

# 芦荟皮叶绿素的提取及稳定性研究

陈新香 蔡碧琼 蔡珠玉 陈杰博 苏金为

(福建农林大学 生命科学学院 福建 福州 350002)

摘要:以芦荟皮为原料,采用醇提法提取芦荟皮中的叶绿素。通过单因素试验分析了浸提溶剂种类、浸提溶剂浓度、浸提温度、浸提时间和料液比等5个主要因素对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。在单因素的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化芦荟皮叶绿素的提取工艺,并对叶绿素的光稳定性、热稳定性以及耐酸碱性等方面进行研究。结果表明:体积分数 $\varphi$ (乙醇)=85%、浸提温度80℃、浸提时间5.0h、料液比1:50是最优工艺条件,叶绿素的提取率可达0.1970mg/g。芦荟皮叶绿素具有良好的耐热性;自然光长时间照射会影响叶绿素的稳定性;在弱碱性介质环境中,叶绿素稳定性良好。

关键词:芦荟皮;叶绿素;提取;稳定性

中图分类号:S567.23\*9 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0175-06

## Extraction and Stability of Chlorophyll from the Husk of *Aloe vera*

CHEN Xin-xiang, CAI Bi-qiong, CAI Zhu-yu, CHEN Jie-bo, SU Jin-wei

(College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The husk of *Aloe vera* was used as the raw material for extracting chlorophyll with ethanol as extractant. Using single factor analysis method, the influences of extracting solvents, extracting solvent concentration, extraction temperature, extraction time and ratio of liquid to solid on extraction efficiency were studied.  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment was adopted for getting the optimal mixed technique parameters. Moreover, the photo-stability and thermo-stability of the chlorophyll and its tolerance for acidification were further studied. The result indicated that the extraction ratio of chlorophyll could amount to 0.1970 mg/g with 85% of ethanol, 80 °C of extraction temperature, 5.0 h of extraction time and 1:50 of liquid to solid ratio. The study also showed that chlorophyll had good tolerance for thermo-stability. The stability of the chlorophyll could be influenced by lightening. Chlorophyll was relatively stable under alkalescent circumstances.

**Key words:** the husk of *Aloe vera*; chlorophyll; extraction; stability

叶绿素作为从绿色植物中提取的一种天然色素,具有安全无毒、着色自然鲜艳等优点,广泛应用于食品、化妆品及药物的着色<sup>[1]</sup>;同时它还具有改善便秘、降低胆固醇、抗衰老、排毒消炎、脱臭、抗癌抗突变等功能,在医药、除臭剂及各种口服保健品中也具有广泛应用<sup>[2,3]</sup>。目前,叶绿素的提取多以植物的叶子或以叶绿素含量较高的蚕沙为原料,这不仅会受季节的影响,而且有些树叶含有难以分离的毒素<sup>[4]</sup>。芦荟(*Aloe vera*)是一种多年生常绿肉质草本植物<sup>[5]</sup>,据不完全统计,目前全国芦荟种植面积约为800 hm<sup>2</sup>,分布较广,其中主要集中在云南、海南及福建等地,涉及芦荟丰产栽培与利用等方面的研究文献甚多<sup>[6-8]</sup>。芦荟产品主要是用去皮的芦荟原汁和叶肉冷冻干燥粉末作为原料加工而成的,它的加工

收稿日期:2009-08-31 修回日期:2009-12-15

基金项目:福建省自然科学基金(B0710008)和福建农林大学青年教师科研基金项目(06A11)

作者简介:陈新香(1982-),女,助理实验师,硕士,主要从事生物化学方面的研究, E-mail:chenxinxiang2001@163.com。

副产品如芦荟皮亟待开发利用。而以芦荟皮为原料提取叶绿素的研究尚未见报道。因此,以芦荟皮为原料,提取其中的叶绿素,变废为宝,既能提高芦荟的经济价值,也将为芦荟皮的开发利用提供一条新的途径。本研究将采用醇提法提取芦荟皮中的叶绿素,通过单因素及正交试验对芦荟皮中所含的叶绿素进行工艺优选,并对所得的叶绿素的稳定性进行研究,旨在为开发芦荟皮叶绿素及其综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料、试剂及仪器

