

研究简报

# 响应面法优化螺旋藻中叶绿素的 超声提取工艺

童 洋, 肖国民, 潘晓梅

(东南大学化学化工学院, 江苏 南京 211189)

关键词: 螺旋藻; 叶绿素; 超声提取; 响应面法

中图分类号: TQ 95

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2009) 11-2813-07

## Optimization of ultrasonic extraction of chlorophylls from *Spirulina platensis* by response surface methodology

TONG Yang, XIAO Guomin, PAN Xiaomei

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, Jiangsu, China)

**Abstract:** Chlorophylls were extracted by using ultrasonic from *Spirulina platensis*. Single factor examination and response surface analysis experiments were adopted to investigate the effects of extraction time, extraction solvent, solvent concentration, ratio of liquid to solid and extraction grade. The results showed that the optimal process parameters for this method were: extraction time of 56.5 min, ethanol concentration of 48.3% (vol) of ethanol/acetone solvent, and ratio of liquid to solid of 7.9 ml · g<sup>-1</sup>. The optimized chlorophylls extraction yield was 1.28%. The comparison experimental results indicated that the yield of chlorophylls by ultrasonic extraction was higher than that obtained from conventional solvent extraction.

**Key words:** *Spirulina platensis*; chlorophylls; ultrasonic extraction; response surface methodology

### 引 言

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 是一种丝状原核藻类, 富含藻蓝蛋白、叶绿素、胡萝卜素及不饱和脂肪酸等多种生物活性成分<sup>[1-3]</sup>。

叶绿素是绿色植物进行光合作用的主要色素, 常见的有叶绿素 a、叶绿素 b 等。叶绿素广泛应用于食品、医药等领域。近年来, 以叶绿素为起始原料, 利用其降解产物焦脱镁叶绿酸甲酯 (methyl pyropheophorbide a, MPPa) 进行结构修饰, 合成

并筛选叶绿素类第三代光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 抗癌靶向药物的研究见诸报道<sup>[4-5]</sup>。

叶绿素提取主要采用有机溶剂提取法<sup>[6-7]</sup>、超声提取法<sup>[8-9]</sup>和超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法<sup>[10-11]</sup>等, 提取原料一般为绿色植物叶片<sup>[12]</sup>、蚕沙<sup>[13-14]</sup>、海藻<sup>[15-16]</sup>等。有机溶剂提取法存在溶剂消耗大、提取率低等缺点; 本课题组采用美国 Thar 设备公司的 SFE-100-2-base 型号的超临界萃取装置进行螺旋藻中叶绿素的提取时发现, 提取过程须在很高压力下进行, 且叶绿素提取率低。而超声提取法则具有提取

2009-07-13 收到初稿, 2009-08-20 收到修改稿。

联系人: 肖国民。第一作者: 童洋 (1986—), 男, 硕士研究生。

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2009AA03Z222, 2009AA05Z437); 江苏省六大人才高峰资助项目 (2008028)。

Received date: 2009-07-13.

Corresponding author: Prof. XIAO Guomin, xiaogm@seu.edu.cn

Foundation items: supported by the High-tech Research and Development Program of China (2009AA03Z222, 2009AA05Z437) and the "Six Talents Pinnacle Program" of Jiangsu Province of China for Financial (2008028).

率高、溶剂用量少、不需加热，适于热敏性物质提取的优势。

本文利用超声提取法从螺旋藻中提取叶绿素，该法目前尚未见报道，且叶绿素提取率明显高于其他提取原料。同时，以叶绿素的提取率为响应因子，在单因素实验的基础上对超声提取过程中的各主要因素采用响应面法 (response surface methodology, RSM) 进行了优化，为产业化提供理论保障。

## 1 仪器与材料

### 1.1 材料及试剂

螺旋藻 (食用级) 购于江苏东方农物化学公司。乙醇购于国药集团化学试剂有限公司，分析纯。丙酮购于国药集团化学试剂有限公司，分析纯。

### 1.2 实验仪器

JA2003N 型电子天平，购于上海精密科学仪器有限公司；KH5200B 型数控超声波清洗器 (超声功率 200 W，超声频率 40 kHz)，购于昆山市超声仪器有限公司；UV-2450 型紫外可见分光光度仪，购于日本岛津公司。

## 2 实验方法

### 2.1 叶绿素提取

准确称取螺旋藻粉 5.00 g，加入一定量的提取溶液，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 50 倍，进行吸光度检测。全部实验在避光或弱光条件下进行。

