

# 超声辅助提取螺旋藻粉中叶绿素 a 的工艺研究

房家祥\*, 李跃彬, 邱清莲, 蔡伟江  
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 对超声辅助提取螺旋藻粉中的叶绿素 a 工艺进行优化。**方法** 设计 4 因素 3 水平进行正交实验, 即以提取时间、提取溶剂浓度、料液比和提取温度为实验因素, 每个实验因素设计 3 个水平。通过分析极差和均值, 筛选出最优的提取工艺条件。**结果** 最佳工艺条件如下: 超声时间 50 min, 乙醇浓度 80%, 超声温度 35 °C, 料液比 35:50(m:V)可以达到较理想的提取效果, 其中乙醇浓度和超声时间是影响提取叶绿素 a 的主要因素, 其次分别为超声温度和料液比。**结论** 本研究筛选出的超声辅助提取条件准确、重现性好, 可适用于螺旋藻粉中叶绿素 a 含量的测定。

**关键词:** 螺旋藻粉; 叶绿素 a; 超声辅助提取法

## Research on ultrasonic assisted extraction of chlorophyll a from *Spirulina* powder

FANG Jia-Xiang\*, LI Yue-Bin, QIU Qing-Lian, CAI Wei-Jiang  
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the ultrasonic assisted extraction of chlorophyll a from *Spirulina* powder. **Methods** The orthogonal experiment of 4 factors and 3 levels was designed. The extraction time, extraction solvent concentration, solid-liquid ratio and extraction temperature were regarded as the 4 experimental factors with each experimental factor designed for 3 levels. The optimum extraction conditions were carried out by analyzing the means and extreme values. **Results** The optimum process conditions were as follows: the ultrasonic time was 50 min, ethanol concentration was 80%, ultrasonic temperature was 35 °C and solid-liquid ratio was 35: 50 (m:V), which could achieve good extraction effect. The concentration of ethanol and time were known as the main influencing factors for the extraction of chlorophyll a, followed by ultrasound temperature and liquor ratio. **Conclusion** The ultrasound-assisted extraction conditions screened in this study is accurate, reproducible, which is suitable for the determination of chlorophyll a in *Spirulina* powder.

**KEY WORDS:** *Spirulina* powder; chlorophyll a; ultrasonic assisted extraction

## 1 引言

螺旋藻是大规模工业化生产的微藻类之一, 是有 35 亿年生命史的稀有藻类生物, 也是一种天然食品, 其蛋白质含量高, 氨基酸组成模式十分平衡合理, 而且富含人体自身不能合成的 8 种必需氨基酸, 其营养价值是其他植物

蛋白不可比拟的, 不饱和脂肪酸含量较多, 矿物质及维生素含量丰富, 具有防癌抗癌、防治心血管疾病、抗老防衰等多种功效<sup>[1]</sup>。螺旋藻中含有叶绿素 a、类胡萝卜素和藻蓝素等天然色素。叶绿素 a 呈深绿或墨绿色油状或糊状, 不溶于水, 易溶于乙醇、丙酮、二甲基亚砷等有机溶剂。叶绿素 a 的结构决定了其性质的不稳定性, 对光、热、酸、

\*通讯作者: 房家祥, 食品中级检验员, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: fangjasean@qq.com

\*Corresponding author: FANG Jia-Xiang, Food Intermediate Inspector, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: fangjasean@qq.com

碱敏感。螺旋藻叶绿素 a 含量大约占有有机物干质量的 1%~2%, 可作为估计藻类的生物量和生产力的重要指标。

早在 1818 年叶绿素就被人们系统研究, 于 1933 年确定其中叶绿素 a 的结构<sup>[2]</sup>, 因此提取螺旋藻中叶绿素 a 的工艺条件, 决定了最终的提取效果, 同时很大程度上影响检测效率<sup>[3]</sup>。目前叶绿素 a 的提取工艺主要包括有机溶剂浸泡式提取、超声辅助提取和微波辅助提取<sup>[4]</sup>等。溶剂浸提法是利用有机溶剂通过渗透、湿润、对流扩散和分子扩散等作用将微藻中的油脂溶解在溶剂中, 再通过分离浸提溶剂和油脂进而得到粗脂<sup>[5]</sup>。该工艺的缺点是耗时较长, 效率相对较低。而超声辅助提取工艺由于超声波具有空化效应和机械作用, 具有提取时间短、效率高的优势。