1.1.1 材料 取新鲜芦荟(福州市盆栽芦荟),洗净,凝胶,烘干,粉碎,过 40 目筛后备用。

1.1.2 试剂 无水乙醇、丙酮、乙醚、乙酸乙酯、氢氧化钠均为分析纯。

1.1.3 仪器 Cary50 型紫外可见分光光度计(美国 VARIAN 公司);粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂);BS224S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);HH·S6 数显电热恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪表有限公司);SHB-Ⅲ 循环水真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HX-1050 恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 芦荟皮叶绿素的提取工艺流程 芦荟皮粉末→浸提→抽滤→减压蒸馏→膏状叶绿素半成品。

1.2.2 叶绿素的检测方法 测定植物叶片叶绿素含量常规方法是分光光度法。对芦荟皮叶绿素提取液用紫外-可见分光光度计在波长范围为 390~700 nm 内进行扫描,确定样品最大吸收峰,在此波长下测定提取液的吸光度( $A$ )。根据吸光度大小确定优化的工艺条件<sup>[9]</sup>。

1.2.3 单因素试验 (1)不同浸提溶剂对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。选用无水乙醇、丙酮、无水乙醚、乙酸乙酯 4 种溶剂为提取剂,各取 30 mL,每种溶剂中分别加入清洁粉碎的芦荟皮 0.500 0 g,浸提 48 h 后观察莴笋叶叶绿素在这些提取剂中的溶解性,提取液用 Cary50 型紫外可见分光光度计,在 665 nm 波长下进行测定,以蒸馏水为参比液,根据吸光度值确定色素相对含量。

(2)乙醇对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。称取 0.500 0 g 清洁粉碎的芦荟皮样品 7 份,分别移入 100 mL 的圆底烧瓶中,以体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 乙醇水溶液为提取液,料液比为 1:60,在 60 °C 下提取 1.5 h,测定提取液吸光度值。

(3)浸提温度对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。称取 0.500 0 g 清洁粉碎的芦荟皮样品 5 份,分别移入 100 mL 的圆底烧瓶中,以体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 85% 乙醇为浸提溶剂,料液比为 1:60,分别在 40、50、60、70、80 °C 条件下提取 1.5 h,测定提取液吸光度值。

(4)浸提时间对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。称取 0.500 0 g 清洁粉碎的芦荟皮样品 5 份,分别移入 100 mL 的圆底烧瓶中,以体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 85% 乙醇为浸提溶剂,料液比为 1:60,在 80 °C 下分别提取 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 h,测定提取液吸光度值。

(5)料液比对芦荟皮叶绿素提取效果的影响。称取 0.500 0 g 清洁粉碎的芦荟皮样品 4 份,分别移入 100 mL 的圆底烧瓶中,以体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 85% 乙醇为浸提溶剂,料液比分别为 1:50、1:60、1:70、1:80,在 80 °C 条件下回流提取 6.0 h,测定提取液吸光度值。

1.2.4 正交试验 为了进一步确定最佳提取工艺,采用 3 水平 4 因素正交试验对提取过程进行研究,根据单因素试验结果确定各因素的合理水平(表 1)。按照  $L_9(3^4)$  正交设计的试验方案(表 2)进行。

表 1 正交试验因素水平

Tab.1 Factors and levels in the orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors		
	A 温度/°C Temperature	B 时间/h Time	C 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> ) Ratio of liquid to solid
1	60	5.0	1:50
2	70	6.0	1:60
3	80	7.0	1:70

表 2 浸提条件正交试验结果  
Tab. 2 The orthogonal experimental results of extraction condition

试验号 Number	A	B	C	D(空白 Contrast)	吸光度(665 nm) Abs (665 nm)
1	1	1	1	1	1.440 3
2	1	2	2	2	1.095 9
3	1	3	3	3	0.978 2
4	2	1	2	3	1.306 6
5	2	2	3	1	0.924 0
6	2	3	1	2	1.415 8
7	3	1	3	2	1.448 3
8	3	2	1	3	1.891 2
9	3	3	2	1	1.674 8
$K_1$	3.514 4	4.195 2	4.747 3	4.039 1	
$K_2$	3.646 4	3.911 1	4.077 3	3.960 0	
$K_3$	5.014 3	4.068 8	3.350 5	4.176 0	
R	1.499 9	0.284 1	1.396 8	0.216 0	

