

# 废弃番茄叶中叶绿素超声-微波协同的提取工艺<sup>①</sup>

银永忠<sup>②</sup> 何青云 陈莉华 潘奇 王文长

(吉首大学化学化工学院 湖南省吉首市人民南路 120 号吉首大学砂子坳校区化学化工学院 22# 信箱 416000)

**摘要** 利用超声-微波协同法提取废弃番茄叶中的叶绿素。通过单因素及正交试验研究了溶剂、乙醇浓度、微波功率、超声温度、超声时间、料液比、微波时间 7 个因素对叶绿素提取量的影响, 再进行正交试验和验证实验。结果表明最佳工艺条件是: 乙醇浓度 90%、微波功率 500W、超声温度 70℃、超声时间 40min、料液比 1:10(g/mL)、微波时间 300s。在最佳条件下叶绿素的提取量是常规浸提法的 2.86 倍。

**关键词** 番茄叶; 叶绿素; 超声; 微波; 提取

中图分类号: T S202. 3; O 657. 32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011) 05-2578-06

## 1 引言

叶绿素是一种含有卟啉环的天然色素, 在上世纪 80 年代, 研究者们就发现叶绿素有抗诱变作用<sup>[1]</sup>, 其衍生物叶绿酸能保护细胞对抗苯并芘、环磷酰胺、杂环胺类、黄曲霉毒素、重金属以及电离辐射所导致的诱变<sup>[2,3]</sup>, 叶绿素或叶绿酸能降低人体对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的生物利用率<sup>[4]</sup>, 且具有免疫调节的潜能<sup>[5]</sup>, 还可用于抗炎<sup>[6]</sup>, 叶绿素可作为一种肿瘤化疗中的辅助剂, 减小癌症化疗的副作用<sup>[7,8]</sup>。

我国是世界第三大番茄制品生产国, 番茄产业除了使用番茄果实生产番茄果汁、番茄酱、番茄罐头等外, 其叶子、根、茎均未得到开发利用而被丢弃。番茄叶中含有丰富的叶绿素, 可作为食品、药品、化妆品等领域的添加剂。番茄叶中叶绿素的提取迄今未见报道, 本实验利用废弃番茄绿叶为原料, 使用超声-微波协同法, 通过单因素试验和正交试验得到番茄叶中叶绿素的最佳提取工艺条件, 为番茄的进一步综合开发利用提供理论依据。

## 2 实验部分

### 2.1 材料与试剂

番茄叶采摘于湖南湘西农户蔬菜园地收获后的番茄植株。把采摘的新鲜番茄叶除杂, 洗净, 低温烘干, 剪碎, 遮光密封备用。

实验试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

### 2.2 仪器与设备

UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); NJL07-3 型实验专用微波炉(南京杰全微波设备有限公司); GZX-9070M BE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); KQ250-E 型超声波清洗器(郑州长城科工贸有限公司); 723 分光光度计(上海菁华科技仪器有限

① 科技部科技型中小企业技术创新基金资助项目(10C26214302421)

② 联系人, 手机: (0) 15074309527; E-mail: yinyongzhong@yeat.net; heqingyun1989@163.com

作者简介: 银永忠(1969—), 男, 湖南省吉首市人, 讲师, 本科, 主要从事天然产物生理活性成分的提取及应用工作。

收稿日期: 2010-12-30; 接受日期: 2011-02-27

公司); 星火牌 C 型数显鼓风干燥箱 (郑州长城科工贸有限公司); SHB-B88 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); FA 2004 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 番茄叶中色素的定性鉴定

叶绿素提取液的吸收光谱有两个强吸收峰, 分别在红光区和蓝紫区, 不同提取溶剂和原料所得的叶绿素溶液的吸收光谱比较相似。叶绿素 a、叶绿素 b 的红区最大吸收峰分别在 663、645nm 附近, 在蓝紫区分别为 429、453nm 附近。本实验叶绿素提取样品溶液的紫外扫描图位于 430nm (见图 1), 与文献值符合, 后续试验中利用此峰定性番茄叶中的叶绿素。

