

天然色素的超声提取研究^{*}岳辉吉¹ 朱杰²

(1 陕西师范大学物理学与信息技术学院 西安 710062 2 西北农林科技大学生命科学院 杨凌 712100)

摘要: 本文主要研究利用超声波提取叶绿素。并且对超声提取法和单纯浸泡法作了比较,同时,分析了叶绿素提取效率对时间的依赖性。实验结果显示,用超声来提取绿色植物中的叶绿素,可以增大提取率,缩短提取时间。

关键词: 超声提取; 叶绿素; 超声波

中图分类号: S212; **文献标识码:** A

Study on the Natural Pigment Extracted by Ultrasonic Wave from Green Plant

YUE Hui - ji¹, ZHU Jie²

1 College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi

2 College of Life Science, Northwest Sci&Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, 712100, China

ABSTRACT: In this article, it has been studied that the chlorophyll was extracted by ultrasonic wave from green plant, comparing ultrasonic extracting method with simple-soaking method, meanwhile, analyzing the dependence of extracting rate of chlorophyll on the time. The experimental results showed that extracting chlorophyll by ultrasonic wave from green plant could increase extracting rate and shorten extracting time.

Key words: Ultrasonic extraction; Ultrasonic wave; Chlorophyll

叶绿素存在于所有植物和部分微生物中,它在光合作用中起着非常重要的作用。在日常生活中叶绿素也有很多用途,如食用调色剂。在高等植物的组织中依据结构的不同,又可分为叶绿素A和叶绿素B,但其基本结构都是卟啉环。当前,化学成分的提取方法有多种,如热提取法、浸泡提取法、超声波萃取、紫外分光光度法。但是这些常规方法都有许多不足之处,如回流法虽然提取较完全,但是需要加热,耗时较长,煎煮法虽然可以方便地进行工业化生产,但是提取率较低,溶媒用量很大,耗时长;渗漉法虽然不用加热,提取效率也较高,但是耗时长;冷浸法是最原始的提取方法,溶媒用量很大,耗时也太长,提取率也很低^[1-4]。因此,利用不断出现的新技术、新方法提取某些化学成分是目前化学成分提取研究领域的一大热点。我们也主要研究利用超声提取叶绿素。超声波应用于生物、化学等技术是一个较新的研究领域。近年来超声波在分子化合物降解、有机合成、提取分离等方面得到了广泛的研究和应用,如多糖的讲解及提取。目前超声波应用于从陆地植物中提取有用有机成分进行了较多的研究,都取得了较满意的结果,回收率大大提高。超声波用于海藻破碎提取海洋生物活性物质亦取得了较好的效果,如超声波用于盐藻破碎提取胡萝卜素。在采用化学及机械破碎方法均不能从龙须藻中获得理想的藻胆体时,采用超声波提取得到了完整的藻胆体,并且效果良好。本文采用超声波提取叶绿素,希望能为叶绿素提取工艺改进、缩短提取时间、降低提取成本、提高产品质量提供一些依据。

1 原理部分

1.1 超声波及超声波发生器

超声波是指频率在声频以上,即超过人耳所能接受的频

率-20kHz的弹性波。超声波的频率也有上限,一般认为是 5×10^6 kHz。超声波是一种在弹性介质中的纵波,可在固、液、气中产生。超声波具有频率高、方向性好、穿透力强、能量集中等特性,已在机械制造、化学、冶金、医疗卫生、轻工业、农业、动力工程等方面广泛应用。超声波发生器是超声波的波源,通常有三种类型,即机械式超声波发生器、磁致伸缩振荡式超声波发生器和电磁伸缩振荡式超声波发生器。机械式超声波发生器是以高速气体或液体为介质,通过机械装置产生谐振的系统,其发生的超声频率一般较低,通常为20-30kHz。磁致伸缩振荡式超声波发生器是利用磁性材料的磁致伸缩现象,将电能转换成声波的仪器,通过对线圈输入交变电流,是作为铁芯的磁致伸缩材料产生振动,发出超声波,其发生的频率通常为20kHz-100kHz。电致伸缩振荡式超声波发生器或压电晶体振荡式超声波发生器是利用压电式或电致伸缩效应的材料,加上高频电压,使其按电压的正负和大小产生高频伸缩。在应用中,可将这种伸缩通过介质耦合到作用物上,使作用物表面随之振动而产生声的波动在物质内部传播,其发生的声的频率很高。通常在100MHz以上甚至达到GHz量级。

