

# 响应面法优化超声波提取构树叶中叶绿素的工艺研究

王丰俊 王运强 顾欣 李莉 黄建东 王建中

(北京林业大学生物科学与技术学院)

**摘要:**为实现构树叶的高附加值利用,选取影响超声波辅助提取构树叶中叶绿素提取效果的提取温度、超声波处理时间、超声波功率、液料比4个因素,通过单因素实验选取影响因素的水平,然后在单因素实验的基础上采用四因素三水平的响应面分析法(RSA),依据回归分析优化了超声波辅助提取构树叶中叶绿素的工艺方法。结果表明:超声波辅助提取构树叶中叶绿素的优化条件为提取温度60℃,超声波处理时间50 min,超声波功率500 W,液料比10 mL/g;该条件下,叶绿素的提取得率可达到1.277%。与传统的研磨法和溶剂萃取法相比,超声波辅助提取叶绿素大大缩短了提取时间,提高了有效成分的提取得率,是一种极具应用前景的方法。

**关键词:**叶绿素;超声波提取;响应面分析;构树叶

中图分类号:TS201.2 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)06-0135-06

WANG Feng-jun; WANG Yun-qiang; GU Xin; LI Li; HUANG Jian-dong; WANG Jian-zhong.  
**Optimization of ultrasonic extraction of chlorophyll from papermulberry leaves via response surface analysis.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010)32(6)135-140 [Ch, 17 ref.] College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

In order to achieve the high value-added-value utilization of papermulberry (*Broussonetia papyrifera*) leaves, we selected four factors which had effect on extraction rate of chlorophyll, i. e. extraction temperature, ultrasonic extraction time, ultrasonic power and ratio of liquid to material. Through single factor experiment and response surface analysis (RSA) with four factors three levels, the extraction conditions of ultrasonic wave assisted extraction for chlorophyll from papermulberry leaves were optimized. The results showed that the optimum extraction conditions were an extraction temperature of 60℃, ultrasonic extraction time 50 min, ultrasonic power 500 W and ratio of liquid to material 10 mL/g. Under the optimum extraction conditions, the extraction rate of the chlorophyll could reach 1.277%. Compared to conventional grinding extraction and solvent extraction, ultrasonic wave assisted extraction for chlorophyll from papermulberry leaves greatly saved extraction time and increased extraction rate of active principle, so this method has a good prospect of application.

**Key words** chlorophyll; ultrasonic extraction; response surface analysis; papermulberry leaves

自1913年诺贝尔奖获得者Willstatter报道了有关叶绿素结构、特点及检测方法以来,叶绿素及其衍生物促进造血<sup>[1]</sup>、抗诱变<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗菌抗病毒、抗氧化<sup>[4-6]</sup>、降血糖、降血脂、保肝<sup>[7]</sup>、加速创伤愈合、抗溃疡、排毒、抗炎、除臭等作用不断得到证实,叶绿素提取、制备、开发研究方兴未艾。根据目

前的研究进展,叶绿素的提取方法主要有丙酮研磨法、有机溶剂萃取法<sup>[8]</sup>、超临界CO<sub>2</sub>萃取法<sup>[9]</sup>、超声波辅助提取法<sup>[10]</sup>和微波辅助提取法<sup>[11]</sup>。国内外用于产业化提取天然叶绿素的材料较少,主要有蚕沙(*Bombyx mori*)<sup>[12]</sup>、菠菜(*Spinacia oleracea*)<sup>[13]</sup>、绿藻<sup>[14]</sup>、苜蓿(*Medicago sativa*)<sup>[11]</sup>、竹叶<sup>[10]</sup>等。寻求

收稿日期:2010-02-03

基金项目:国家自然科学基金项目(30570178)。

第一作者:王丰俊。主要研究方向:农林产品加工及贮藏工程。电话:010-62338221 Email:010100083@163.com 地址:100083北京市清华东路35号北京林业大学112信箱。

责任作者:王建中,教授。主要研究方向:农林产品加工及贮藏工程。电话:010-62338221 Email:w62338221@163.com 地址:同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