### 2.3.2 叶绿素的提取工艺流程

新鲜番茄叶→预处理→称重→微波提取→超声提取→抽滤→稀释→测吸光度(实验全过程在遮光条件下进行)。

### 2.3.3 叶绿素含量的测定

准确吸取 1.0mL 叶绿素提取液, 用对应的提取剂稀释至 10.0mL, 按 Arnon 公式计算叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量及叶绿素总量。叶绿素 a 浓度(mg/L):  $C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$ ; 叶绿素 b 浓度(mg/L):  $C_b = 22.9A_{645} - 4.68A_{663}$ ; 叶绿素总浓度(mg/L):  $C_{总} = C_a + C_b$ ; 叶绿素含量(mg/g):  $C_{总} \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数} / \text{样品质量}$ 。

### 2.3.4 单因素及正交试验设计

分别进行料液比、乙醇浓度、超声时间、超声温度、微波功率、微波时间 6 个因素对番茄叶中叶绿素提取的影响, 然后进行  $L_{25}(5^6)$  正交试验, 将每组实验所得的叶绿素提取液稀释至规定体积后, 测定吸光度并计算叶绿素的含量, 再进行极差分析和方差分析。

### 2.3.5 验证实验与对照试验

使用通过正交试验得出的最佳工艺条件重复试验 3 次, 计算 3 次实验的相对标准偏差, 判断工艺重复性的好坏, 再将最佳工艺条件与传统提取方法进行比较, 验证超声-微波协同法对叶绿素提取效果的影响。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同提取剂对叶绿素提取效果的影响

选用石油醚、丁醇、无水乙醇、无水乙醚、丙酮 5 种溶剂作为提取剂, 准确称量 1.0g 预处理过的番茄叶, 料液比(g/mL) 为 1:20, 在 400W 条件下微波 2min, 再在 60℃ 条件下超声 30min, 抽滤, 在相应波长下测定吸光度, 计算叶绿素含量。结果见表 1。

表 1 不同提取剂对叶绿素提取效果的影响

提取剂种类	石油醚	丁醇	无水乙醇	无水乙醚	丙酮
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.346	0.545	0.733	0.781	0.645

由表 1 可看出, 无水乙醇与无水乙醚的提取效果较好, 石油醚的提取效果最差。由于乙醇无毒、价廉、便于回收, 因此选用乙醇作为提取溶剂。

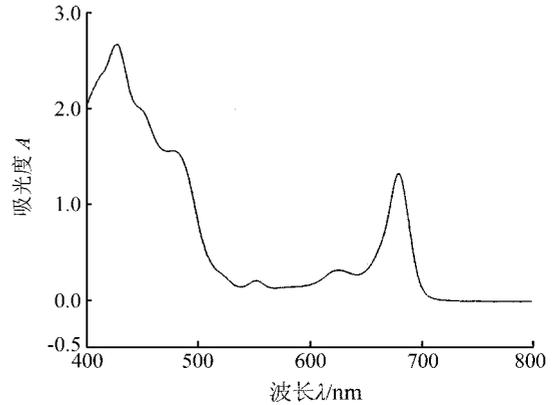


图 1 叶绿素提取样品的紫外光谱

## 3.2 单因素实验

### 3.2.1 料液比对番茄叶中叶绿素提取效果的影响

表 2 料液比对叶绿素提取效果的影响

料液比(g/mL)	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	1.216	1.414	1.218	1.105	0.956

由表 2 可知叶绿素的含量随着料液比的增加而增大,料液比(g/mL)为 1:15 时,叶绿素含量达到最高值,但料液比(g/mL)高于 1:15 后,色素的提取量开始减小。这是因为提取剂越多,细胞内外的浓度差越大,传质推动力也越大,内扩散的速度增大,越有利于色素的溶出。但当料液比(g/mL)为 1:15 时,细胞内外色素已经到达溶解平衡,此时如果继续增加提取剂的量,超声波被溶剂介质吸收而衰减的能量较多,从而使叶绿素的提取量减少。因此最适宜料液比(g/mL)为 1:15。