1.2.5 叶绿素含量的计算 将所得膏状物质用无水乙醇稀释 100 倍,用 Cary50 型紫外可见分光光度计分别在 665 nm 和 649 nm 波长下进行吸光值的测定,并计算叶绿素的含量。计算公式如下<sup>[10]</sup>:

$$\text{叶绿素 a 浓度 (mg/L)} : C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649} \quad (1)$$

$$\text{叶绿素 b 浓度 (mg/L)} : C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665} \quad (2)$$

$$\text{叶绿素总浓度 (mg/L)} : C_{(a+b)} = C_a + C_b \quad (3)$$

$$\text{叶绿素含量 (mg/g)} = \text{叶绿素总浓度} \times \text{浸提液体积} \times \text{稀释倍数} / \text{样品(鲜)干质量} \quad (4)$$

1.2.6 芦荟皮叶绿素的稳定性研究 (1)光照对叶绿素稳定性的影响。取浓度相同的叶绿素稀释液分别置于自然光下和棕色瓶中避光保存,观察溶液颜色变化,并测定吸光度值。

(2)温度对叶绿素稳定性的影响。取浓度相同的叶绿素稀释液置于 40、60、80 °C 的水浴锅中,在放置不同的时间后,观察其颜色变化,冷却至室温后测定吸光度值。

(3)pH 值对叶绿素稳定性的影响。取浓度相同的叶绿素稀释液,然后用 0.10 mol/L HCl 和 0.10 mol/L NaOH 溶液调节其酸碱度分别为 pH = 1、3、5、7、8、9、11、13,观察溶液颜色变化,并测定吸光度值。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶绿素提取液最大吸收波长的确定

用 Cary50 型紫外-可见分光光度计对芦荟皮叶绿素提取液在波长范围为 390 ~ 700 nm 内进行扫描,结果见图 1。由图 1 可知,在 410 nm 和 665 nm 波长处叶绿素提取液有两个最大吸收峰。由于在浸提过程中没有除杂,浸提液中杂质的含量较大,如叶黄素、胡萝卜素等,而这些杂质的最大吸收峰接近 410 nm,因此,试验中应以 665 nm 处的吸光度为准<sup>[11]</sup>。

