

吕 寒,李维林,陈 剑,等. 蚕沙中叶绿素提取工艺研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):256-257.

蚕沙中叶绿素提取工艺研究

吕 寒,李维林,陈 剑,马 丽,任冰如,刘 艳

(江苏省·中国科学院植物研究所/南京中山植物园,江苏南京 210014)

摘要: 采用在提取溶剂中加入 CuSO_4 的方法,对蚕沙中叶绿素提取的传统工艺进行了改进,将提取叶绿素和置铜同时进行。通过单因素试验和正交试验相结合的方法比较了不同提取方法、提取溶剂、提取时间、提取温度等条件对蚕沙叶绿素提取的影响。结果表明,以 pH 值 2~3 的含 CuSO_4 的 90% 乙醇为提取溶剂,蚕沙:溶剂 = 1:8 (体积比),80 ℃ 提取 6 h,为蚕沙中叶绿素提取的最佳技术工艺。

关键词: 蚕沙;叶绿素;提取工艺;硫酸铜;叶绿素铜

中图分类号:S886.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0256-02

蚕沙为家蚕 (*Bombyx mori* L.) 幼虫蚕食桑叶后排泄出来的粪便。蚕食桑叶后只消耗了桑叶中的部分蛋白质、糖类和脂肪类物质,而其他成分随粪便排泄到体外,并使叶绿素得到进一步富集^[1]。叶绿素稳定性差与其中镁离子被脱去有关,在一定条件下利用铜离子来取代镁离子,可以提高叶绿素的稳定性及染色强度^[2]。由于叶绿素对热不稳定,所以传统叶绿素提取一般采用以有机溶剂如丙酮或乙醇常温浸提后置铜的方法。本试验采用在提取溶剂中加入 CuSO_4 的方法,将提取和置铜同时进行,增加叶绿素稳定性。本研究运用单因素和正交试验结合的方法比较了不同提取条件对叶绿素提取率的影响,以期改良传统叶绿素提取工艺提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕沙收集于江苏南通,自然晾干,除去石灰、沙子等杂质。

1.2 仪器和试剂

TU-1810 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司产品);乙醇、丙酮、硫酸铜、盐酸均为分析纯(南京化学试剂厂产品)。

1.3 方法

1.3.1 不同提取方法比较 精密称取 5.0 g 蚕沙 3 份,依次加入 95% 乙醇 50 mL、1 mL 2.5% CuSO_4 ,加 HCl 调节 pH 值至 2~3。分别以 80 ℃ 水浴回流提取 2 h、常温浸提 24 h、超声提取 50 min、进行提取。

1.3.2 不同溶剂比较 精密称取 5.0 g 蚕沙 5 份,分别加入 50 mL 80% 丙酮、70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇,再依次加入 1 mL 2.5% CuSO_4 ,加 HCl 调节 pH 值至 2~3。80 ℃ 水浴回流提取 2 h,过滤得提取液。

1.3.3 不同提取温度比较 称取 5.0 g 蚕沙 5 份,依次加入 95% 乙醇 50 mL、1 mL 2.5% CuSO_4 ,加 HCl 调 pH 值至 2~3。

分别以 40、50、60、70、80 ℃ 水浴回流提取 2 h,过滤得提取液。

1.3.4 不同提取时间比较 称取 5.0 g 蚕沙 5 份,依次加入 95% 乙醇 50 mL、1 mL 2.5% CuSO_4 ,加 HCl 调 pH 值至 2~3。分别于 80 ℃ 水浴回流提取 1、2、4、6、8 h,过滤得提取液。

1.3.5 正交试验 根据单因素试验结果,选择乙醇为溶剂,以乙醇用量、乙醇浓度、提取时间为因素,每个因素设 3 个水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1)。精密称取 5.0 g 蚕沙 9 份,按正交表中条件分别加入不同醇浓度和不同体积的乙醇,并用盐酸调节 pH 值至 2~3,再加入 1 mL 2.5% CuSO_4 ,于 80 ℃ 水浴回流提取相应时间,滤过,得提取液。