1.2 超声提取法的基本原理

超声提取法就是利用超声波产生的强烈振动,很高的加速度、强烈的空化效应、搅拌等特殊作用,可以破坏植物的细胞,使溶媒渗透到被提取物的细胞中,以便使被提取物的化学成分溶于液体之中,再通过化学分离提纯以得到所需要的成分。超声提取的主要动力是声空化。空化现象是指在超声波的作用下,在液体中形成空腔的现象。这些空腔随传播着的声波的频率而伸张和压缩。声空化是液体中气泡在声场作用下所发生的一系列动力学过程。当足够强度的超声波通过液体时,当声波负压半周期的声压值超过液体内部的静压强时,

* 基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(No. 104167); 国家自然科学基金资助项目(No. 20572067)

作者简介: 岳辉吉(1978-),男,河北石家庄人,助教,硕士,主要从事物理课程教学及相关研究工作。

E-mail: yhj2004@snnu.edu.cn

(收稿日期: 2006-04-09 接受日期: 2006-04-24)

存在液体中的微小气泡(称作空腔或空化核)就会迅速增大,而在相继而来的声波正压相中,气泡会突然绝热压缩。当压缩时,气泡的尺寸会变小,同时它所产生的巨大压力可能会使空腔完全消失,既可能是它们完全闭合。因为闭合之前的瞬间空腔及其周围微小的空间内出现热点,形成高温高压区(压力可达几千个大气压,温度超过 50000C),并伴有强大的冲击波和时速达 400km 的射流。所以在空腔完全闭合的瞬间,由于出现这种极端的物理环境,只是中草药化学成分的细胞在溶剂中瞬时产生的空化泡的崩溃而破裂,以便溶剂渗透到细胞内部,而使细胞中的化学成分溶于溶剂之中。同时,超声波产生的振动作用加强了细胞内物质的释放、扩散及溶解。而且,超声波破碎过程是一个物理过程,浸泡提取过程中无化学反应,被浸泡的化学成分的结构和性质不会发生变化,因而超声波的振动作用提高了细胞的破碎速度,缩短了破碎时间,促进了化学成分向溶剂中溶解。所以用超声波提取化学成分可以大大的缩短提取时间,提高提取率,得到的化学成分的结构和性质也不会改变^[5]。

超声波作用时其效果不仅取决于超声波的强度和频率,而且与被破碎物的结构有一定的关系。计算表明:在水中当超声波辐射面上的强度达 3000W/m² 时就会产生空化现象,使被破碎的生物体和细胞完全破碎。从理论上讲,确定被破碎物所处介质中气泡的大小后即可选择适宜的超声波频率。但实际上被破碎物所处介质中气泡的大小不是单一的,而是存在着一个分布范围。所以超声波的频率应有一定范围的变化,既有一个频率宽带。因此,频率宽带比单一频率效果又要好一些。今后我们将从这个角度深入研究。

1.3 分光光度法

分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法^[6-7]。他是基于被测物质的分子对光具有选择性吸收而建立起来的一种分析方法。常用的波长范围为:(1) 200~ 400nm 的紫外光区;(2) 400~ 760nm 的可见光区;(3) 2.5~ 25 μ m (按波数计为 4000cm⁻¹ ~ 400cm⁻¹) 的红外光区。所用仪器为紫外分光光度计、可见光分光光度计(或比色计)、红外分光光度计或原子吸收分光光度计。为保证测量的精密度和准确度,所有仪器应按照国家计量检定规程,定期进行校正检定。单色光辐射穿过被测物质溶液时,被该物质吸收的量与该物质的浓度和液层的厚度(光路长度)成正比,其关系如下式:A= $\epsilon \times l \times c$ 式中 A 为吸收度, ϵ 为一吸收常数,和溶液性质、温度等因素有关。l 为液层厚度,单位 cm。C 为 100ml 溶液中所含被测物质的重量,单位 g(按干燥品或无水物计算);即吸收度换算成溶液浓度为 0.01(g/ml),液层厚度为 1cm 的数值;物质对光的选择性吸收波长,以及相应的吸收系数是该物质的物理常数。当已知某纯物质在一定条件下的吸收系数后,可用同样条件将该供试品配成溶液,测定其吸收度,即可由上式计算出供试品中该物质的含量。在可见光区,除某些物质对光有吸收外,很多物质本身并没有吸收,但可在一定条件下加入显色试剂或经过处理使其显色后再测定,故又称比色分析。由于显色时影响呈色深浅的因素较多,且常使用单色光纯度较差的仪器,故测定时应用标准品或对照品同时操作。

1.4 叶绿素性质

叶绿素光、热、酸性介质均不稳定,易产生降解现象;在直射光环境中,降解速度随时间延长和温度升高而加快;在 pH 值 6~ 7 时的中性条件下最稳定,在 pH 值 3~ 4 的酸性条件下,叶绿素易降解。