### 3.2.2 乙醇浓度对番茄叶中叶绿素提取的影响

表 3 乙醇浓度对叶绿素提取效果的影响

乙醇浓度(%)	50	60	70	80	90
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.076	0.241	0.804	1.021	1.051

表 3 实验结果表明,当乙醇浓度小于 80% 时,叶绿素提取量随着乙醇浓度的增加大幅增加,当乙醇浓度高于 80% 时,叶绿素提取量呈微小幅度攀升。其原因可能与溶剂的汽化潜热有关。因此最适宜乙醇浓度为 80%。

### 3.2.3 超声时间对番茄叶中叶绿素提取的影响

表 4 超声时间对叶绿素提取的影响

超声时间(min)	10	20	30	40	50
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.943	1.098	1.167	1.133	1.074

由表 4 可得,叶绿素的提取量随着浸提时间的延长不断增加,提取 30min 后到达最大值,随后开始下降。原因可能是超声波频率高,穿透能力强,巨大的能量使番茄叶样品受迫振动而破碎溶出叶绿素,但 30min 之后,由长时间的高能量穿透使部分叶绿素的结构遭到破坏,导致叶绿素的提取量出现下降趋势。因此最适宜超声时间为 30min。

### 3.2.4 超声温度对番茄叶中叶绿素提取的影响

表 5 超声温度对叶绿素提取效果的影响

超声温度(°C)	30	40	50	60	70
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.841	0.872	1.021	1.167	1.115

由表 5 可得,叶绿素的提取量随着温度的升高而逐渐增大,60°C 到达最大值,因为随着温度的升高,叶绿素分子及溶剂分子均加剧,传质速率增大,有利于叶绿素的提取。60°C 之后,叶绿素提取量有下降趋势,原因是温度升高,叶绿素的分解速度加快。因此最适宜超声温度为 60°C。

### 3.2.5 微波时间对番茄叶中叶绿素提取的影响

表 6 微波时间对叶绿素提取效果的影响

微波时间(s)	60	120	180	240	300
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.943	1.167	1.281	1.149	1.112

由表 6 可得,随着微波时间的延长,叶绿素提取量逐渐增大,当微波 180s 时,达到最大值。因为经过番茄叶微波辐射后,温度升高,加快了溶剂分子与叶绿素分子之间的运动,提高了传质速度和强度,是叶绿素能够快速溶出。180s 后叶绿素提取量有下降趋势,因为微波有热效应,随着时间的延长,温度越来越高,叶绿素的性质越来越不稳定,使部分叶绿素分解,导致叶绿素含量下降。因此最适宜微波时间为 180s。

### 3.2.6 微波功率对番茄叶中叶绿素提取的影响

表 7 微波功率对叶绿素提取效果的影响

微波功率(W)	200	300	400	500	600
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	0.829	0.851	1.021	1.015	1.003

由表 7 可得, 叶绿素的提取量随着微波功率的增大逐渐增大, 当微波功率达到 400W 时, 叶绿素的提取量取得最大值。因为在其他条件一定的情况下, 微波功率越高, 浸提物系吸收的微波能越多, 物系升温越快, 固液扩散速度越快, 因此萃取的效率也就越高, 萃取就越完全。当微波功率高于 400W 时, 叶绿素提取量呈现下降趋势, 故微波功率以选 400W 左右为宜。

### 3.3 正交试验

根据单因素实验, 选取料液比、乙醇浓度、超声时间、超声温度、微波功率、微波时间 6 个因素进行  $L_{25}(5^6)$  正交试验, 并对实验结果进行统计分析, 结果见表 8—10。

表 8 正交试验因素水平表

水平	因素					
	A 乙醇浓度 (%)	B 微波功率 (W)	C 超声温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	D 超声时间 (min)	E 料液比 (g/mL)	F 微波时间 (s)
1	50	200	30	10	1:10	60
2	60	300	40	20	1:15	120
3	70	400	50	30	1:20	180
4	80	500	60	40	1:25	240
5	90	600	70	50	1:30	300