新的叶绿素提取原料,探索高效节能提取技术,是叶绿素提取、制备领域的发展方向。

构树 (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.) 通常用作生态防护林树种,由于其生长速度快,繁殖力强,纤维形态和制浆性能优良,目前多作为短轮伐期纸浆材树种。作为纸浆原料利用的是构树的木质部和韧皮部,采伐后大量叶子被弃作废物,不仅浪费资源,而且遗留火患。构树叶不仅含有丰富的蛋白质,叶绿素含量也显著高于蚕沙、苜蓿、竹叶、菠菜等。如何高效利用构树叶中的天然产物是生产中迫切需要解决的课题。本实验利用循环超声波处理技术,考察提取温度、超声波处理时间、超声波功率、液料比等工艺参数,采用响应面法进行工艺优化,应用 Design-Expert 软件进行数据拟合,探索超声波辅助提取构树叶叶绿素的优化工艺条件,以期为构树叶叶绿素产业化提取提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

构树叶:2009年8月采摘于北京林业大学,50℃烘干,粉碎机粉碎。

所用试剂均为分析纯。

### 1.2 主要的仪器与设备

SHB 循环水多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;CTXNW 循环超声提取机,北京弘祥隆生物技术开发有限公司;721 紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;DF204 电热鼓风干燥箱,北京西城区医疗器械二厂;高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;FA10004A 电子天平,精天精密仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 叶绿素的提取

准确称取粉碎的干构树叶粉末 10.0 g,加入一定体积的 90% 丙酮溶液作为提取溶剂,在超声波条件下提取叶绿素,然后抽滤,收集滤液,将滤液稀释 5 倍,进行吸光度测定。

#### 1.3.2 叶绿素质量浓度的测定

利用叶绿素提取液对可见光谱的吸收性能,根据朗伯-比尔定律 (Lambert-Beer's law)<sup>[15]</sup> 及吸光度的加和性原理,在 663 和 645 nm 处测定叶绿素丙酮提取液的吸光度 (A),利用 Arnon 法<sup>[16]</sup> 公式计算叶绿素质量浓度。

$$C_T = C_a + C_b = 20.2A_{645} + 8.02A_{663}$$

$$\text{提取得率} = C_T \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数} / \text{样品质量} \times 100\%$$

式中: $C_T$  为叶绿素的总质量浓度 (mg/L), $C_a$  为叶绿素 a 的质量浓度 (mg/L), $C_b$  叶绿素 b 的质量浓度 (mg/L)。

### 1.3.3 超声波辅助提取叶绿素的单因素实验

分别以不同提取温度、超声波处理时间、超声波功率、液料比为单因素进行单因素实验,考察各单因素对叶绿素提取得率的影响。每个单因素水平重复 3 次测其吸光值。

### 1.3.4 响应面分析法优化超声波辅助提取叶绿素的工艺参数

经单因素实验确定了叶绿素的提取温度、超声波处理时间、超声波功率和液料比为主要影响因素,运用 Design-Expert 7.1.6 软件程序根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理<sup>[17]</sup>,采用四因素三水平的响应面分析法,以叶绿素的提取得率为响应值作响应面,对提取条件进行优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声波辅助提取叶绿素的单因素实验结果

#### 2.1.1 处理时间对叶绿素提取得率的影响

由图 1 可以看出,超声波辅助处理时间在 20~40 min 范围之间,叶绿素的提取得率随时间的延长而提高较快,40~60 min 则增加缓慢。其原因可能是开始时随着超声波处理时间的延长,超声波对物料的作用就越充分,叶绿素提取得率越高;但当达到一定时间后,溶液体系渗透压达到平衡,导致叶绿素的浸出趋于平稳。

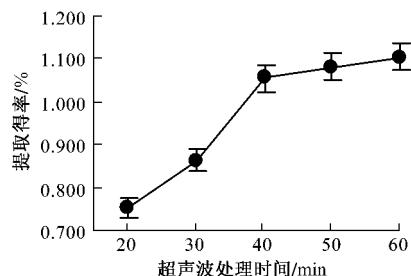


图 1 处理时间对提取得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on extraction rate