### 2.2 叶绿素提取率测定

准确吸取 1 ml 叶绿素提取液，稀释至 50 ml，分别测定 645、663 nm 处的吸光度。

叶绿素 a 浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$$C_a = 12.7A_{663} - 2.69A_{645} \quad (1)$$

叶绿素 b 浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$$C_b = 22.9A_{645} - 4.68A_{663} \quad (2)$$

叶绿素提取率 (%)

$$y = \frac{(C_a + C_b)Vn}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $A_{645}$ 、 $A_{663}$  分别为叶绿素提取液在 645、663 nm 处的吸光度； $V$  为提取液的体积，L； $n$  为稀释倍数，本文为 50 倍； $m$  为螺旋藻质量，mg。

### 2.3 单因素实验

分别以不同的超声提取时间、提取溶剂、溶剂浓度、料液比和提取级数等为因素，考察各因素对叶绿素提取工艺的影响。

### 2.4 响应面法优化实验

在单因素实验的基础上，以超声提取时间、乙醇浓度和料液比等因素作为考察对象，以叶绿素提取率为响应值，采用 Design Expert 7.0.0 统计分析软件的响应面法安排实验，以获取最优化工艺参数。

## 3 结果与讨论

### 3.1 单因素实验结果

3.1.1 超声提取时间对叶绿素提取率的影响 准确称取 5.00 g 螺旋藻粉 6 份，分别置于 100 ml 锥形瓶中，然后分别加入无水乙醇 40 ml，超声提取 10、20、30、40、50、60 min，抽滤，收集滤液。将滤液稀释 50 倍，进行吸光度检测。

不同超声提取时间对螺旋藻中叶绿素提取率的影响如图 1 所示。由图可知，随着超声提取时间的增加，叶绿素提取率逐渐升高，当达到 50 min 时，叶绿素提取率达到最大；再延长超声提取时间，叶绿素提取率有所下降，这可能是因为随着超声提取时间的增加，超声的热效应变大，使得热敏性物质叶绿素发生一定的降解。

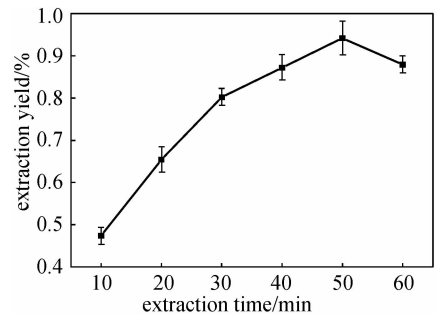


图 1 超声提取时间对叶绿素提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on extraction yield of chlorophylls

因此，选用 50 min 作为超声提取时间的最优值，同时，超声提取时间选择在 40~60 min 做进一步优化。

3.1.2 超声提取溶剂对叶绿素提取率的影响 准确称取 5.00 g 螺旋藻粉 5 份，分别置于 100 ml 锥形瓶中，然后分别加入无水乙醇 (A)、无水丙酮

(B)、乙醇/丙酮 (体积比为 1 : 1) (C)、乙醇/水 (体积比为 1 : 1) (D)、丙酮/水 (体积比为 1 : 1) (E) 40 ml, 超声提取 50 min, 抽滤, 收集滤液。将滤液稀释 50 倍, 进行吸光度检测。

不同超声提取溶剂对螺旋藻中叶绿素提取率的影响如图 2 所示。由图可知, 乙醇/丙酮 (体积比为 1 : 1) 作为超声提取溶剂时, 叶绿素提取率最高, 无水乙醇次之。可能的原因是混合溶剂的协萃效应使得叶绿素的溶解性能优于单一溶剂, 同时, 叶绿素是一种双羧酸酯, 不溶于水, 从而使得含水溶剂的提取率相对较低。

因此, 选用乙醇/丙酮混合溶剂作为超声提取溶剂。

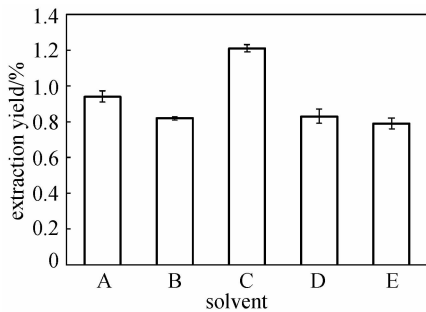


图 2 提取溶剂对叶绿素提取率的影响  
Fig. 2 Effect of extraction solvent on extraction yield of chlorophylls

