, 46: 7-10.
- Yang YJ(杨玉杰), Hu BR(胡碧茹), Wu WJ(吴文健), *et al.* Stabilization and camouflage application of chlorophyll. *J Funct Mater* (功能材料), 2011, 42: 374-376.
- Liu XP(柳新平), Wang XM(王新明), Zhou KW(周开文), *et al.* The advancement of chlorophyll in cancer prevention and treatment progress. *Chin J Clin Oncol Rehab* (中国肿瘤临床与康复), 2007, 14: 269-271.
- Hui QS(惠秋沙). Outline of research on natural pigments. *J North Pharm* (北方药学), 2011, 8(5): 3-4.
- Meng QY(孟庆廷). Research Development on Production and Stability of Chlorophyll. *Hebei Chem Eng Ind* (河北化工), 2009, 32(3): 2-3.
- Guan JY(关锦毅), Hao ZB(郝再彬), Zhang D(张达), *et al.* A review on the extraction, detection and Biological function of chlorophyll. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 2009, 40: 130-134.
- Zain NNM, Abu BNK, Mohamad S, *et al.* Optimization of a greener method for removal phenol species by cloud point extraction and spectrophotometry. *Spectrochim Acta A*, 2014, 118: 1121-1128.
- Liu TT, Cao P, Geng JP, *et al.* Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography. *Food Chem*, 2014, 142: 358-364.
- Yan LL(闫丽丽), Jiang Y(姜颖). The summary of the main chemical components and pharmacological activity research of *Forsythia* medicinal. *China New Technol Prod* (中国新技术新产品), 2011, 11: 11.
- Li HP(李焕普). May have one thousand toud gap of *Forsythia* supply this year. *J Chin Tradit Med* (中国中医药报), 第 2549 期.
- Ma HY(马海燕), Zhang M(张愨), Sun JC(孙金才). The application study of ultrasonic-ozone combined treatments in quick-frozen *Broccoli*. *J Food Sci Biotech* (食品与生物技术学报), 2010, 29: 538-543.
- Wang LJ(王立娟). Technology for extracting chlorophyll from leaves of *Syringa oblata* L. by ultrasonic- assisted method. *T CSAE* (农业工程学报), 2001, 25: 171-174.