表 1 蚕沙中叶绿素提取工艺正交试验的因素和水平

水平	因素		
	A:乙醇浓度(%)	B:溶剂用量(倍)	C:提取时间(h)
1	70	10	7
2	80	8	6
3	90	6	5

1.3.6 叶绿素铜吸光度 精密移取叶绿素提取液 0.2 mL,至 10 mL 量瓶中,分别以提取溶剂稀释至刻度,并以提取溶剂为空白,于 650 nm 和 413 nm 处测定吸光度^[3-4]。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对叶绿素提取率的影响

表 2 结果显示,80 ℃ 水浴回流提取法所得叶绿素铜含量最高,超声提取法次之,常温浸提法所得叶绿素铜含量最低。

表 2 不同提取方法提取液中叶绿素铜的吸光度

提取方法	$D_{413\text{ nm}}$	$D_{650\text{ nm}}$
常温浸提	93.5	23.0
80 ℃ 水浴回流提取	216.5	99.0
超声提取	196.0	90.5

注: $D_{413\text{ nm}}$ 、 $D_{650\text{ nm}}$ 分别表示 1 g 蚕沙提取的叶绿素铜的吸光度。

2.2 不同提取溶剂对叶绿素提取率的影响

不同溶剂所得提取液中叶绿素铜吸光度见图 1,90% 乙醇提取所得叶绿素铜含量最高,80% 乙醇提取所得叶绿素铜含量次之,且 90% 乙醇和 80% 乙醇提取所得叶绿素铜含量均高于 80% 丙酮提取所得叶绿素铜含量。

收稿日期:2012-11-15

基金项目:江苏省科技计划项目(编号:B20011787)。

作者简介:吕 寒(1980—),女,浙江永康人,硕士,助理研究员,主要从事植物有效成分分离研究。E-mail: xiaohan1814@163.com。
通信作者:李维林,博士,研究员。E-mail: lwlcnbng@mail.cnbg.net。

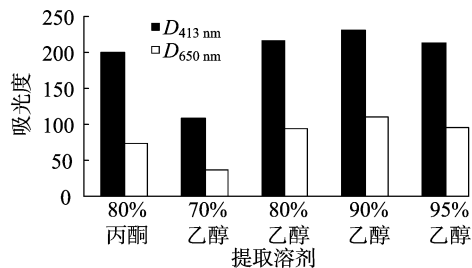


图1 不同提取溶剂提取液中叶绿素铜的吸光度

2.3 不同提取温度对叶绿素提取率的影响

结果(图2)表明,随着提取温度的升高,提取液中叶绿素铜含量增加,70℃后增幅变缓,80℃时叶绿素铜含量最高。

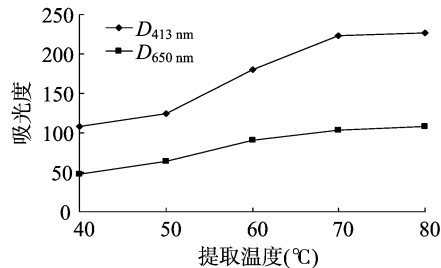


图2 不同提取温度提取液中叶绿素铜的吸光度

2.4 不同提取时间对叶绿素提取率的影响

不同提取时间所得提取液中叶绿素铜吸光度(图3)表明,随着提取时间增加叶绿素铜含量增加,但提取时间达到6 h后叶绿素铜含量反而下降。

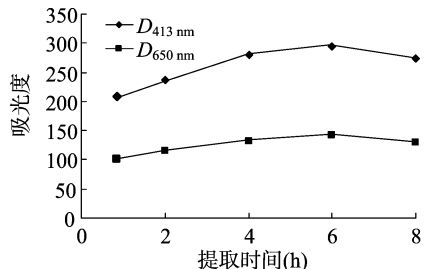


图3 不同提取时间提取液中叶绿素铜的吸光度

2.5 正交试验结果

正交试验结果(表3、表4、表5)表明,乙醇浓度对叶绿素铜吸光度有显著影响,提取溶剂用量和提取时间对叶绿素铜吸光度无显著影响,叶绿素提取的最佳工艺条件是 A₃B₂C₂,即加8倍量90%乙醇(含CuSO₄,pH值2~3),提取6 h。