**3.1.3 乙醇浓度对叶绿素提取率的影响** 准确称取 5.00 g 螺旋藻粉 5 份, 分别置于 100 ml 锥形瓶中, 然后分别加入乙醇体积分数为 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇/丙酮溶液 40 ml, 超声提取 50 min, 抽滤, 收集滤液。将滤液稀释 50 倍, 进行吸光度检测。

不同乙醇浓度对螺旋藻中叶绿素提取率的影响如图 3 所示。由图可知, 随着乙醇体积分数的增加, 叶绿素提取率逐渐升高, 当达到 50% 时, 叶绿素提取率达到最大; 再增加乙醇体积分数, 叶绿素提取率下降, 这可能是因为混合溶剂中乙醇体积分数很大时 (如 90%), 混合溶剂接近单一溶剂, 使得混合溶剂的协萃作用减弱。

因此, 选用乙醇体积分数为 50% 作为混合溶剂配比的最优值, 同时, 乙醇体积分数选择在 40%~60% 做进一步优化。

**3.1.4 液料比对叶绿素提取率的影响** 准确称取 5.00 g 螺旋藻粉 5 份, 分别置于 100 ml 锥形瓶中, 然后分别加入乙醇体积分数为 50% 的乙醇/丙酮溶

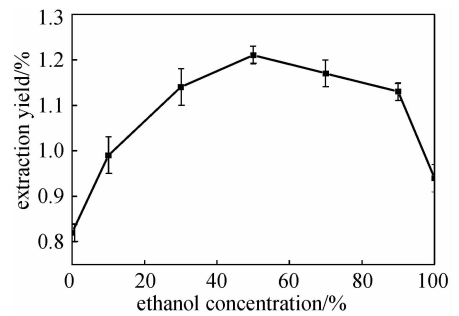


图 3 乙醇浓度对叶绿素提取率的影响  
Fig. 3 Effect of ethanol concentration on extraction yield of chlorophylls

液 20、30、40、50、60 ml, 超声提取 50 min, 抽滤, 收集滤液。将滤液稀释 50 倍, 进行吸光度检测。

不同液料比对螺旋藻中叶绿素提取率的影响如图 4 所示。由图可知, 随着液料比的增加, 叶绿素提取率逐渐升高, 当达到  $8 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$  时, 叶绿素提取率达到最大; 再增加液料比, 叶绿素提取率下降, 这可能是因为提取溶剂量加大时, 有利于叶绿素的溶出, 使得叶绿素的提取率增加, 但当提取溶剂量太大时, 叶绿素的溶出已基本达到平衡, 再加入溶剂, 提取效果并不明显; 同时, 大量的溶剂会影响提取体系的传热和传质, 反而不利于叶绿素的提取。此外, 溶剂量过大, 还会导致生产成本和溶剂回收成本的增加。

因此, 选用  $8 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$  作为叶绿素提取中液料比的最优值, 同时, 液料比选择在  $6 \sim 10 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$  做进一步优化。

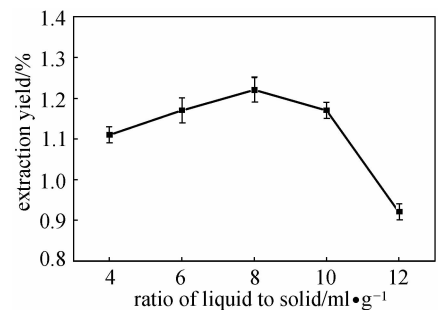


图 4 液料比对叶绿素提取率的影响  
Fig. 4 Effect of ratio of liquid to solid on extraction yield of chlorophylls

**3.1.5 提取级数对叶绿素提取的影响** 准确称取 5.00 g 螺旋藻粉, 置于 100 ml 锥形瓶中, 然后加入乙醇体积分数为 50% 的乙醇/丙酮溶液 40 ml, 超声提取 50 min, 然后抽滤, 滤渣再加入 40 ml 提