#### 2.1.2 提取温度对叶绿素提取得率的影响

由图 2 可以看出,其他条件不变,提取温度在 50℃ 以下,随着温度的增加,叶绿素的提取得率也随之增加且显著,50~60℃ 之间叶绿素提取得率下降不明显,超过 60℃ 叶绿素的提取得率急剧下降。其原因可能与叶绿素的热不稳定性有关,在 60℃ 以上叶绿素较易被热分解。因此,提取温度宜控制在 50~60℃ 之间。

#### 2.1.3 超声波功率对提取得率的影响

由图 3 可以看出:其他条件不变,超声波功率在

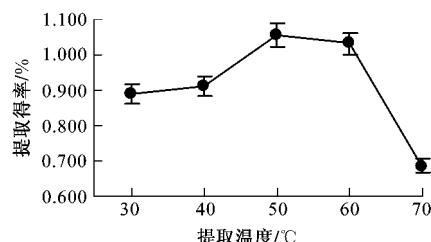


图2 提取得率对提取温度的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on extraction rate

400~600 W 之间,叶绿素的提取得率显著增加,说明超声波功率越大,空化和机械作用越强烈,分子扩散速度越大,600 W 时叶绿素的提取得率达到最高;反之在600 W 以上,随着超声波功率的增大叶绿素的提取得率明显下降,可能是随着超声波功率的升高,热效应产生的高温使叶绿素热分解加快,导致叶绿素提取得率降低。因此,超声波功率不宜太高。

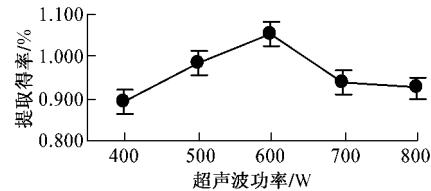


图3 超声波功率对提取得率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic power on extraction rate

#### 2.1.4 液料比对叶绿素提取得率的影响

图4表明,液料比在10 mL/g 时叶绿素的提取得率可达1.055%,此后趋于稳定。一定物料的前提下,溶剂用量越大,物料与溶剂的接触面浓度差越大,渗透压越大,叶绿素越容易浸出;当达到一定值以后,由于物料中叶绿素含量逐渐减少,越来越难以浸出,提取得率趋于稳定。

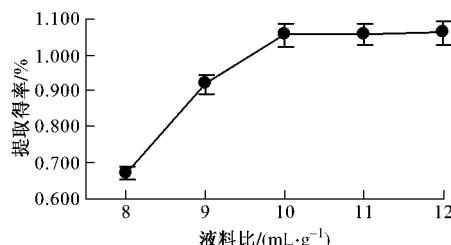


图4 液料比对提取得率的影响

Fig. 4 Effect of the ratio of liquid to material on extraction rate

### 2.2 响应面分析法优化构树叶中叶绿素的提取工艺

#### 2.2.1 响应面分析因素水平的选择

根据Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,选取提取温度、超声波处理时间、超声波功率和液料比4个因素,进行四因素三水平实验设计(取中心点为3),利用Design-Expert 7.1.6 软件进行数据拟合,实验因素与水平见表1。

表1 响应面分析因素与水平

Tab. 1 Analytical factors and levels for RSA

因 素	水 平		
	-1	0	1
提取温度/℃	40	50	60
超声波处理时间/min	30	40	50
超声波功率/W	500	600	700
液料比/(mL·g⁻¹)	9	10	11

#### 2.2.2 响应面分析方案及结果

以温度( $X_1$ )、超声时间( $X_2$ )、超声功率( $X_3$ )、液料比( $X_4$ )为自变量,叶绿素的提取得率( $Y$ )为响应值,进行响应面分析实验,实验方案及实验结果见表2。