有研究表明, 影响螺旋藻粉中叶绿素 a 提取的主要因素为提取时间和提取溶剂浓度。因此本研究通过单因素设计实验, 在提取温度、提取溶剂、料液比均不变的条件下, 改变提取时间和提取溶剂浓度, 对比相应条件下的提取效率, 从而得出比较高效的提取工艺, 再结合正交设计实验摸索出最优的提取组合条件。考虑到混合试剂对检测效率及成本的影响, 本研究对螺旋藻中叶绿素 a 的提取采用单一溶剂。叶绿素易溶于乙醇、丙酮、二甲基亚砜等有机溶剂, 且在不同溶剂中的溶解效果也各有不同<sup>[6]</sup>, 故本研究选择了乙醇和丙酮的单一溶剂的提取工艺<sup>[7-15]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器和试剂

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司); KQ-500VDE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); GDE 恒温水浴锅(意大利 VELD 公司)。

螺旋藻粉(美国地升有限责任公司); 无水乙醇、无水丙酮、乙醚(分析纯, 广州化学试剂厂); 无水硫酸钠(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 螺旋藻粉中叶绿素 a 的超声辅助提取法

准确称取 30mg 螺旋藻粉, 置于离心管中, 加入 50 mL 提取溶剂, 在 35 °C 避光条件下超声提取叶绿素 a。一段时间后, 停止提取, 将提取液转移入 500 mL 的分液漏斗中。然后加入 50 mL 乙醚进行萃取, 再以 100 mL 纯化水进行洗涤, 洗涤 2 次, 弃下层液。收集乙醚层液于 100 mL 棕色容量瓶中, 用少量无水硫酸钠过滤收集, 然后用乙醚定容至 100 mL, 作为样液待用。

#### 2.2.2 螺旋藻粉中叶绿素 a 的含量测定

目前应用较广的叶绿素 a 含量测定技术主要包括紫外可见分光光度法和高效液相色谱法。其中紫外可见分光光度法主要是应用 Arnon 计算公式进行含量计算<sup>[7]</sup>。

#### 2.2.3 单因素设计筛选提取溶剂

设定提取温度为 35 °C, 料液比为 35 mg:50 mL(*m:V*),

提取时间为 60 min, 通过比较无水乙醇、50 % 乙醇、无水丙酮和 50 % 丙酮的提取效果, 初步筛选较优的提取溶剂。

#### 2.2.4 单因素设计筛选提取时间

设定提取温度为 35 °C, 料液比为 35 mg:50 mL(*m:V*), 采用以上得出的较优的提取溶剂, 通过改变不同时间的提取, 绘制提取值随时间的变化曲线, 得出最佳的提取时间点。

#### 2.2.5 正交设计筛选最优提取组合条件

设计 4 因素 3 水平进行正交实验, 即以提取时间、提取溶剂浓度、料液比和提取温度为实验因素, 每个实验因素设计 3 个水平, 进行 9 组实验。通过比较各因素的极差值, 得出各因素对实验的影响大小顺序, 然后取各因素中平均值较高的水平为最优条件。

#### 2.2.6 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按最佳提取方式与提取条件制备处理供试品, 并测定样品中叶绿素 a 的含量, 计算其相对标准偏差。

#### 2.2.7 稳定性实验

精密称取样品 1 份, 按最佳提取方式与提取条件制备处理供试品, 在 0、10、20、30、60、90 和 120 min 后分别检测样品含量, 并计算其相对标准偏差 RSD(%)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 叶绿素 a 含量测定波长的选择