### 2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 不同浸提溶剂对芦荟皮叶绿素提取效果的影响 图 2 显示,在相同条件下,影响芦荟皮叶绿

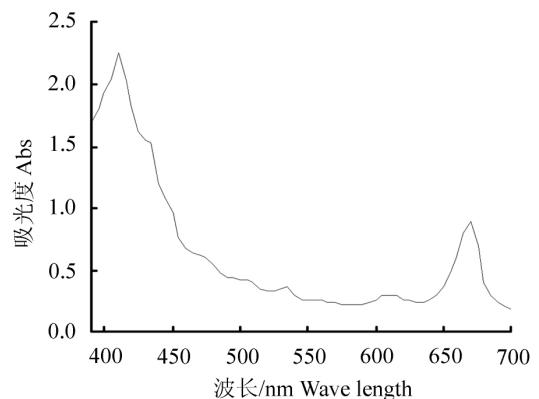


图 1 芦荟皮叶绿素的吸收光谱曲线

Fig. 1 The visible adsorption spectrum of the chlorophyll from the peel of aloe

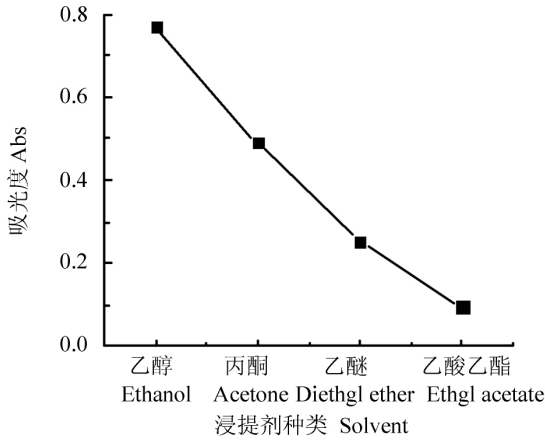


图 2 不同浸提剂对提取效果的影响

Fig. 2 Effects of solvents on extraction result

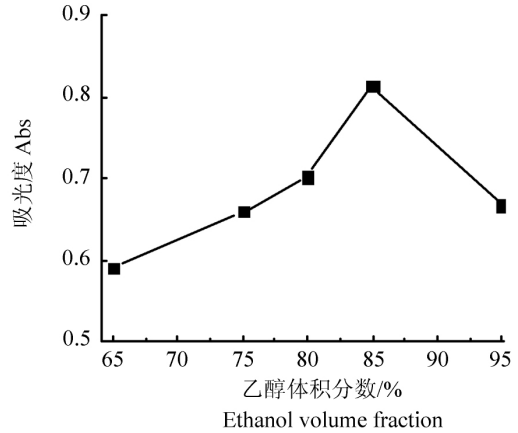


图 3 乙醇对提取效果的影响

Fig. 3 Effects of ethanol concentration on extraction result

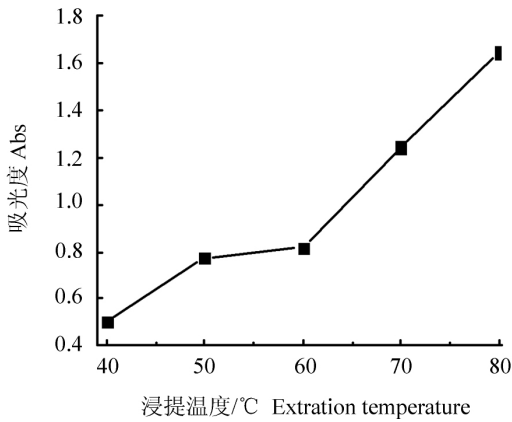


图 4 浸提温度对提取效果的影响

Fig. 4 Effects of extraction temperature on extraction result

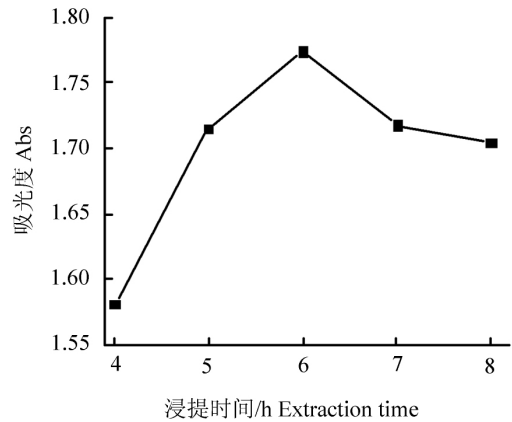


图 5 浸提时间对提取效果的影响

Fig. 5 Effects of extraction time on extraction result

素浸提效果的顺序是无水乙醇、丙酮、无水乙醚、乙酸乙酯。故本试验选取无水乙醇为浸提溶剂。

2.2.2 乙醇体积分数对芦荟皮叶绿素提取效果的影响 图 3 显示,随乙醇体积分数增加,芦荟皮叶绿素提取率先升高后降低,当乙醇体积分数达到 85% 时,叶绿素提取率最大。因为虽然叶绿素是脂溶性叶绿素,溶剂极性越大,溶解性越小,但也并不是溶剂极性越小越好,而应该是有一个适当的极性范围。乙醇体积分数为 85% 时,可能溶剂极性正好与叶绿素极性接近,叶绿素溶解性最大,提取率最大,故选择 85% 为最佳乙醇体积分数。

2.2.3 浸提温度对芦荟皮叶绿素提取效果的影响 图 4 显示,温度在 40 ~ 80 °C 时,随着温度的升高叶绿素浸出量逐渐增大,这是因为提取温度升高,可使分子的运动加剧,植物组织软化,促进膨胀,从而加速溶剂对芦荟皮的渗透及对叶绿素的溶解,同时促进叶绿素分子的扩散,提高提取效果。但在实践中,如果提取温度过高,不仅会影响到提取叶绿素的保存率,而且也会因为温度的提高而增加成本以及提取液的逸失。因此,提取温度应以 80 °C (回流) 为宜。

2.2.4 浸提时间对芦荟皮叶绿素提取效果的影响 图 5 显示,随着提取时间的增加,叶绿素提取率先升高后降低。当提取时间为 6.0 h 时,提取率达到最大。这说明提取时间为 6.0 h 时,已达到溶解-扩散平衡,若延长提取时间,反而会使叶绿素在热的条件下发生分解,导致提取率降低,故选择 6.0 h 为最佳提取时间。