表2 响应面分析方案及实验结果

Tab. 2 Program and experimental results of RSA

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y/\%$
1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.054 6
2	0.000 0	0.000 0	-1.000 0	1.000 0	0.701 1
3	0.000 0	1.000 0	1.000 0	0.000 0	1.099 1
4	0.000 0	0.000 0	1.000 0	-1.000 0	0.737 4
5	0.000 0	-1.000 0	1.000 0	0.000 0	1.102 9
6	0.000 0	1.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.836 0
7	1.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.000 0	1.053 2
8	0.000 0	-1.000 0	-1.000 0	0.000 0	0.635 6
9	-1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	0.461 2
10	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.095 7
11	-1.000 0	0.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.461 4
12	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.047 5
13	1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.000 0	1.100 8
14	0.000 0	1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.471 6
15	1.000 0	0.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.715 4
16	1.000 0	-1.000 0	0.000 0	0.000 0	0.630 3
17	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0	1.321 8
18	0.000 0	-1.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.553 5
19	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.060 1
20	0.000 0	0.000 0	-1.000 0	-1.000 0	0.742 0
21	-1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.000 0	0.922 9
22	1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.037 9
23	-1.000 0	0.000 0	-1.000 0	0.000 0	0.444 0
24	-1.000 0	-1.000 0	0.000 0	0.000 0	0.617 3
25	-1.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	0.466 2
26	0.000 0	-1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.466 3
27	0.000 0	1.000 0	-1.000 0	0.000 0	1.173 4

#### 2.2.3 方差分析结果

通过Design-Expert 7.1.6 软件进行二次响应面回归分析,对实验结果回归拟合后所得的模拟方程为:
$$Y = 1.05 + 0.19X_1 + 0.094X_2 + 0.13X_3 + 0.035X_4 + 0.16X_1X_2 - 0.11X_1X_3 + 0.079X_1X_4 - 0.14X_2X_3 - 0.069X_2X_4 + 0.16X_3X_4 - 0.19X_1^2 - 0.17X_2^2 + 0.067X_3^2 - 0.25X_4^2$$
。其决定系数 $R^2 = 0.9169$ ,表明该回归模型的拟合情况较好,实验值与预测值比较接近,模型的可靠性可通过方差分析及相关系数来考察(见表3)。

表3 二次响应面回归模型方差分析表

Tab. 3 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	Pr > F	显著性
$X_1$	1	0.430	0.430	25.34	0.000 3	**
$X_2$	1	0.110	0.110	6.35	0.027 0	*
$X_3$	1	0.200	0.200	11.69	0.005 1	**
$X_4$	1	0.015	0.015	0.87	0.368 9	
$X_1 X_2$	1	0.097	0.097	5.75	0.033 7	*
$X_1 X_3$	1	0.047	0.047	2.77	0.122 1	
$X_1 X_4$	1	0.025	0.025	1.50	0.243 9	
$X_2 X_3$	1	0.073	0.073	4.36	0.058 7	
$X_2 X_4$	1	0.019	0.019	1.14	0.306 0	
$X_3 X_4$	1	0.098	0.098	5.82	0.032 8	*
$X_1^2$	1	0.190	0.190	11.04	0.006 1	**
$X_2^2$	1	0.150	0.150	9.12	0.010 7	*
$X_3^2$	1	0.024	0.024	1.42	0.256 0	
$X_4^2$	1	0.330	0.330	19.60	0.000 8	**
总回归	14	1.750	0.130	7.46	0.000 6	*
总残差	12	0.200	0.017			
总离差	26	1.960				
失拟差	10	0.200	0.020	505.11	0.002 0	

