

超声波辅助提取 RP-HPLC 法测定浒苔中的叶绿素 a、b

程红艳¹, 陈军辉¹, 张道来¹, 赵恒强¹, 郑立¹, 臧家业¹, 王小如^{1,2}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所 海洋生态研究中心, 山东 青岛 266061; 2. 厦门大学 化学化工学院 化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了一种反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定浒苔(*Enteromorpha prolifera*)中叶绿素 a 和 b 含量。采用的色谱条件: Diamonsil-C18(4.6 mm×150 mm)柱, 流动相为甲醇(含 0.2%的乙酸)和丙酮, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长 430 nm。在此条件下, 叶绿素 a 和叶绿素 b 与浒苔中的其他化合物分离良好, 叶绿素 a、b 质量浓度为 0.50~500 mg/L 具有良好的线性关系($R^2=0.9999$), 能对浒苔提取液中的叶绿素 a、b 进行准确定量。

关键词: 浒苔(*Enteromorpha prolifera*); 叶绿素; 高效液相色谱法

中图分类号: Q503; O657.7+2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)02-0023-05

随着经济的发展, 人民生活水平的提高和健康保健意识的增强, 人们对食品的营养价值和标准提出了更高的要求。由于天然色素不但无害无毒, 还具有食品本身的色泽, 促进食欲, 增加消化液的分泌, 对人体有医疗和保健作用。因此寻找和开发天然色素已成为食用色素发展的必然趋势。叶绿素是绿色植物中广泛存在的一类脂溶性色素, 其结构与人类和大多数动物体内血液中红色素结构及其相似, 在某种意义上讲, 也是维持生命不可缺少的物质, 具有抗突变、促愈创伤、抗变应性、降低胆固醇、改善便秘等作用^[1]。因此天然叶绿素的开发具有广阔的前景。

海洋植物中叶绿素和其他辅助色素的含量高于陆生植物, 而且海洋植物生长快、产量大, 是天然叶绿素开发的良好原料^[2]。浒苔作为海洋中的藻类植物, 可以作为开发天然叶绿素的资源之一。然而目前国内还没有关于绿海藻浒苔中最主要的叶绿素 a、b 含量测定的报道, 也缺乏浒苔中叶绿素 a、b 快速测定的有效方法。叶绿素的测试方法主要有三类, 分别是分光光度法、荧光法和高效液相色谱法(HPLC)^[3]。其中 HPLC 法能对色素粗提物中的叶绿素单体及其衍生物分离, 是目前叶绿素单体准确测定最有效的方法^[4]。吴振斌等^[5]发展了微囊藻中叶绿素-a、β-胡萝卜素及脱镁叶绿酸-a 同步测定的 HPLC 法, 戴荣继等^[6]采用 HPLC 法对饮用水中藻类叶绿素 a、b 的含量进行了测定, Huang 等^[7]采用高效液相色谱-质谱法对绞股蓝中的叶绿素及其衍生物进行了分析测定,

而采用 HPLC 法测定绿海藻浒苔中叶绿素 a、b 的研究未见报道。本研究首次采用现代提取技术——超声波辅助提取法对浒苔中的叶绿素进行高效快速提取, 通过对色谱条件的系统优化, 建立了适用于绿海藻浒苔中叶绿素 a、b 快速测定的 RP-HPLC 法。

1 实验部分

1.1 主要仪器、试剂与原料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器、四元梯度泵等(美国 Agilent 公司); KQ-400KDE 型大功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); R201 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); FA1104 型电子天平(上海精天电子仪器厂); Milli-Q(18.2 MΩ) 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm, 中国 Dikma); Zorbax Bonus-RP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Extend-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5

收稿日期: 2009-03-12; 修回日期: 2009-07-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20905017, 20602009); 海洋公益性行业科研专项项目(200705011, 200805039); 国家海洋局 第一海洋研究所基本科研业务专项项目(GY-022008T32, GY-022008G47)

作者简介: 程红艳(1983-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物化学研究, E-mail: chenghongyan710@163.com; 陈军辉, 通信作者, 电话: 0532-88966705, E-mail: jhchen@fio.org.cn

μm)皆为美国 Agilent 公司生产。

甲醇、乙腈、乙酸、丙酮(Merck, 色谱纯), 及其他试剂均为国产分析纯; 叶绿素 a、b 标准品(美国 Fluka 公司, 纯度为 95%); 实验中所用溶液均用超纯水配制, HPLC 用所有试剂均经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤及超声脱气处理。浒苔样品为 2008 年 7 月份采自青岛近岸, 在超低温冰箱中冷冻保存。