取溶剂进行第二级提取，提取方法同第一次。如此反复，直至萃取液的颜色接近无色，可以认为已完全提取。收集各次的滤液。分别将滤液稀释 50 倍，进行吸光度检测。

不同提取级数对螺旋藻中叶绿素提取率的影响如表 1 所示。

表 1 提取级数对叶绿素提取率的影响

Table 1 Effect of extraction grade on extraction yield of chlorophylls

Extraction grade	Extraction yield/%
1	1.23±0.02
2	0.20±0.01
3	0.04±0.01

由表 1 可知，随着提取级数的增加，叶绿素的提取率逐次降低。将前 3 次提取的总回收率设定为 100%，则第 1 次的回收率为 84%；前两次的累积回收率在 97% 左右。考虑到增加提取级数，会增加生产成本和溶剂回收成本，提取级数选择 1 次较合理。规模生产时亦可考虑提取 2 次，第 2 次的提取液作为下一批次的提取溶剂使用，以降低成本。

### 3.2 响应面分析法优化工艺条件

3.2.1 响应面分析因素水平的选取 综合单因素实验结果，选取超声时间 (a)、乙醇体积分数 (b) 和液料比 (c) 3 个因素进行中心组合设计 (central composite design, CCD) (取中心点为 6)，利用 Design Expert 7.0.0 软件进行数据拟合，以 +1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平，因子编码及水平见表 2。

表 2 响应面分析因素水平实验设计

Table 2 Experiment design of three factors and five levels of RSM

Level	Extraction time (a)/min	Ethanol concentration(b)/%	Ratio of liquid to solid(c)/ml · g <sup>-1</sup>
-1.68	33.2	33.2	4.6
-1	40.0	40.0	6.0
0	50.0	50.0	8.0
+1	60.0	60.0	10.0
+1.68	66.8	66.8	11.4

3.2.2 响应面分析方案及结果 以  $A=(a-50)/10$ ,  $B=(b-50)/10$ ,  $C=(c-8)/2$  为自变量，以叶绿素提取率为响应值 (Y)，进行响应面分析实验。表 3 给出由中心组合设计的实验结果及其预测值。

表 3 响应面分析方案及实验结果

Table 3 Experiment design and results of response surface methodology

No.	A /min	B /%	C /ml · g <sup>-1</sup>	Y/%	
				Actual value	Predicted value
1	-1	-1	-1	0.92±0.02	0.90
2	1	-1	-1	1.13±0.01	1.21
3	-1	1	-1	0.97±0.02	1.02
4	1	1	-1	1.18±0.03	1.17
5	-1	-1	1	0.98±0.02	1.00
6	1	-1	1	1.21±0.02	1.18
7	-1	1	1	1.17±0.03	1.11
8	1	1	1	1.09±0.01	1.13
9	-1.68	0	0	0.87±0.03	0.89
10	1.68	0	0	1.20±0.04	1.17
11	0	-1.68	0	1.14±0.01	1.12
12	0	1.68	0	1.18±0	1.18
13	0	0	-1.68	1.13±0.01	1.08
14	0	0	1.68	1.10±0.02	1.13
15	0	0	0	1.20±0.02	1.23
16	0	0	0	1.23±0.01	1.23
17	0	0	0	1.22±0.01	1.23
18	0	0	0	1.24±0.01	1.23
19	0	0	0	1.23±0.02	1.23
20	0	0	0	1.23±0.01	1.23

对实验数据进行多项拟合回归，建立回归方程

$$Y = 1.23 + 0.082A + 0.017B + 0.015C - 0.039AB - 0.034AC - 3.75 \times 10^{-3}BC - 0.070A^2 - 0.026B^2 - 0.042C^2$$

对模型进行方差分析，结果见表 4。

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for response surface quadratic model

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
model	0.21	9	0.024	10.95	0.0004
A	0.093	1	0.093	42.74	<0.0001
B	0.004	1	0.004	1.90	0.19
C	0.003	1	0.003	1.35	0.27
AB	0.012	1	0.012	5.54	0.040
AC	0.009	1	0.009	4.20	0.068
BC	0.000	1	0.000	0.052	0.82
A <sup>2</sup>	0.071	1	0.071	32.83	0.0002
B <sup>2</sup>	0.010	1	0.010	4.52	0.059
C <sup>2</sup>	0.025	1	0.025	11.72	0.0065
residual	0.022	10	0.0022		
lack of fit	0.021	5	0.0041	21.82	0.0021
pure error	0.00095	5	0.00019		
cor total	0.24	19			
R <sup>2</sup>	0.91				
Adj R <sup>2</sup>	0.83				
C. V. /%	4.12				