注: \* 为 5% 显著水平, \*\* 为 1% 显著水平。

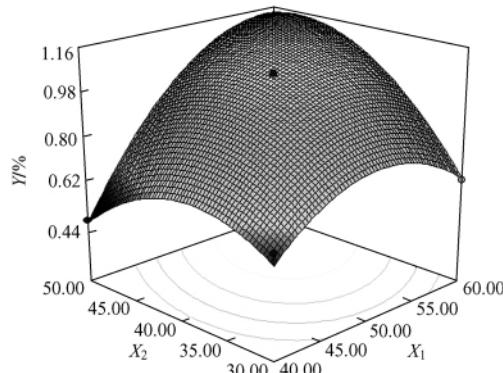
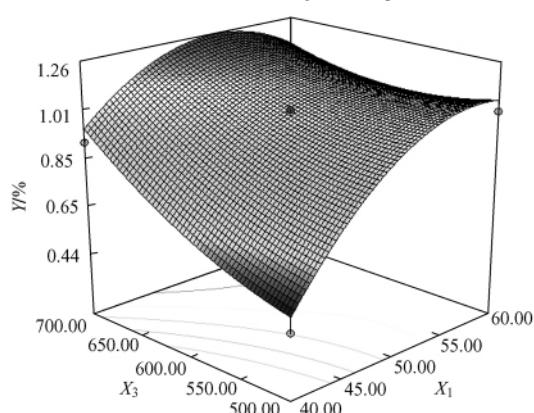
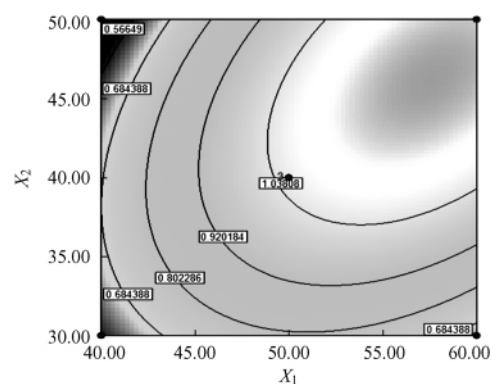
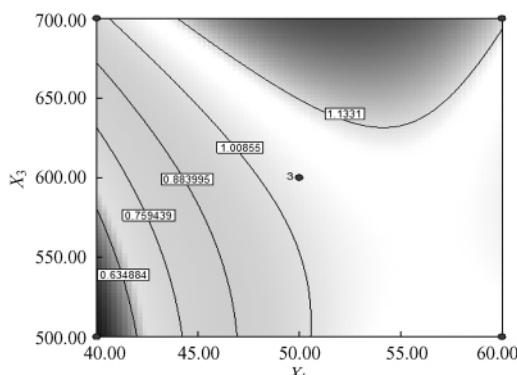
从方差分析结果可知, 模型在  $P \leq 0.01$  水平时差异显著, 因变量与所有自变量之间的线性关系显著 ( $R^2 = 0.9169$ ), 说明该模型能够较好地描述实验结果。从表 3 中可以看出,  $X_1$ 、 $X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_4^2$  项为极显著影响因素,  $X_2$ 、 $X_1 X_2$ 、 $X_3 X_4$ 、 $X_2^2$  项为显著影