1.2 色谱条件

迪马 Diamonsil-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为: 甲醇含有 0.2% 乙酸(A), 丙酮(B), 梯度洗脱程序见表 1, 柱温 25 , 流速 0.8 mL/min, DAD 430 nm 检测, 进样量为 10 μL。

表 1 流动相的梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient program of mobile phase

时间(min)	A (0.2%乙酸甲醇, %)	B (丙酮, %)
0	100	0
20	100	0
25	80	20

1.3 标准溶液的配制

分别取叶绿素 a、b 标准品(1.0 mg 包装), 置于 10 mL 容量瓶中, 用色谱纯甲醇定容至 10 mL 得到浓度为 100 mg/L 的叶绿素 a、叶绿素 b 标准储备液, 取少量标准品储备液稀释至合适浓度, 并配制混合标准品溶液, 用于色谱条件的优化和标准曲线的绘制, 标准品储备液密封后置于超低温冰箱中冷冻保存。

1.4 供试品溶液的制备

平行精密称取 6 份新鲜浒苔样品各 0.1 g, 其中 3 份置于 15 mL 玻璃离心管中, 加入 5 mL 甲醇, 超声波提取 5 min, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 置于棕色进样瓶中, 待测。另外 3 份置于玻璃表面皿, 然后置于干燥箱中, 在 60℃ 条件下烘干至恒质量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

据文献报道^[4-7], 反相 HPLC 技术较常用于叶绿素的分析测定, 而甲醇-水-丙酮以及甲醇-丙酮混合液多作为分离叶绿素的流动相; 考虑到叶绿素是一种极性较小、易于被反相柱保留的化合物, 而浒苔粗提物所含的化合物又较为复杂, 因此以不同比例的

甲醇-丙酮混合液为流动相, 对 4 根不同特点的反相 C₁₈ 柱进行了比较优化, 结果发现, 不同特点的色谱柱对浒苔中叶绿素及其衍生物的分离结果差异较大(特别是浒苔中叶绿素部分降解后生成了系列叶绿素衍生物), 4 根色谱柱当中迪马公司的 Diamonsil-C₁₈ 所获得的分离结果最为理想(各峰分离度高, 峰型对称), 这就说明在浒苔中叶绿素及其衍生物的 HPLC 分析中, 选择合适的色谱柱是非常关键的。

在选定色谱柱之后, 对以甲醇-丙酮以及甲醇-水-丙酮为流动相进行了比较, 结果表明以甲醇-丙酮为流动相时分离效果较好; 据文献报道^[4], 流动相中添加一定量的酸或缓冲盐可以改善叶绿素及其衍生物的峰型及分离效果, 在本研究中分别将 0.2% 磷酸、0.2% 乙酸、5 mmol/L 乙酸氨、5 mmol/L 磷酸盐加入流动相中, 结果显示, 流动相中添加 0.2% 的乙酸能获得理想的分离结果, 并且使用乙酸配制流动相简单方便、不损坏柱子和仪器硬件, 乙酸具有挥发性与质谱检测器兼容, 利于液相色谱-质谱联用分析叶绿素方法的开发。

叶绿素在可见光区有较强的特征吸收峰, 但是叶绿素 a 和 b 的最大吸收波长不同, 为了使叶绿素 a 和 b 均能获得较高的灵敏度, 本研究通过 DAD 全波段扫描(400 ~ 800 nm), 考察了不同检测波长对叶绿素 a、b 测定灵敏度的影响(图 1), 结果表明 430 nm 为检测波长时, 叶绿素 a、b 检测的灵敏度均较高, 并且能排除其他化合物的干扰, 与文献^[8]的结果一致, 因此, 选择 430 nm 作为浒苔中叶绿素 a、b 同步测定的最佳检测波长。

作者主要根据标准品的保留时间对叶绿素 a 和 b 的色谱峰定性, 将样品测定色谱图与标准品色谱图进行比较, 以确定叶绿素 a 和 b 的相应峰位。此外, 实验中还分别以适量的标准溶液加入样品溶液中同步分析, 通过对比各峰的峰面积值, 进一步确认峰面积明显增大的峰为叶绿素 a 和 b 峰。按 1.2 色谱条件测定对照品溶液和供试品溶液, 色谱图如图 2 所示, 比较图 2 A 和 B 可知, 在选定的色谱条件下叶绿素 a、b 色谱峰对称性好, 与其他组分达到基线分离, 可准确测定其峰面积, 并以峰面积进行定量分析。