表 9 正交试验结果

试验号	乙醇浓度 (%)	微波功率 (W)	超声温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	超声时间 (min)	料液比 (g/mL)	微波时间 (s)	叶绿素提取量 (mg/g) $\times 10^{-1}$
1	1	1	1	1	1	60	0.136
2	1	2	2	2	2	120	0.133
3	1	3	3	3	3	180	0.110
4	1	4	4	4	4	240	0.101
5	1	5	5	5	5	300	0.108
6	2	1	2	3	4	300	0.283
7	2	2	3	4	5	60	0.200
8	2	3	4	5	1	120	0.441
9	2	4	5	1	2	180	0.484
10	2	5	1	2	3	240	0.309
11	3	1	3	5	2	240	0.923
12	3	2	4	1	3	300	0.871
13	3	3	5	2	4	60	0.590
14	3	4	1	3	5	120	0.434
15	3	5	2	4	1	180	1.028
16	4	1	4	2	5	180	0.576
17	4	2	5	3	1	240	1.410
18	4	3	1	4	2	300	1.410
19	4	4	2	5	3	60	0.975
20	4	5	3	1	4	120	0.728
21	5	1	5	4	3	120	1.215
22	5	2	1	5	4	180	0.725
23	5	3	2	1	5	240	0.648
24	5	4	3	2	1	300	1.410
25	5	5	4	3	2	60	1.401
$K_1$	0.059	0.313	0.301	0.287	0.442	0.330	
$K_2$	0.171	0.334	0.305	0.302	0.435	0.295	
$K_3$	0.385	0.405	0.337	0.364	0.348	0.292	
$K_4$	0.510	0.425	0.334	0.395	0.243	0.339	
$K_5$	0.540	0.357	0.381	0.317	0.197	0.408	
R	0.481	0.112	0.08	0.108	0.238	0.116	

表 10 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	3.568	4	1.784	148.667	*
B▲	0.024	4	0.012	1.000	
C	0.079	4	0.0395	3.292	
D	0.162	4	0.081	6.750	*
E	0.983	4	0.4915	40.958	*
F	0.183	4	0.0915	7.625	*
误差	0.02	4	0.01		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ ; ▲——误差项; \* ——差异显著。

由正交试验极差分析结果可以得出,各个因素影响叶绿素提取量的主次顺序为:乙醇浓度>料液比>微波时间>微波功率>超声时间>超声温度;由方差分析得出乙醇浓度、超声时间、料液比、微波时间对叶绿素的提取量的影响都达到了显著水平,最优组合为  $A_5B_4C_5D_4E_1F_5$ ,即番茄叶中叶绿素提取的最佳工艺为:乙醇浓度 90%、微波功率 500W、超声温度 70℃、超声时间 40min、料液比(g/mL) 1:10、微波时间 300s。

### 3.4 验证试验

为考察正交试验得到的优选工艺条件的稳定性,按其重复性试验 3 次,番茄叶中叶绿素的提取量见表 11,3 次试验的结果均优于正交试验表中的任何一组,相对标准偏差 RSD 为 0.826% ( $n=3$ ),说明此工艺重复性好。

表 11 验证试验结果

指标	试验次数			平均值
	1	2	3	
叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)	1.467	1.482	1.458	1.469

### 3.5 对比试验

表 12 提取方法比较

提取方法	料液比 (g/mL)	乙醇浓度 (%)	超声温度 (℃)	提取时间 (min)	微波功率 (W)	微波时间 (s)	叶绿素提取量 $\times 10^{-1}$ (mg/g)
常规浸提	1:10	90	—	40	—	—	0.515
超声-微波协同	1:10	90	70	40	400	300	1.474

由表 12 可得,在相同条件下番茄叶中叶绿素的提取量,超声-微波协同提取法是常规浸提法的 2.86 倍。

## 4 结论

用超声-微波协同法提取番茄叶中的叶绿素,通过正交试验得到最佳工艺条件是:乙醇浓度 90%、微波功率 500W、超声温度 70℃、超声时间 40min、料液比(g/mL) 1:10、微波时间 300s。通过验证性试验,在相同条件下番茄叶中叶绿素的提取量,超声-微波协同提取法是常规浸提法的 2.86 倍。