2 实验部分

2.1 实验准备

用超声波提取叶绿素,用到的主要实验仪器有:超声波发生器,分光光度计,超声换能器,功率放大器。我们在实验中使用的超声频率为 19KHz,输出功率大约为 9.6 瓦(400 \times 10-3mA \times 6V \times 4)。在考虑温度对提取的影响后,有自制了一套回流系统(如上图 1)。

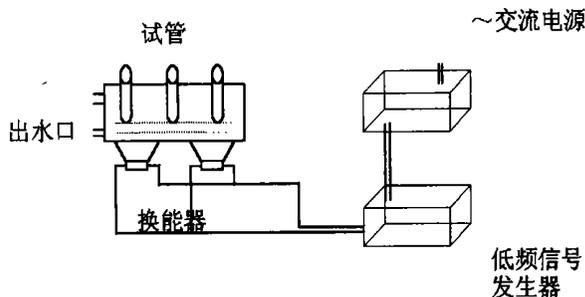


图 1 试验装置图

Figure 1 Experimental installation diagram.

这套装置可以保证整个实验过程中基本上实现恒温(室温)条件下进行的。冬青叶片的选择也是非常讲究的,考虑的因素也很多。因为每片叶子所含的叶绿素都有所不同,湿度对叶绿素的提取效果也有明显的影响,还有酸碱度,溶剂等都对其有影响,所以我们把精心选好的叶子切碎搅匀,保证其一致性后,称取了几份 0.5g 的样品。

2.2 实验仪器

超声波发生器(44C2- A 型);低频信号发生器(XFD- 7A 型);分光光度计(721 型);换能器(一组四个);铁架台、试管、PH 试纸等。

表 1

波长 λ nm	吸光度 A	波长 λ nm	吸光度 A
640	0.332	662	0.632
642	0.360	664	0.562
644	0.395	666	0.486
646	0.440	668	0.400
648	0.479	670	0.345
650	0.540	672	0.275
652	0.575	674	0.245
654	0.645	676	0.190
656	0.665	678	0.146
658	0.672	680	0.112
660	0.661	682	0.089

2.3 溶剂的选取

溶剂的选取要满足以下几点:①所选溶剂不和被测组分发生化学反应②所选溶剂在测定波长范围内无明显吸收③所选溶剂对被测组分有较好的吸收能力④被测组分在所选溶剂中具有良好的吸收峰形。鉴于以上几点,我们选乙醇为溶剂。

2.4 实验过程

①测叶绿素吸收波波峰

用 721 型分光光度计,测已经配好的叶绿素的乙醇溶液的吸光度,数据如下表 1 所示。表 1 由该数据可得吸收波曲线为图 2。由图 2 得,该叶绿素吸收波波峰为 658nm。也就是说,叶绿素对波长为 658nm 的光波的吸收度最大。通过吸收度,我们可以大概知道它的浓度。

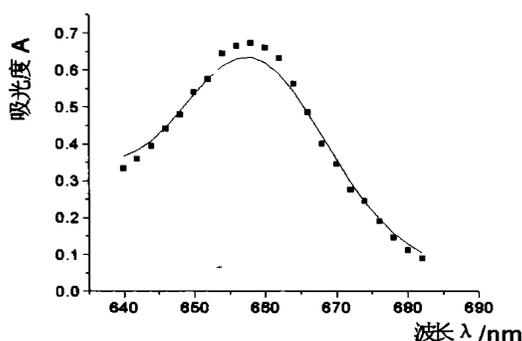


图2 叶绿素吸收波波峰曲线

Figure 2 Diagram of ridge curves of chlorophyll absorption wave.

②A- c(吸光度-浓度)标准曲线的测定

由于实验条件的限制,我们无法配出已知浓度的叶绿素乙醇溶液,只能按比例作一条曲线,取较大浓度的叶绿素乙醇溶液 1ml 五份,分别稀释为 10ml、20ml、30ml、40ml、50ml,测其在 658nm 波长处的吸光度,数据如表 2。

表 2

浓度	吸光度 A
X/ 50	0. 175
X/ 40	0. 225
X/ 30	0. 255
X/ 20	0. 400
X/ 10	0. 992

注: X 为原先 1ml 溶液中含有的叶绿素的量(g)

表 3

时间 (min)	浸泡提取 样本吸光度	浸泡提取 样本浓度	超声提取 样本吸光度	超声提取 样本浓度
10	0. 135	0. 0306	0. 275	0. 0624
20	0. 245	0. 0556	0. 280	0. 0635
30	0. 250	0. 0567	0. 285	0. 0646
40	0. 256	0. 0580	0. 293	0. 0664
60	0. 260	0. 059	0. 295	0. 0669