2.2 超声波辅助提取条件的优化

超声波辅助提取是利用超声场强化提取天然产物中目标化合物的现代提取方法, 其原理^[9]是: 存在于物质中的微气核(空化核)在超声场的作用下产生

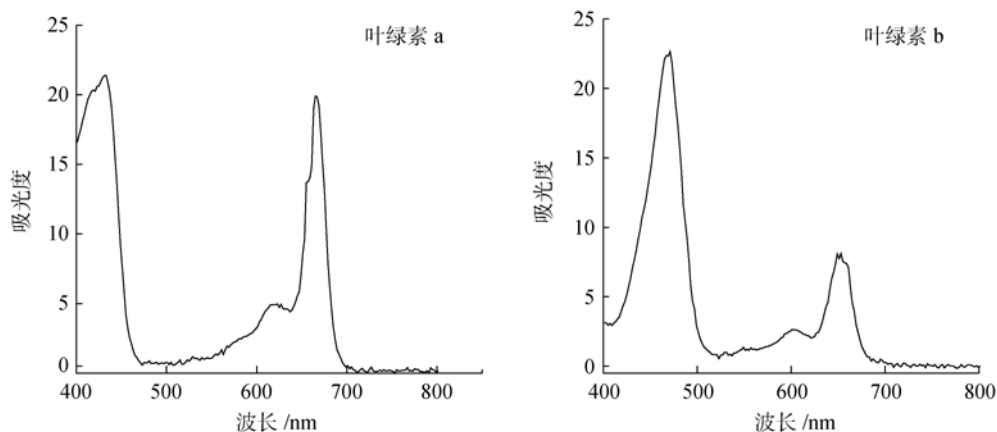


图1 叶绿素 a、b 的 DAD 扫描光谱图

Fig. 1 The DAD scan spectrums of chlorophyll a and chlorophyll b

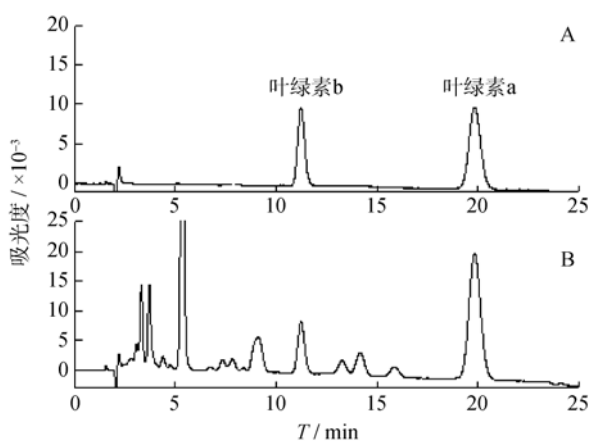


图2 叶绿素 a、b 混合标准品(A)及浒苔提取液(B)高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mix standards for chlorophyll a, b (A) and the extract of *Enteromorpha prolifera* (B)

振动、生长和崩溃的过程(即超声空化效应),从而产生局部的高温高压,增强物质在溶剂中的溶解能力。采用超声波辅助提取法提取叶绿素的研究已有报道^[10, 11],均获得了较为理想的提取效率,但未见用于浒苔叶绿素的提取。在本研究中选用丙酮为提取剂,将超声提取法与冷浸法、回流法、索氏提取法进行了比较,结果表明超声辅助提取法方便、快捷(处理一个样品仅需 5 min)、提取效率高、便于操作,是最佳提取方法。由于叶绿素不溶于水,易溶于醇、丙酮等有机溶剂,在本实验中应用超声提取法,比较了甲醇、乙醇、丙酮、乙醇-丙酮($v/v=50:50$)及甲醇-丙酮($v/v=50:50$)作为提取液的提取效果,结果表明,上述几种溶剂为提取溶剂时新鲜浒苔中的叶绿素 a、b 均能得到充分提取,由于采用甲醇做提取溶剂时利于后续色

谱分析,可以简化样品前处理过程,所以选择甲醇为提取溶剂。对提取溶剂用量、不同提取时间的提取效果进行了比较,结果表明,称取 0.1 g 鲜浒苔,以 5 mL 甲醇超声提取 5 min 为宜。超声提取过程中,温度发生一定波动,经考察对实验基本没有影响,故提取过程中无需严格控温。在以上最佳条件下,提取一次即可获得 99% 以上的目标化合物,故无需多次提取。