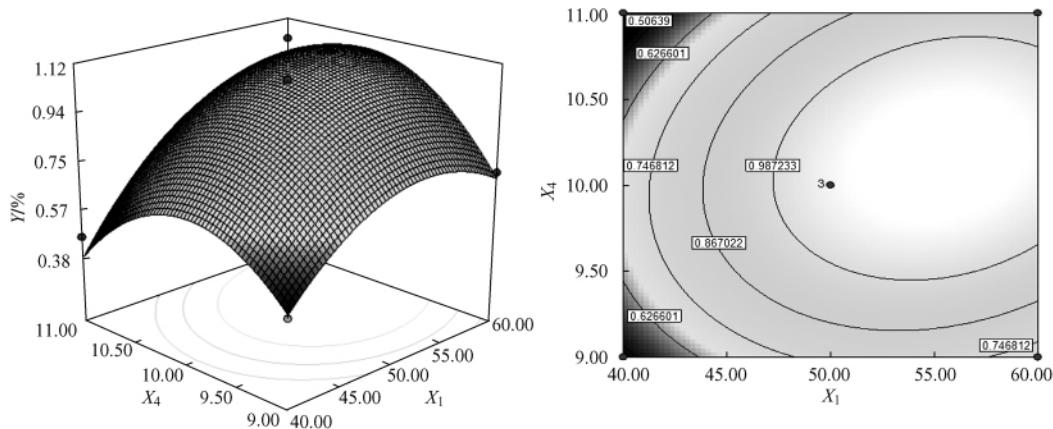
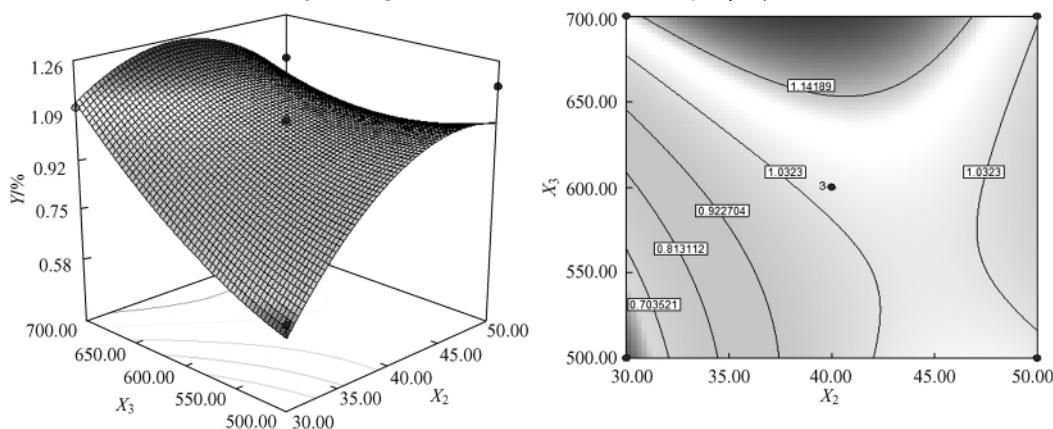
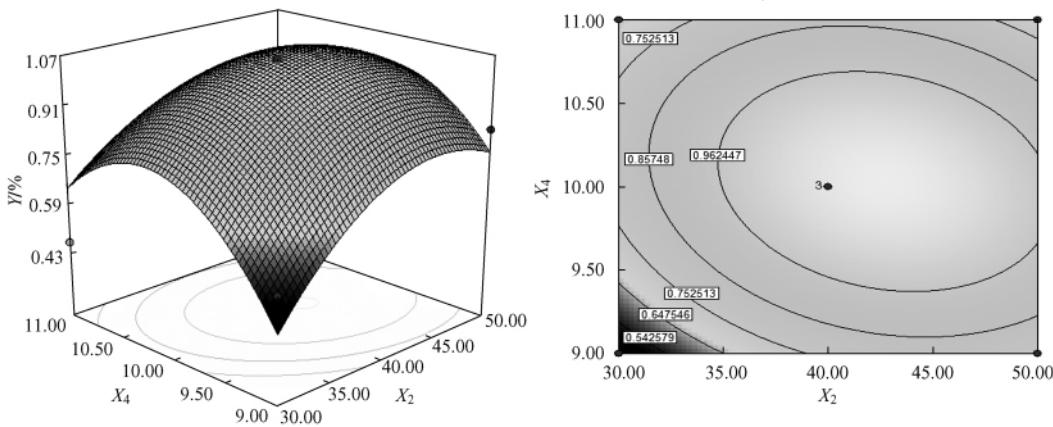
响因素。通过对  $Y$  的回归系数的检验可知, 各因素对叶绿素提取得率影响的大小顺序为: 提取温度 ( $X_1$ ) > 超声波功率 ( $X_3$ ) > 超声波处理时间 ( $X_2$ ) > 液料比 ( $X_4$ )。

#### 2.2.4 响应面与等高线

根据拟合函数, 每 2 个因素对提取得率画出响应面和等高线图, 此时考虑到定性分析各因素对提取得率的关系, 固定另外 2 个因素时, 均作“0”水平处理。图 5~10 为各因素交互作用的响应面和等高线图。

图 5~10 直观地反映了每 2 个因素对响应值的影响, 由等高线图可以看出存在极值的条件应该在圆心处。随着每个因素的增大, 响应值增大; 当响应值增大到极值后, 随着因素的增大, 响应值逐渐减小; 比较 6 组图可知, 对叶绿素提取得率影响显著的因素, 表现为曲线较陡; 对叶绿素提取得率影响次显著或不显著的因素, 表现为曲线较为平滑, 随其数值的增加或减少, 响应值变化较小。在交互项对提取得率的影响中, 提取温度与提取时间 ( $X_1 X_2$ )、超声波功率与液料比 ( $X_3 X_4$ ) 对叶绿素提取得率的影响较显著。另外, 由图可知该模型在实验范围内存在稳定点, 且稳定点是最大值。

图 5  $Y=f(X_1, X_2)$  的响应面与等高线Fig. 5 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_2)$ 图 6  $Y=f(X_1, X_3)$  的响应面与等高线Fig. 6 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_3)$ 