由表 4 可知, 本实验所选模型不同处理间差异极显著 (模型的  $P$  值  $< 0.05$ ), 说明回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其应变量与全体自变量之间的线性关系是显著的, 即这种实验方法是可靠的; 变异系数 (C.V. 值 4.12%) 较低, 说明实验有良好的稳定性; 模型的相关系数  $R^2 = 0.91$ , 说明该模型可靠性较好。

从回归方程模型因变量的方差分析可知, 模型一次项  $A$  ( $P < 0.0001$ ) 差异极显著,  $B$  ( $P = 0.19$ ),  $C$  ( $P = 0.27$ ) 差异不显著; 交互项  $AB$  ( $P = 0.040$ ),  $AC$  ( $P = 0.068$ ) 差异显著,  $BC$  ( $P = 0.82$ ) 差异不显著; 二次项  $A^2$  ( $P = 0.0002$ ),  $C^2$  ( $P = 0.0065$ ) 差异极显著,  $B^2$  ( $P = 0.059$ ) 差异显著。表明超声时间对叶绿素提取率的主效应明显, 且在超声时间、乙醇体积分数之间和超声提取时间、液料比之间存在交互作用。依据系数值  $A = 0.082$ ,  $B = 0.017$ ,  $C = 0.015$ , 可知因素的主效应关系为: 超声提取时间  $>$  乙醇体积分数  $>$  液料比。

3.2.3 响应面图分析 由回归方程绘制的响应曲面分析图如图 5~图 7 所示。响应面可直接反映出各因子对响应值的影响大小。

从图 5 结果可知, 在实验范围内, 乙醇体积分数不变, 随着超声时间的增加, 叶绿素提取率增加到最大值然后有所下降; 超声提取时间不变, 乙醇体积分数增加, 叶绿素提取率逐渐增大然后下降。这与单因素实验分析时的结果相吻合。叶绿素提取率的变化速率显示超声提取时间主效应大于乙醇体积分数, 与统计结果相符。

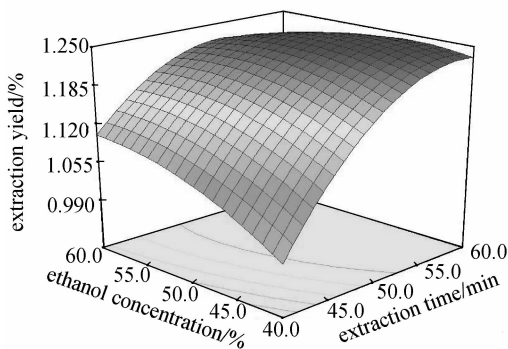


图 5 超声提取时间和乙醇体积分数对叶绿素提取率的响应面图

Fig. 5 Three-dimensional plot of effect of extraction time and ethanol concentration on extraction yield

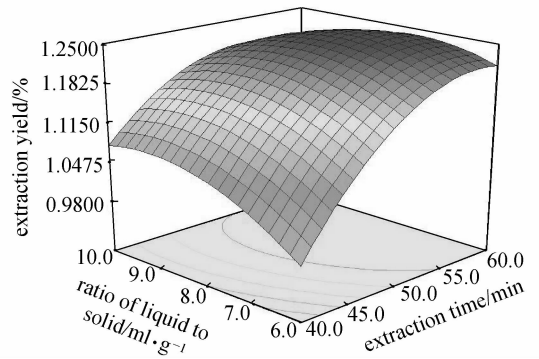


图 6 超声提取时间和液料比对叶绿素提取率的响应面图

Fig. 6 Three-dimensional plot of effect of extraction time and ratio of liquid to solid on extraction yield

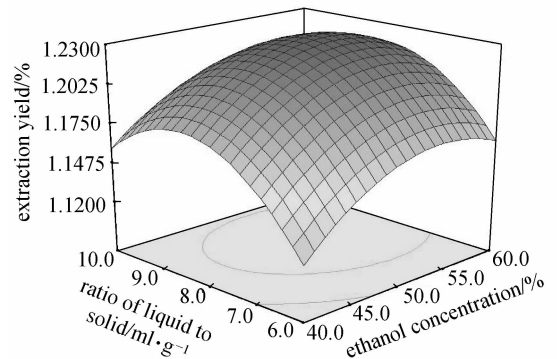


图 7 乙醇体积分数和液料比对叶绿素提取率的响应面图

Fig. 7 Three-dimensional plot of effect of ethanol concentration and ratio of liquid to solid on extraction yield