由于螺旋藻粉中的可溶于有机溶剂的天然色素主要有叶绿素和类胡萝卜素, 其中类胡萝卜素的吸收区在蓝光区, 而叶绿素 a 的吸收在 660 nm 左右的红光区, 因此选择分光光度计测定叶绿素 a 含量是可行的。如图 1 所示, 以无水乙醇、无水丙酮为提取溶剂的得到叶绿素 a 溶液, 在 660 nm 处均有最大吸收峰。

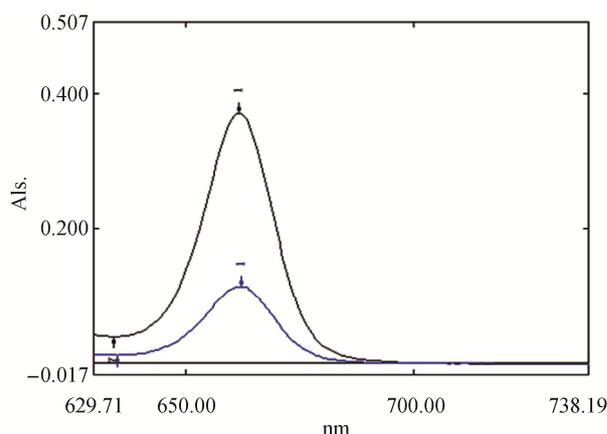


图 1 以无水乙醇、无水丙酮为提取溶剂的叶绿素 a 溶液的光谱图  
Fig. 1 The spectrogram of chlorophyll a extracted by anhydrous ethanol and acetone

### 3.2 单因素实验结果

比较无水乙醇、50%乙醇、无水丙酮和 50%丙酮的提取效果,由表 1 可知,乙醇作为提取溶剂的效果优于丙酮。

表 1 提取溶剂对提取效果的影响  
Table 1 Effect of solvent extraction on the extraction

提取溶剂	无水乙醇	50%乙醇	无水丙酮	50%丙酮
叶绿素 a 含量(g/kg)	12.1	7.9	6.1	4.8

以无水乙醇为提取溶剂,其余条件均不变,改变不同时间。超声时间对提取率的影响见表 2,由表 2 可知,从 30

表 2 超声时间对提取效果的影响  
Table 2 Effect of ultrasonic time on the extraction

超声提取时间(min)	10	20	30	40	50	60	70
叶绿素含量(g/kg)	9.8	10.9	12.4	12.3	12.6	12.2	12.5

表 3 乙醇浓度对提取效果的影响  
Table 3 Effect of ethanol concentration on the extraction results

乙醇浓度(%)	叶绿素 a 含量(g/kg)	乙醇浓度(%)	叶绿素 a 含量(g/kg)	乙醇浓度(%)	叶绿素 a 含量(g/kg)
10	0.1	55	11.3	80	12.8
20	0.2	60	12	85	12.7
30	0.5	65	12.3	90	12.6
40	3.8	70	12.4	95	12.4
50	7.9	75	12.5	100	12.5

表 4 4 因素 3 水平正交表  
Table 4 Orthogonal table of 4 factors and 3 levels

水平	超声时间(min)	乙醇浓度(%)	超声温度(°C)	料液比(mg:mL)
1	40	60	30	25:50
2	50	80	35	30:50
3	60	100	40	35:50

表 5 正交实验结果  
Table 5 Orthogonal test results

实验序号	超声时间(min)	乙醇浓度(%)	超声温度(°C)	料液比(mg:mL)	实验结果(g/kg)
1	40	60	30	25:50	11.4
2	40	80	35	30:50	12.3
3	40	100	40	35:50	11.9
4	50	60	35	35:50	12.0
5	50	80	40	25:50	12.7
6	50	100	30	30:50	12.2
7	60	60	40	30:50	11.7
8	60	80	30	35:50	12.5
9	60	100	35	25:50	12.1

min 开始提取值逐渐趋于最大值,但超过 50 min 后,提取值开始略有下降,得出 50 min 为最佳超声提取时间。

设定提取温度为 35 °C,料液比为 35:50 (m:V),提取时间为 50 min,乙醇为提取溶剂,考察不同的乙醇浓度对提取效果的影响,由表 3 可知,乙醇浓度在 60%~100%之间的提取效果最佳。