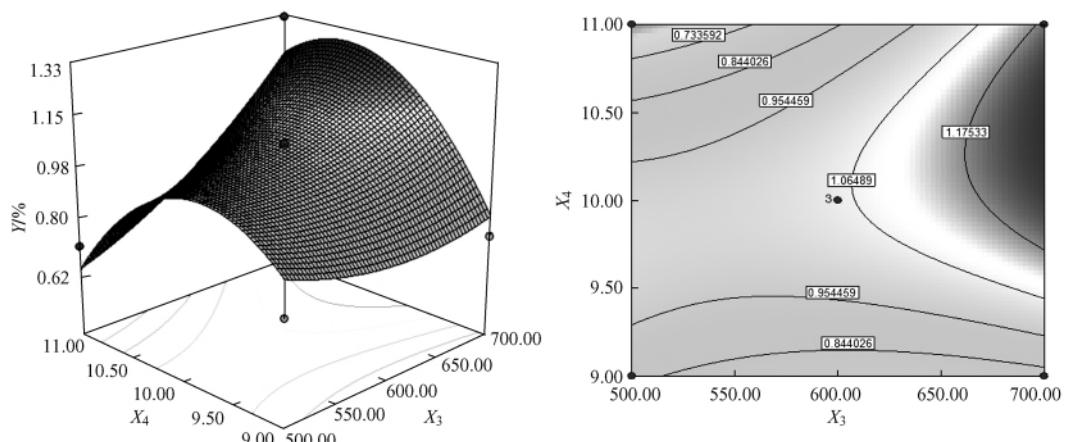
图7  $Y=f(X_1, X_2)$  的响应面与等高线Fig. 7 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_2)$ 图8  $Y=f(X_2, X_3)$  的响应面与等高线Fig. 8 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_2, X_3)$ 图9  $Y=f(X_2, X_4)$  的响应面与等高线Fig. 9 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_2, X_4)$ 

### 2.2.5 超声波辅助提取构树叶中叶绿素工艺条件的优化

回归方程中二次项  $X_1^2, X_2^2, X_4^2$  的系数为负数,而  $X_3^2$  的系数为正数,说明响应曲面为鞍型反应面,极值点可能不只一个。因此不能直接从此二次响应面上找出最佳工艺参数,需要进一步分析,利用 Design-Expert 7.1.6 对工艺条件进行优化,结果见表 4。

由表 4 可以看出,最大响应值时各因素的编码分别是  $X_1 = 1.000, X_2 = 1.000, X_3 = -1.000, X_4 =$

$-0.223$ ,此时的提取温度  $X_1 = 60^\circ\text{C}$ ,超声波处理时间  $X_2 = 50 \text{ min}$ ,超声波功率  $X_3 = 500 \text{ W}$ ,液料比  $X_4 = 9.777 \text{ mL/g}$ 。由此可以确定超声波辅助提取构树叶绿素的优化工艺参数为:提取温度为  $60^\circ\text{C}$ ,超声波处理时间  $50 \text{ min}$ ,超声波功率  $500 \text{ W}$ ,液料比  $9.777 \text{ mL/g}$ ,在此条件下,提取得率的理论值可达到  $1.33072\%$ 。为了验证 RSA 的可靠性,根据实际情况,采用优化条件对构树叶绿素的提取进行验证实验,提取温度为  $60^\circ\text{C}$ ,提取时间为  $50 \text{ min}$ ,超声功率

图 10  $Y = f(X_3, X_4)$  的响应面与等高线Fig. 10 Responsive surfaces and contours of  $Y = f(X_3, X_4)$ 

为 500 W , 液料比为 10 mL/g , 经过 3 次平行实验 , 实际提取得率的平均值为 1.277% , 与理论预测值接近 , 证明该回归模型具可靠性。

表 4 优化结果

Tab. 4 The optimization results

编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y/\%$
1	1.000	1.000	-1.000	-0.223	1.330 72
2	1.000	1.000	-1.000	-0.235	1.330 69
3	1.000	1.000	-1.000	-0.211	1.330 68
4	1.000	0.994	-1.000	-0.246	1.330 19
5	1.000	0.981	-1.000	-0.227	1.329 49
6	1.000	0.959	-1.000	-0.204	1.327 90
7	1.000	0.982	-1.000	-0.138	1.327 85
8	1.000	0.985	-1.000	-0.313	1.327 67
9	1.000	1.000	-0.098	-0.236	1.325 11
10	1.000	1.000	-1.000	-0.062	1.324 20