## 参考文献

- [1] Lai C N, Butler M A, Matney T S. Antimutagenic activities of Common Vegetables and Their Chlorophyll Content[J]. *Mutat. Res.*, 1980, 77(3): 245.
- [2] Pratt M M, Reddy A P, Hendricks J D et al. The Importance of Carcinogen Dose in Chemopreventive Studies: Quantitative Relationships Between Dibenzo[a,h]Pyrene Dose, Chlorophyllin Dose, Target Organ DNA Adduct Biomarkers and Final Tumor Outcome[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(3): 611—624.
- [3] Ibrahim M A, Elbehary A M, Ghoneim M A et al. Protective Effect of Cucurmin and Chlorophyllin Against DNA Mutation in

Duced by Cyclophosph Amide or Benz[ a] Pyrene[J]. *Z. Naturforsch C*, 2007, **6**(3—4): 215—222.

- [4] Jubert C, Mata J, Bench G *et al.* Effects of Chlorophyll and Chlorophyllin on Low-Dose Aflatoxin B(1) Pharmacokinetics in Hum an Volunteers[J]. *Cancer Prev. Res. (Phila Pa)*, 2009, **2**(12): 1015—1022.
- [5] John K, Keshava C, Rich Ards on D L *et al.* Immune Response Signatures of Benzo (Alph a) Pyrene Exposure in Norm Alhum an Mammary Epithelial Cells in the Absence or Presence of Chlorophyllin[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2009, **6**(1): 1—11.
- [6] 李翠华, 张鲁勉, 何小英. 叶绿素 a 降解产物及其衍生物应用研究[J]. 汕头大学医学院学报, 2002, **15**(2): 121—123.
- [7] 焦广宇, 周春凌, 徐桂强等. 姜黄素、叶绿素辅助治疗胃癌的临床研究[J]. 营养学报, 2001, **23**(3): 237—238
- [8] 周春凌, 焦广宇, 王巍. 几种非营养素辅助治疗胃癌的临床应用[J]. 中华新医学, 2001, **2**(3): 207—209.

## Extraction Technology of Chlorophyll from Obsolete Tomato Leaves by Ultrasonic Wave with Microwave

YIN Yong-Zhong HE Qing-Yun CHEN Li-Hua PAN Qi WANG Wen-Chang  
(College of Chemistry and Chemical Engineering of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, P. R. China)

**Abstract** Chlorophyll was extracted from the obsolete tomato leaves by ultrasonic-microwave coordinated method. The influence factors, such as solvent, concentration of ethanol, power of microwave, ultrasonic temperature, ultrasonic time, the ratio of material-solvent (g/mL) and microwave time, were discussed based on the single factor and orthogonal tests, then the demonstration test was carried out. The optimal extracting conditions were obtained as follow: ethanol concentration of 90%, microwave power of 500W, ultrasonic temperature of 70°C, ultrasonic time of 40min, the ration of material-solvent of 1 : 10(g/mL), and microwave time of 300s. Under the optimal conditions, the yield of chlorophyll was 2.86 times than that of the general methods.

**Key words** Tomato Leaves; Chlorophyll; Ultrasonic Wave; Microwave; Extraction

这真是令人啼笑皆非  
——由重大发明写成的论文被判为“没有发表价值”

### 欢迎作者将被他刊拒绝的佳作再投本刊

在物理学的科技成就中, 激光可算是仅次于核能的 1 项重大发明创造。第 1 台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼(见本刊《邮票上的科学家——佼佼者之路》一书中之 M4)发明的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文, 理由是: 这是微波激光物理方面的文章, 对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着, 梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志, 这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来, 梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训, 本刊收到的论文, 即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突, 只要是言之有理, 也给予发表。因为“仁者见之谓之仁, 智者见之谓之智”(《周易·系辞上》), 不同人从不同角度看问题, 难免不同。我们欢迎作者将被他刊判为“没有发表价值”的佳作, 再投本刊。

繁荣学术交流事业, 需要“宽容”精神!

兆谱实验室编辑部