### 3.3 正交设计实验结果

以超声时间、乙醇浓度、超声温度和料液比为实验因素,每个实验因素设计 3 个水平,进行 4 因素 3 水平的正交实验,结果如表 4、表 5 所示。

以上实验数据输入正交设计助手软件,算出 4 个因素在各水平上的均值和极差值,如表 6 所示。

表 6 影响因素在对应水平上的均值和极差值  
Table 6 The means and extreme values of influence factors at the corresponding level

水平对应均值(g/kg)	超声时间(A)	乙醇浓度(B)	超声温度(C)	料液比(D)
水平 1	11.867	11.7	12.033	12.067
水平 2	12.3	12.5	12.133	12.067
水平 3	12.1	12.067	12.1	12.133
极差值	0.433	0.8	0.1	0.066

表 7 精密度结果(n=6)  
Table 7 Results of precision (n=6)

样品数	1	2	3	4	5	6	RSD(%)
叶绿素 a 含量(g/kg)	12.23	11.92	11.93	12.21	12.35	12.15	1.9

表 8 稳定性结果  
Table 8 Results of stability

试液放置时间(min)	0	10	20	30	60	90	120	RSD(%)
叶绿素 a 含量(g/kg)	12.15	12.18	12.21	12.2	12.13	12.18	12.41	0.8

从以上数据可以看出, 极差值的大小顺序依次为: 乙醇浓度(B)>超声时间(A)>超声温度(C)>料液比(D), 说明乙醇浓度和超声时间是影响提取叶绿素 a 的主要因素, 其次分别为超声温度和料液比。通过比较各因素对应水平上的均值,  $A_2>A_3>A_1$ ,  $B_2>B_3>B_1$ ,  $C_2>C_3>C_1$ ,  $D_3>D_1=D_2$ , 由此可以得出结论, 最优组合为  $A_2B_2C_2D_3$ , 即超声时间 50 min, 乙醇浓度 80%, 超声温度 35 °C, 料液比 35:50(m:V)。

### 3.4 精密度实验

精密度实验结果见表 7, 由表 7 可知, 6 个样品的相对标准偏差为 1.9%, 表明该方法有良好的精密度。

### 3.5 稳定性实验

稳定性实验结果见表 8, 试液放置不同时间下的相对标准偏差为 0.8%, 表明该方法有良好的稳定性。

## 4 结 论

本研究采用超声辅助提取法测定螺旋藻粉中叶绿素 a 的提取工艺研究, 利用单因素设计结合正交设计的实验方法, 筛选出最优的超声辅助提取工艺条件如下: 超声时间 50 min, 乙醇浓度 80%, 超声温度 35 °C, 料液比 35:50 (m:V), 精密度和稳定性实验结果令人满意。

### 参考文献

[1] 吴文龙. 螺旋藻保健食品的功能因子与研究开发进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(2): 129-130.

Wu WL. The material base and present situation of research and development in *Spirulina platensis* functional foods [J]. Food Res Dev, 2006, 27(2): 129-130.

[2] 罗光宏. 影响分光光度法测定钝顶螺旋藻干粉叶绿素含量的因素分析[J]. 食品科学, 2014, 35(14): 2-3.

Luo GH. Effect of extraction conditions on the spectrophotometric determination of chlorophyll content in *Spirulina platensis* powder [J]. Food Sci, 2014, 35(14): 2-3.

[3] 杨立荣. 叶绿素铜钠盐的制备[J]. 浙江大学学报, 1998, 32(6): 1-3.

Yang LR. Preparation of sodium copper chlorophyllin [J]. J Zhejiang Univ, 1998, 32(6): 1-3.