2.2.5 料液比对芦荟皮叶绿素提取效果的影响 图 6 显示,叶绿素提取率随料液比的增大而减小,故选择料液比为 1:50。

2.3 正交组合设计试验

从正交试验(表 2)可见,极差  $R_A, R_B, R_C$  均大于空列,说明 A, B, C 因素对质量指标影响是可靠的,

影响顺序为  $R_A > R_C > R_B$ 。对表 2 的结果进行方差分析,结果见表 3。表 3 表明,浸提温度和料液比是影响叶绿素提取率的显著因子;浸提时间对提取率有影响,但不显著。本试验提取最佳工艺条件为  $A_3B_1C_1$  组合,即浸提温度为  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ,浸提时间为  $5.0\text{ h}$ ,料液比为  $1:50$ 。在此工艺条件下,叶绿素的得率为  $0.1970\text{ mg/g}$ 。

2.4 验证试验结果

为进一步证实优化组合的可靠性和合理性,对所选择的最佳工艺条件做验证试验,试验重复 3 次,结果表明,所得提取液的吸光度分别为  $2.0289$ 、 $2.0287$ 、 $2.0285$ ,平均值为  $2.0287$ ,远大于试验组合中的其它任何一组。可见本试验所选的工艺条件是适宜的。

表 3 正交试验结果的方差分析

Tab. 3 The variance analysis of the orthogonal experimental results

方差来源 Source of variation	离差平方和 Mean square deviation	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	均方比 F value	$F_{0.05}(2, 2)$	显著性 Significance
A	0.459 8	2	0.229 9	57.53	19.00	*
B	0.013 5	2	0.006 8	1.690 4		
C	0.325 4	2	0.162 7	40.71		*
D	0.008 0	2	0.004 0			
总和 Total	0.806 7	8	0.403 4			

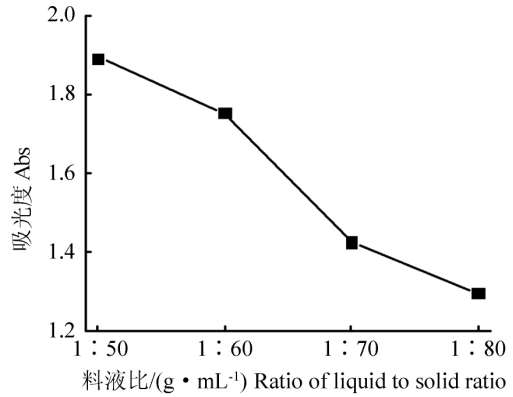


图 6 料液比对提取效果的影响

Fig. 6 Effects of liquid to solid ratio on extraction result

2.5 芦荟皮叶绿素的稳定性试验

2.5.1 光照对芦荟皮叶绿素稳定性的影响 由图 7 可知,在自然光长时间照射下,溶液吸光度变化较大,这说明光照会加速叶绿素的分解,而置于棕色瓶中的溶液的吸光度变化较小。因此,用芦荟皮叶绿素着色的食品在运输和贮存过程中,应尽量避免暴露在自然光下长时间照射。

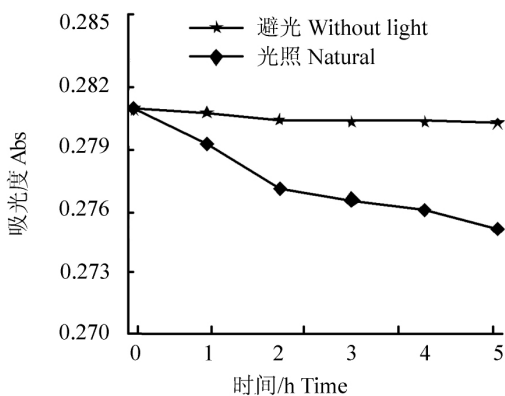


图 7 光照对叶绿素稳定性的影响

Fig. 7 Effects of light on the stability of chlorophyll

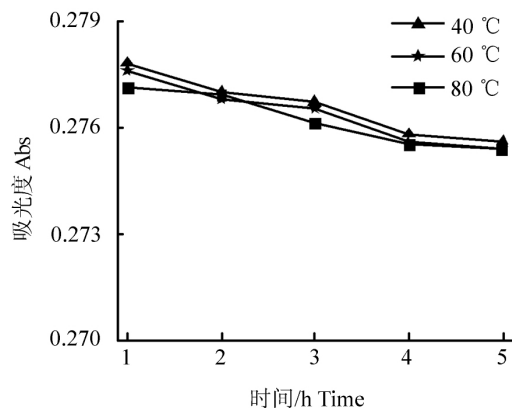


图 8 温度对叶绿素稳定性的影响

Fig. 8 Effects of temperature on the stability of chlorophyll

2.5.2 温度对芦荟皮叶绿素稳定性的影响 由图 8 可知,随着加热时间的延长,  $40$ 、 $60$ 、 $80\text{ }^\circ\text{C}$  处理后,溶液吸光度有小幅波动,但不同处理之间差异并不显著,且溶液颜色几乎没有变化。可见,芦荟皮叶绿素对热的耐受性较好。