由朗伯-比尔定律 $A = \epsilon \times l \times c$ 知, ϵ 在同一溶剂、溶质配成的溶液中,在同一温度下其值是不变的, l 为比色皿厚度也是不变的。该定律适应条件为(1)在单色光 λ_{max} 或峰峰处测定(2)吸光质点形式不便(3)溶液为稀溶液。我们所配溶液基本满足以上几点。有 A 和 c 我们可以得出叶绿素的准标准曲线(按比例曲线)如图 3 所示。由上我们可以得出: A 为一常数 0. 1191, 真值为 0. 02526。据其原理, A 值为 0。修正后该曲线为 $Y = BX$ 。引起误差原因很多,但基本在误差允许的范围之内。 B 的值为 4. 41005, 即 $\epsilon \times b$ 为 4. 41005。只要我们知道叶绿素溶液的吸收度,就可以从该曲线中找出它的对应的浓度比例值,由此我们就可以知道不加超声和加了超声的不同的提取效果。

②提取叶绿素

经过反复调试仪器,反复试验,最终得出如下数据(溶剂为酒精),如表 3 所示。我们可以做两种对比,一种是横向对比,在 10 分钟时,叶片中叶绿素的含量远大于溶液中的含量,两者之间的差别促使两者快速向平衡的方向发展,所以提取速度快,而加了超声后,超声作用破坏了叶片的细胞壁,叶绿素溶于乙醇的速度加快。而到了 20 分钟时,由于叶片中叶绿素的浓度以和溶液的浓度相差不大,提取的量和速度都受到了影响。这种情况在 30 分钟时表现得更加明显,此时,浸泡

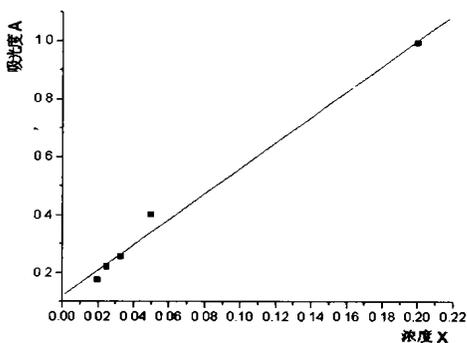


图3 吸光度浓度曲线图

Figure 3 Diagram of concentration curves of optical density.

提取的结果和超声提取结果的差距为 0. 0079,这两种提取方法的差距已不再明显。等到 40min 和 60min 时,差距分别为 0. 0084 和 0. 0079。基本上和 30 分钟时的差距是一样的。从纵向对比来看,单纯用浸泡提取 20 分钟的结果将近是用同样方法提取 10 分钟时的两倍。但 30 分钟时的结果和 20 分钟时的结果差距就缩小了。再分析 60 分钟和 40 分钟时的情况,差距就更小。由此,我们可以得出,在 20 分钟时叶片中叶绿素的浓度以基本上和溶液中叶绿素的浓度相当。他们之间似乎可以用溶解动态平衡来解释。所以即使提取时间延长,对提取的效果也没有什么影响。再看用超声提取的实验。在 20 分钟时的提取浓度以基本上和 10 分钟时的提取浓度相差不大。在 30 分钟、40 分钟和 60 分钟时,差距也基本上差不多。浓度没有太大的变化。可知超声作用后,提取时间大大缩短。即达到溶解平衡的时间大大缩短,在 20 分钟时效果最好,提取效率也大大提高。由该实验,我们可知超声在提取中至少有两个作用,一是缩短提取时间,二是提高提取率。但是,由于叶绿素也是一种有机大分子,在不同频率、不同功率处有可能降解,所以在用超声提取叶绿素时,一定要选一个合适的提取功率和提取频率,我们所用频率为 195* 100Hz,功率为 9.6 瓦。在此处,叶绿素未被降解。

3 展望

超声提取法在化学成分提取中的应用已经显出明显的优势,具有省时、节能、提取率高等优点。然而目前超声波提取法的研究仅限于实验室的小规模上。国内尚无超声提取的设备,其原因是超声波提取法需增加产生超声波的动力消耗,实际生产是否经济,有待放大实验后作全面核算。因此,一旦超声提取工程放大问题得到解决,超声波提取法必将会迅速在提取业中广泛应用。

参考文献

- [1] 郭孝武. 超声提取及其应用[M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 2003
- [2] 郭孝武. 一种提取中草药化学成分的方法- 超声提取法[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(3): 37- 39
- [3] 项昭保, 霍丹群, 任绍光, 等. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 289- 290
- [4] 林书玉. 功率超声技术的研究现状及其最新进展[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2001, 29(1): 101- 102
- [5] 朱杰. 超声波及其在食品科学中的应用[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 101- 104
- [6] 刘密新, 罗保安, 张新荣, 等. 仪器分析[M]. 北京: 清华大学出版社, 2000
- [7] 徐金生. 仪器分析[M]. 南京: 南京大学出版社, 2002