从图 6 结果可知, 在实验范围内, 液料比不变, 随着超声提取时间的增加, 叶绿素提取率增加到最大值然后有所下降; 超声提取时间不变, 液料比增加, 叶绿素提取率逐渐增大然后下降。这与单因素实验分析时的结果相吻合。叶绿素提取率的变化速率显示超声提取时间主效应大于液料比, 与统计结果相符。

从图 7 结果可知, 在实验范围内, 液料比不变, 随着乙醇体积分数的增加, 叶绿素提取率增加到最大值然后有所下降; 乙醇体积分数不变, 液料比增加, 叶绿素提取率逐渐增大然后下降。这与单因素实验分析时的结果相吻合。叶绿素提取率的变化速率显示乙醇体积分数主效应大于液料比, 与统计结果相符。

3.2.4 最优工艺条件求取 为了进一步确证最佳点的值,对回归方程取一阶偏导等于零,可以得到曲面的最大点,求导方程整理得

$$0.082 - 0.039B - 0.034C - 0.140A = 0$$

$$0.017 - 0.039A - 0.00375C - 0.052B = 0$$

$$0.015 - 0.034A - 0.00375B - 0.084C = 0$$

求解方程组得:  $A = 0.647$ ;  $B = -0.135$ ;  $C = -0.076$ 。最后求得超声提取时间、乙醇体积分数、液料比的最适值分别为:  $a = 56.5$  min,  $b = 48.3\%$  (体积),  $c = 7.9$  ml · g<sup>-1</sup>。此时,叶绿素的最高提取率为 1.26%。

经过中心组合设计优化提取条件,最佳的提取工艺参数为:超声提取时间为 56.5 min、乙醇/丙酮混合溶剂中乙醇体积分数为 48.3%、液料比为 7.9 ml · g<sup>-1</sup>,此时叶绿素提取率理论值可达到 1.26%。验证实验表明,提取率为 1.28%,与理论值相符。因此,采用响应面法得到的提取条件参数相对较为可靠,具有使用价值。

### 3.3 超声提取法与常规溶剂提取法的对比实验

前面实验已确定了超声提取的最优工艺条件,利用这些参数与常规溶剂提取法进行对比。

准确称取 5.00 g 螺旋藻粉 2 份,分别置于 100 ml 锥形瓶中,然后加入乙醇体积分数为 48.3% 的乙醇/丙酮混合溶液 39.5 ml (液料比为 7.9 ml · g<sup>-1</sup>),分别提取 56.5 min 和 10 h,然后抽滤,收集滤液。将滤液稀释 50 倍,进行吸光度检测。实验结果见表 5。

表 5 超声提取法与常规溶剂提取法的对比实验结果

Table 5 Comparison of ultrasonic and conventional solvent extraction technology

Extraction technology	Extraction yield/%
ultrasonic extraction	1.28 ± 0.03
conventional solvent extraction	0.08 ± 0.01 <sup>①</sup> 0.74 ± 0.03 <sup>②</sup>

① Extraction time = 56.5 min.

② Extraction time = 10 h.

由表 5 可知,超声提取螺旋藻中的叶绿素,其提取率远远优于常规溶剂提取法。可能的原因是超声波的空化效应使得螺旋藻细胞被均匀破坏,叶绿素较易溶出,而常规溶剂提取法尽管提取很长时间(10 h),但细胞结构没有遭到破坏,叶绿素传质阻力较大,从而提取率较低。

## 4 结 论

(1) 以螺旋藻为原料,采用超声提取的方法提取叶绿素,叶绿素提取率可达 1.28%。

(2) 通过单因素实验,得到较优的工艺条件:超声提取时间为 50 min,提取溶剂为乙醇体积分数为 50% 的乙醇/丙酮溶液,液料比为 8 ml · g<sup>-1</sup>,提取级数为一级。

(3) 在单因素实验的基础上,选取超声提取时间、乙醇体积分数和液料比 3 个因素进行中心组合设计,使用 Design Expert 7.0.0 软件进行数据拟合,建立了超声提取螺旋藻中叶绿素的工艺数学模型  $Y = 1.23 + 0.082A + 0.017B + 0.015C - 0.039AB - 0.034AC - 3.75 \times 10^{-3}BC - 0.070A^2 - 0.026B^2 - 0.042C^2$ 。回归分析表明,该模型的稳定性较好;通过模型系数显著性检验,得到因素的主效应关系为:超声提取时间 > 乙醇体积分数 > 液料比。