2.5.3 pH 值对芦荟皮叶绿素稳定性的影响 由图 9 可见,在弱碱性溶液中(溶液呈绿色),溶液吸光度较大,随着 pH 值的降低或升高(溶液颜色均逐渐变浅),溶液吸光度均逐渐减小。这可能是因为酸性

过强会导致叶绿素脱镁而褪色明显,碱性过强则会加速脱酯反应使叶绿素分解,反之,在弱碱性条件下若不发生脱镁或碳环裂解反应却能保持相对稳定的色泽。因此,在使用中只要控制介质在弱碱性环境中,就基本上能维持芦荟皮叶绿素的稳定性。

### 3 结 论

本研究通过乙醇浸提的单因素及正交试验,得到从芦荟皮中提取叶绿素的最佳浸提条件为:体积分数  $\varphi$ (乙醇) = 85%,浸提温度 80 °C,浸提时间 5.0 h,料液比 1:50,叶绿素提取率可达 0.197 0 mg/g。在影响芦荟皮叶绿素提取的各因素中,除乙醇因素外,其它 3 个因素中影响最大的为浸提温度,其次分别为料液比和浸提时间。由本试验所得的芦荟皮叶绿素具有良好的热稳定性,长时间光照会影响色素的稳定性。因此,用芦荟皮叶绿素着色的食品在运输和贮存过程中,应尽量避免暴露在自然光下长时间照射。芦荟皮叶绿素在弱碱性条件下基本上能稳定存在。

#### 参考文献:

- [1] 黄寿吾. 叶绿素的药理和临床应用[J]. 食品与药学, 2006, 8(4): 5-8.
- [2] 郑国栋, 欧阳文, 颜苗, 等. 叶绿素及其衍生物的药理研究进展[J]. 中南药学, 2006, 4(2): 146-148.
- [3] 柳新平, 王新明, 周开文, 等. 叶绿素在肿瘤防治中的应用研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2007, 14(3): 269-271.
- [4] 杨国恩, 吴志平, 李坤平. 竹叶叶绿素的提取及其性质的稳定[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(3): 109-110.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 196.
- [6] 黄衡宇, 李鹂, 杨胜辉. 芦荟的组织培养[J]. 吉首大学学报, 2000, 21(3): 11-13.
- [7] 杜勇军, 李惠芝, 祁云枝. 芦荟芽苗快繁及试管苗栽培驯化研究[J]. 西北农业学报, 2003, 12(1): 72-75.
- [8] 赵兴兵, 袁正仿, 郭轳丽, 等. 三种芦荟的组培快繁研究[J]. 信阳师范学院学报, 2001, 14(1): 111-113.
- [9] 张鸿发, 励建荣, 董军华. 从海带中提取叶绿素的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2000(2): 9-11.
- [10] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 游秀花, 林瑞余, 蔡碧琼, 等. 杉木叶绿素锌钠的制备工艺及稳定性[J]. 福建林学院学报, 2007, 27(2): 126-129.

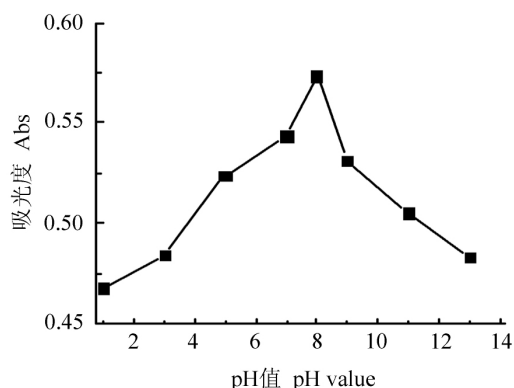


图9 pH 值对叶绿素稳定性的影响  
Fig.9 Effects of pH values on the stability of chlorophyll