2.3 试验方法考察

2.3.1 标准曲线的绘制及检出限

本研究采用外标法对浒苔中叶绿素 a 和 b 进行定量,用峰面积对质量做工作曲线,由试样峰面积求出其实际含量。按 1.2 所述的色谱条件,取叶绿素 a 和 b 的混合标准液(质量浓度均为 50 mg/L)分别进样 0.1、0.2、0.4、1.0、4.0、10、40、100 μL ,以测定的峰面积为纵坐标,标准品的质量(μg)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程分别为:

叶绿素 a 的标准曲线方程为: $y=5\ 373.3x-21.775\ 1$, $R^2=0.999\ 9$

叶绿素 b 的标准曲线方程为: $y=4\ 903x-117.15$, $R^2=0.999\ 9$

说明本方法测定叶绿素 a 和 b 均在 0.50 ~500 mg/L 范围内线性关系良好。将标准溶液逐级稀释进样,测其峰高响应值及基线噪音强度,以 3 倍信噪比计算检出限。检测波长为 430 nm 时叶绿素 a 和 b 的检测限分别为 0.25 $\mu\text{g/L}$ 和 0.75 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 精密度

按 1.2 所述的色谱条件,取 1 份供试品溶液,重复测定 5 次(进样量为 10 μL),记录各次的峰面积和保留时间,叶绿素 a 和 b 峰面积的 RSD 值分别为

1.23%和 2.34%，保留时间的 RSD 值分别为 0.42%和 0.38%，这表明仪器的精密性良好。

2.3.3 重复性

精密称取同一样品 5 份，按 1.4 处理方法将其制成供试品溶液，按 1.2 液相色谱条件，分别进样测定，测得叶绿素 a 和 b 的峰面积和保留时间，计算其相对标准偏差，叶绿素 a 和 b 峰面积的 RSD 值分别为 5.02%和 5.46%，保留时间的 RSD 值分别为 0.49%和 0.41%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性

由于叶绿素稳定性较差，本研究对浒苔甲醇提取液中叶绿素 a、b 的稳定性进行了系统考察，按 1.4 处理方法制备供试品溶液，制备完成后立即按 1.2 液相色谱条件，分别在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、8、16、24 h 进样测定，结果显示浒苔甲醇提取液叶绿素

a、b 峰面积在 3 h 内均无明显变化，峰面积的减小率均小于 5.00%，但是 8 h 之后进行测定(样品瓶一直放在 HPLC 色谱仪上，室温)，叶绿素 a 和 b 的峰面积明显减小，而 24 h 之后的测定结果显示，叶绿素 b 几乎完全降解。以上结果表明，浒苔提取液中的叶绿素 a、b 在 3 h 内其化学性质稳定，为了获得准确的测定结果，样品制备完成后，尽量在 3 h 以内完成 HPLC 测定。

2.3.5 回收率

精密称取已知叶绿素 a、b 含量的同一浒苔样品 3 份，分别加入一定量的叶绿素 a 和 b 标准品溶液(放置 30 min)，然后按 1.4 供试品溶液的制备方法处理，用 1.2 所述色谱条件测定加样回收率，结果见表 2。由表 2 结果可以看出，该方法回收率较高，进一步说明本方法可用于浒苔样品中叶绿素 a、b 含量的测定。

表 2 浒苔叶绿素 a 和 b 加样回收率实验结果(n=3)

Tab. 2 Results for recovery of chlorophyll a and chlorophyll b(n=3)

	样品	初始量(mg)	加入量(mg)	检出量(mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
叶绿素 a	1	0.105 9	0.106 0	0.211 8	99.9	96.4	4.52
	2	0.114 0	0.106 0	0.217 6	97.7		
	3	0.110 1	0.106 0	0.207 1	91.5		
叶绿素 b	1	0.046 0	0.045 9	0.088 9	93.3	94.4	5.18
	2	0.049 6	0.045 9	0.091 0	90.2		
	3	0.047 9	0.045 9	0.093 7	99.8		

2.4 浒苔样品中叶绿素 a 和 b 的含量测定

取 5 个不同采集地点的浒苔样品，每个样品取质量相等的 6 份，按 1.4 所述处理方法将其中 3 份样品制备成供试品溶液，另外 3 份浒苔样品经干燥箱烘干，称质量，得出每份浒苔样品的干质量，用以计算浒苔中叶绿素 a 和 b 的实际含量。按 1.2 所述仪器条件测定供试品溶液，将测得的峰面积代入 2.3 所得出的回归方程，计算单位质量干浒苔中叶绿素 a 和 b 的含量，5 个不同采集地点浒苔样品中叶绿素 a 和 b 的测定结果见表 3。