(4) 利用由响应面法得到的模型进行探讨,得到螺旋藻中叶绿素的超声提取过程优化的工艺条件:超声提取时间为 56.5 min、乙醇/丙酮混合溶剂中乙醇体积分数为 48.3%、液料比为 7.9 ml · g<sup>-1</sup>,此时叶绿素提取率理论值可达到 1.26%。验证实验表明,提取率为 1.28%,与理论值相符。因此,采用响应面法获得的螺旋藻中叶绿素的超声提取工艺条件,数据准确,科学可行。

(5) 超声提取法与常规溶剂提取法的对比实验结果表明,采用超声提取工艺提取螺旋藻中的叶绿素,提取率远远优于常规溶剂提取工艺。

## References

- [1] Ganapathi P, Chethana S, Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 2008, **99** (15): 7393-7396
- [2] Wang L, Pan B S, Sheng J C, Xu Juan, Hu Qiuhui. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 2007, **105** (1): 36-41
- [3] Muhling M, Belay A, Whitton B A. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *Journal of Applied Phycology*, 2005, **17** (2): 137-146
- [4] Wang Jinjun (王进军), Ji Jianye (纪建业), Jing Jirong (荆济荣), Li Jiazhu (李家柱), Han Guangfan (韩光范), Shim Youngke (沈荣基). Synthesis of methyl pyropheophorbide—a substituted with mono (di)-long

- chain alkyl group at 3-position. *Chinese Journal of Organic Chemistry* (有机化学), 2006, **26** (4): 470-476
- [5] Nifantiev Nikolay E, Yashunsky Dmitri V. Water-soluble mono-PEGylated tetra-pyrrole derivatives for photodynamic therapy and method of production; US, 6949581. 2005-09-27
- [6] Schumann R, Haubner N, Klausch S, Karsten Ulf. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, **55** (3): 213-222
- [7] Chen Suhua (谌素华), Wang Weimin (王维民), Cai Qing (蔡清). Study on the optimum extraction condition of the chlorophyll from *ulva pertusa*. *Food Science and Technology* (食品科技), 2008, **2** (53): 172-174
- [8] Zhang G M, Zhang P Y, Fan M H. Ultrasound-enhanced coagulation for *Microcystis aeruginosa* removal. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2009, **16** (3): 334-338
- [9] Xu Huaneng, Zhang Yingxin, He Chaohong. Ultrasonically assisted extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its mathematical model. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2007, **15** (6): 861-867
- [10] Macías-Sánchez M D, Mantell C, Rodríguez M, Martínez de la Ossa E, Lubián L M, Montero O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, **39** (3): 323-329
- [11] Liu Yuping (刘玉平), Sun Baoguo (孙宝国), Shi Huazhi (石华治), Zheng Fuping (郑福平). Extraction of concrete of patchouli stem and leaf with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*(化工学报), 2008, **59** (3): 791-795
- [12] Wang Haiyan, Zhao Mouming, Shen Guanglin, Rao Guohua. Extraction chlorophyll from tobacco leaf by microwave radiation. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2007, **25** (4): 25-27
- [13] Pan Huijuan (潘慧娟). Effects of different solvent on extraction of chlorophyll from silkworm excrement. *Journal of Hangzhou Teachers College: Natural Science Edition* (杭州师范学院学报: 自然科学版), 2006, **5** (1): 50-52
- [14] Yan Guiqin (严桂芹), Zhang Shiyuan (章世元), Wang Jun (王俊), Zhou Liangao (周联高), Guo Xinhua (郭新华). Chlorophyll extraction and determination from silkworm excrement. *Forestry Science & Technology* (林业科技), 2008, **33** (4): 60-62
- [15] Macías-Sánchez M D, Serrano C M, Rodríguez M, Enrique Martínez de la Ossa, Lubián M Luís, Montero Olimpio. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *Journal of Separation Science*, 2008, **31** (8): 1352-1262
- [16] Dai Rongji (戴荣继), Tong Bin (佟斌), Huang Chun (黄春), Wang Lei (王蕾). Determination of chlorophylls in drinking water by HPLC. *Transactions of Beijing Institute of Technology* (北京理工大学学报), 2006, **26** (1): 87-89