### 3 结 论

本实验利用超声波辅助提取构树叶中叶绿素得到的优化模拟方程为:  $Y = 1.05 + 0.19X_1 + 0.094X_2 + 0.13X_3 + 0.035X_4 + 0.16X_1X_2 - 0.11X_1X_3 + 0.079X_1X_4 - 0.14X_2X_3 - 0.069X_2X_4 + 0.16X_3X_4 - 0.19X_1^2 - 0.17X_2^2 + 0.067X_3^2 - 0.25X_4^2$  , 模型在实验范围内可靠 , 应用响应面分析法得到的优化工艺条件为提取温度 60°C , 超声波处理时间 50 min , 超声波功率 500 W , 液料比 9.777 mL/g , 在此条件下 , 提取得率的理论值可达到 1.330 72% 。 3 次验证实验将液料比调整为 10 mL/g , 叶绿素提取得率的平均值为 1.277% 。与传统的研磨法和溶剂萃取法相比 , 超声波辅助提取叶绿素不仅大大缩短了提取时间 , 而且提高了有效成分的提取得率 , 节约了溶剂 , 提高了经济效益 , 是一种极具应用前景的方法。

### 参 考 文 献

- [1] 蒋慧芳. 叶绿素铜钠盐联合三黄三仙汤治疗慢性再生障碍性贫血 33 例临床观察 [J]. 中国中医药科技 , 2009 , 16 (3): 235-236.

[2] 郭亚杰. 彗星试验检测叶绿素的抗诱变性 [J]. 毒理学杂志 , 2008 , 22 (2): 149-151.

[3] 李丽贤 , 陈新 , 崔健 , 等. 叶绿素口腔溃疡膜的制备与应用 [J]. 长春中医药大学学报 , 2004 , 20 (4): 41.

[4] KAMAT J P , BOLOOR K K , DEYASAGAYAM T P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2000 , 1487 (2-3): 113-127.

[5] BOLOOR K K , KAMAT J P , DEYASAGAYAM T P. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization [J]. *Toxicology* , 2000 , 155 (1-3): 63-71.

[6] KUMAR S S , DEYASAGAYAM T P , BHUSHAN B , et al. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: An ESR study [J]. *Free Radic Res* , 2001 , 35 (5): 563-574.

[7] SATO M , IMAI K , KIMURA R , et al. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VIII. Its effect on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats [J]. *Chem Pharm Bull* , 1985 , 33 (8): 3530-3533.

[8] 麻朋友 , 麻成金 , 肖桌柄 , 等. 猕猴桃叶中叶绿素的提取研究 [J]. 食品工业科技 , 2006 , 27 (6): 140-143.

[9] 吴浩 , 金君素 , 张泽廷 , 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取毛竹叶中的叶绿素 [J]. 北京化工大学学报 , 2007 , 34 (1): 92-94.

[10] 张静平. 超声波辅助提取毛竹叶中叶绿素的研究 [J]. 资源开发与市场 , 2008 , 24 (6): 488-489.

[11] 王红丽 , 张珍 , 曹致中 , 等. 苜蓿叶绿素微波萃取的最佳工艺条件 [J]. 甘肃农业大学学报 , 2007 , 42 (6): 134-137.

[12] 颜杰 , 李富兰 , 高瀚云 , 等. 蚕沙中叶绿素铜钠盐和果胶的提取研究 [J]. 食品科技 , 2008 (3): 177-179.

[13] 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.

[14] 谌素华 , 王维民 , 蔡清 , 绿藻石莼叶绿素提取工艺的研究 [J]. 食品科技 , 2008 (2): 172-175.

[15] 邓芹英 , 刘岚 , 邓慧敏. 波谱分析教程 [M]. 北京 : 科学出版社 , 2003 : 2-3.

[16] 汪志国 , 王静 , 李国刚. 双波长分光光度法同时测定叶绿素 a , b [J]. 中国环境监测 , 1999 , 15 (5): 21-22.

[17] WU C F J , MICHAEL H. 试验设计与分析及参数优化 [M]. 张润楚 , 郑海涛 , 兰燕 , 等译. 北京 : 中国统计出版社 , 2000 : 341-382.

(责任编辑 董晓燕)