由表 3 的数据结果可以看出，浒苔中叶绿素 a 和 b 的含量占浒苔干质量的 1%左右，而浒苔中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量比约为 3: 1，表明新鲜浒苔中的色素以叶绿素 a 为主；此外，由图 2B 可以看出，浒苔提取物中除了含有丰富的叶绿素 a、b 之外，还含有一系列叶绿素衍生物(与叶绿素 a 具有相似的可见光吸收图谱)，进一步表明浒苔中含有丰富的天然叶绿素，至于这一系列衍生物分别是什么化合物，有待采用液质联用技术进行分析鉴别。

表 3 浒苔样品中叶绿素 a 和 b 的含量(n=3)

Tab. 3 Contents of chlorophyll a and chlorophyll b in different *Enteromorpha prolifera*(n=3)

样品	采集地	叶绿素 a (mg/g)	RSD(%)	叶绿素 b(mg/g)	RSD(%)
1	栈桥	8.689 3	4.27	3.330 5	4.94
2	麦岛	7.710 3	4.63	2.840 9	5.01
3	中苑码头	6.653 2	3.89	2.450 7	4.32
4	石老人浴场	8.220 7	5.06	3.090 8	5.46
5	第一海水浴场	7.165 4	4.89	2.577 7	4.67

3 结论

本研究所发展的超声波辅助快速提取 RP-HPLC 测定浒苔中叶绿素 a 和 b 含量的方法, 样品前处理简便易操作、提取效率高; 在选定的色谱条件下, 叶绿素 a 和 b 分离度高, 方法重复性好、回收率高, 可作为浒苔中叶绿素 a 和 b 含量快速测定的有效方法。浒苔中含有丰富的天然叶绿素, 说明浒苔是天然叶绿素开发的良好原料, 为绿潮藻浒苔资源化利用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 蔡秋声. 叶绿素及其衍生物的特性和生理功能[J]. 粮食与油脂, 1997, 3: 38-40.
- [2] 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.
- [3] 丛海兵, 黄廷林, 周真明, 等. 藻类叶绿素测试新方法[J]. 给水排水, 2007, 33(6): 28-32.
- [4] Almela L, Fernandez-Lopez J A, Roca M J. High-performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 870: 483-489.
- [5] 吴振斌, 张兵之, 张丽萍, 等. 叶绿素-a、 β -胡萝卜素及脱镁叶绿素-a 的高效液相色谱检测[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1359-1364.
- [6] 戴荣继, 佟斌, 黄春, 等. HPLC 测定饮用水中藻类叶绿素含量[J]. 北京理工大学学报, 2006, 26(1): 87-89.
- [7] Huang S C, Hung C F, Wu W B, et al. Determination of chlorophylls and their derivatives in *Gynerostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48: 105-112.
- [8] Koca N, Karadeniz F, Burdurlu HS. Effect of pH on chlorophyll degradation and color loss in blanched green peas [J]. *Food Chemistry*, 2006, 100: 609-615.
- [9] 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): 37-40.
- [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] 郭艳华, 匡毅. 超声波法制取叶绿素铜钠盐的工艺研究[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2007, 35(4): 41-43.

Determination of chlorophyll a and chlorophyll b in *Enteromorpha prolifera* by ultrasound-assisted extraction with RP-HPLC

CHENG Hong-yan¹, CHEN Jun-hui¹, ZHANG Dao-lai¹, ZHAO Heng-qiang¹, ZHENG Li¹, ZANG Jia-ye¹, WANG Xiao-ru^{1,2}

(1. Research Center for Marine Ecology, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Mar. 12, 2009

Key words: *Enteromorpha prolifera*; Chlorophyll; HPLC

Abstract: A convenient and user-friendly reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis method was established for the determination of chlorophyll a and chlorophyll b in *Enteromorpha prolifera*. The following HPLC conditions are follows: Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm×150 mm) column is used; MeOH-0.2% acetic acid and acetone as the mobile phase with linear gradient elution are used; flow-rate is 0.8 mL/min, detection length of Vis is 430 nm; injection volume is 10 μ L. The results indicated that the developed method can be used for the determination of chlorophyll a and b in *E. prolifera* with a good resolution and linearity between 0.50 ~ 500 mg/L ($R^2=0.9999$). The method is specific, simple, fast, sensitive and feasible for the determination of chlorophyll a and chlorophyll b, which can eliminate the interference of chlorophyll derivatives in *E. prolifera*.

(本文编辑: 康亦兼)