[4] 付丽丽. 钝顶螺旋藻干粉叶绿素 a 提取方法探讨[J]. 应用化工, 2015, 44(12): 1-3.

Fu LL. Study on the extraction method of chlorophyll a in *Spirulina platensis* powder [J]. Appl Chem Ind, 2015, 44(12): 1-3.

[5] 殷海. 利用有机溶剂提取微藻油脂的方法探究[J]. 化工进展, 2015, 34(5): 1-2.

Yin H. Research on microalgae oil extraction by organic solvent [J]. Chem Ind Eng Prog, 2015, 34(5): 1-2.

[6] 王文杰. 丙酮和二甲基亚砜法测定植物叶绿素和类胡萝卜素的方法学比较[J]. 植物研究, 2009, 29(2): 224-229.

Wang WJ. Methodological comparison of chlorophyll and carotenoids contents of plant species measured by D MSO and acetone-extraction methods [J]. Bull Bot Res, 2009, 29(2): 224-229.

[7] 叶济宇. 关于叶绿素含量测定中的 Arnon 计算公式[J]. 植物生理学通讯, 1985, (6): 67-69.

Ye JY. Arnon calculation formula for the determination of chlorophyll content [J]. Plant Phys Commun, 1985, (6): 67-69.

- [8] 孙远征, 张学成, 纪雷. 钝顶螺旋藻多糖提取工艺的研究—三氯乙酸法的正交实验优化[J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 42-47.  
Sun YZ, Zhang XC, Ji L. *Spirulina platensis* polysaccharide extraction-TCA method by orthogonal optimization [J]. MarSci, 2007, 31(4): 42-47.
- [9] 温燕梅, 冯亚非, 部音利. 螺旋藻中药用成分的综合提取研究[J]. 食品科技, 2008, (6): 168-171.  
Weng YM, Feng YF, Bu YL. Comprehensive extraction of medicinal ingredients *Spirulina*[J]. Food Sci Technol, 2008, (6): 168-171.
- [10] 王晓晴, 王榆元, 曾晓雄. 正交实验法优化极长钝顶螺旋藻多糖提取分离条件研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(4): 665-667.  
Wang XQ, Wang YY, Zeng XX. With Orthogonal extremely long *Spirulina platensis* polysaccharide extraction separation condition [J]. Prog Mod Biomed, 2009, 9(4): 665-667.
- [11] 张素霞. 菠菜叶中叶绿素提取工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2008, (5): 40-43.  
Zhang SX. Spinach leaves extraction process of chlorophyll [J]. China Food Nutr, 2008, (5): 40-43.
- [12] 黄持都, 胡小松, 廖小军. 叶绿素研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2007, (3): 114-118.  
Huang CD, Hu XS, Liao XJ. Progress on chlorophyll [J]. China Food Addit, 2007, (3): 114-118.
- [13] 严桂芹, 章世元, 王俊. 蚕沙叶绿素的提取及分析测定[J]. 林业科技, 2008, 33(4): 60-62.  
Yan GQ, Zhang SY, Wang J. Silkworm sand extraction and determination of chlorophyll [J]. Forestry Sci Technol, 2008, 33(4): 60-62.
- [14] 李得孝, 郭月霞, 员海燕. 玉米叶绿素含量测定方法研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(6): 153-155.  
Li DX, Guo YX, Yuan HY. Determination of chlorophyll content of maize [J]. Chin Agric Sci Bull, 2005, 21(6): 153-155.
- [15] 刘建平, 杨小敏, 王雪芳. 大豆豆渣中异黄酮的超声提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 2042-2043, 2046.  
Liu JP, Yang XM, Wang XF. Soy okara ultrasonic extraction technology of isoflavones [J]. Anhui Agric Sci, 2010, 38(4): 2042-2043, 2046.

(责任编辑: 姚菲)

### 作者简介



房家祥, 食品中级检验员, 主要研究方向为保健食品的质量检测。  
E-mail: fangjasean@qq.com