3 讨论

传统叶绿素提取一般采用常温浸提方法,在预备试验中我们通过常温浸提方法比较了文献[3]中报道的不同浓度乙醇、丙酮、乙醇-丙酮(2:1,体积比)混合液等溶剂对叶绿素的提取率,发现80%丙酮提取率最高。但是丙酮价格较贵,有一定毒性,且易燃易爆不适合工厂化生产。本试验采用乙醇为溶剂,可以降低提取成本,增加操作安全性。

预备试验中还发现采用加热回流提取可以显著提高叶绿素的提取率,但是加热后会导致叶绿素不稳定,可能与叶绿素遇热易脱镁生成脱镁叶绿素有关。我们在本试验中采取在提取溶剂中加入CuSO₄的方法,在提取过程中进行置铜,将不

表3 蚕沙中叶绿素提取工艺正交试验结果

试验号	因素			吸光度	
	A	B	C	D _{650 nm}	D _{413 nm}
1	1	1	1	191.4	54.3
2	1	2	2	163.4	46.3
3	1	3	3	135.4	36.7
4	2	1	2	209.1	73.7
5	2	2	3	195.9	69.3
6	2	3	1	155.9	55.1
7	3	1	3	215.5	93.0
8	3	2	1	257.6	111.4
9	3	3	2	247.9	108.3
k ₁ (D _{650 nm})	163.37	205.33	201.62		
k ₂ (D _{650 nm})	186.97	205.63	206.78		
k ₃ (D _{650 nm})	240.33	179.71	182.27		
R(D _{650 nm})	76.96	25.91	24.51		
k ₁ (D _{413 nm})	45.77	73.65	73.62		
k ₂ (D _{413 nm})	66.01	75.64	76.06		
k ₃ (D _{413 nm})	104.21	66.70	66.31		
R(D _{413 nm})	58.44	8.94	9.75		

表4 蚕沙中叶绿素提取工艺正交试验方差分析结果(D_{650 nm})

变异来源	SS	df	S	F	P
A	9 327.97	2	4 663.99	5.34	>0.05
B	1 327.91	2	663.95	0.76	>0.05
C	1 001.57	2	500.78	0.57	>0.05
误差	1 746.72	2	873.36		

表5 蚕沙中叶绿素提取工艺正交试验方差分析结果(D_{413 nm})

变异来源	SS	df	S	F	P
A	5 284.15	2	2 642.08	20.98	<0.05
B	132.33	2	66.16	0.53	>0.05
C	154.47	2	77.24	0.61	>0.05
误差	251.92	2	125.96		

耐热的叶绿素转化为对热稳定的叶绿素铜,通过增加提取温度的方法增加叶绿素的提取率。

不同溶剂筛选结果表明,在加热回流提取条件下,90%乙醇的提取率最高,高于80%丙酮,这与传统常温浸提方法结果有差异,分析原因可能是因为常温下80%丙酮的渗透性大于乙醇,所以在常温浸提条件下对叶绿素的提取率会高于乙醇。而在加热条件下乙醇的渗透性大大增加,而叶绿素极性较小,更易溶于比丙酮极性小的乙醇,所以在加热条件下乙醇的提取率会高于丙酮。

单因素和正交试验结果表明,pH值2~3的含CuSO₄的90%乙醇为提取溶剂,用量为蚕沙的8倍(体积),80℃加热回流提取6 h,提取液中叶绿素铜含量最高。

参考文献:

[1]郭宝星. 蚕沙及其提取物在医学上的应用[J]. 四川中医,2003,21(3):19-21.
[2]金春雪,全晓红,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:自然科学版,2000,13(1):88-90.
[3]潘慧娟. 不同溶剂对蚕沙中叶绿素提取效果的影响[J]. 杭州师范学院学报:自然科学版,2006,5(1):50-52.
[4]郭 莉,王丹军,付 峰,等. 叶绿素铜敏化二氧化钛光催化剂的合成及性能研究[J]. 江西农业大学学报,2010,32(4):819-823.