

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240807003

# 高效液相色谱法测定食品中叶绿素 a 和 叶绿素 b 的含量

孔凡华, 赵 玥, 贾瑞勤, 姚雨杉, 杨彦荣, 白沙沙, 徐佳佳,  
刘梦兰, 李菁菁\*, 周琪乐\*

(北京市营养源研究所有限公司, 北京 100069)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法测定食品中叶绿素含量的方法。**方法** 以提取溶剂、提取方式、提取时间为考察因素, 设计正交试验, 对绿宝石甜瓜、黑米和菠菜中叶绿素的提取条件进行选择, 确定提取叶绿素最优条件为甲醇溶液超声提取 2 min。色谱条件为 C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 甲醇为流动相, 等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 叶绿素 a 吸收波长是 665 nm, 叶绿素 b 吸收波长是 468 nm。**结果** 叶绿素 a 和叶绿素 b 在 0.50~20.00 μg/mL 范围内与峰面积有良好的线性关系。绿宝石甜瓜、黑米、菠菜中叶绿素 a 和叶绿素 b 精密度的相对标准偏差均小于 10%, 加标回收率均在 90.0%~110.0%之间, 表明方法精密度高, 添加回收率高。**结论** 试验建立的方法重复性好、准确度高, 可以准确定量食品中叶绿素的含量。

**关键词:** 食品; 叶绿素 a; 叶绿素 b; 高效液相色谱法

## Determination of chlorophyll a and chlorophyll b content in food by high performance liquid chromatography

KONG Fan-Hua, ZHAO Yue, JIA Rui-Qin, YAO Yu-Shan, YANG Yang-Rong,  
BAI Sha-Sha, XU Jia-Jia, LIU Meng-Lan, LI Jing-Jing\*, ZHOU Qi-Le\*

(Beijing Institute of Nutritional Resources Co., Ltd., Beijing 100069, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination chlorophyll content in food by high performance liquid chromatography. **Methods** The extraction solvent, extraction method and extraction time were the investigation factors, an orthogonal experiment was designed to select the extraction conditions for chlorophyll in emerald melon, black rice, and spinach, and the optimal condition for chlorophyll extraction as methanol solution ultrasonic extraction for 2 minutes was determined. The chromatographic conditions were a C<sub>18</sub> column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), column temperature was 30 °C, mobile phase was methanol with isocratic elution, flow rate was 1.0 mL/min, absorption wavelength of chlorophyll a was 665 nm, and absorption wavelength of chlorophyll b was 468 nm. **Results** Chlorophyll a and chlorophyll b had a good linear relationship with peak area in the range of 0.50–20.00 μg/mL.

\*通信作者: 李菁菁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食物营养分析检测及应用研究。E-mail: lijingjing253@126.com

周琪乐, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品功能因子和中药药效物质研究。E-mail: zqllzmy@163.com

\*Corresponding author: LI Jing-Jing, Master, Associate Professor, Beijing Institute of Nutritional Resources Co., Ltd., No.4, Dongbinhe Road, Fengtai District, Beijing 100069, China. E-mail: lijingjing253@126.com

ZHOU Qi-Le, Ph.D, Associate Professor, Beijing Institute of Nutritional Resources Co., Ltd., No.4, Dongbinhe Road, Fengtai District, Beijing 100069, China. E-mail: zqllzmy@163.com

The relative standard deviations of chlorophyll a and chlorophyll b precision in emerald melon, black rice, and spinach were all less than 10%, and the recovery rates were between 90.0% and 110.0%, indicating good precision and high recovery rates of the method. **Conclusion** The method establishes in the experiment has good repeatability and high accuracy, and can accurately quantify the content of chlorophyll in food.

**KEY WORDS:** foods; chlorophyll a; chlorophyll b; high performance liquid chromatography

## 0 引言

高等植物体中叶绿素主要包括叶绿素 a 和叶绿素 b, 均是参与光合作用的重要色素, 其含量的多少是衡量植物光合作用强弱的重要指标<sup>[1-2]</sup>。叶绿素是绿色植物光合作用的基础物质, 可反映植物的生长发育状况、生理代谢变化以及营养状况<sup>[3-4]</sup>, 叶绿素含量常作为评定植物适应环境能力和生长发育的生理指标<sup>[5-6]</sup>。

早在 1940 年, GRUSKIN<sup>[7]</sup>研究发现叶绿素有治疗胃肠道疾病、癌症、贫血的作用。KIYOKA 等<sup>[8]</sup>发现绿茶中的叶绿素对肿瘤有抑制作用。施浩等<sup>[9]</sup>研究表明小鼠应用叶绿素衍生物(CHDM)后肿瘤体积相比减小。XIE 等<sup>[10]</sup>发现叶绿素可以促进小鼠肝脏和肾脏中铅的排泄, 减少铅的积累。郑国栋等<sup>[11]</sup>研究表明, 叶绿素铜钠在体内可明显减轻由硫代乙酰胺、醋酐酚引起的急性肝损伤。SUPARMI 等<sup>[12]</sup>发现给小鼠注射叶绿素可以提高血红蛋白和铁蛋白水平。迟翠翠等<sup>[13]</sup>研究表明, 叶绿素铁钠对贫血具有一定的治疗效果。FAEHRICH 等<sup>[14]</sup>发现叶绿素具有抗氧化的活性。KAMAT 等<sup>[15]</sup>研究表明, 叶绿素能有效抑制线粒体膜脂质的过氧化, 从而保护线粒体不被氧化损伤。吴小楠等<sup>[16]</sup>研究发现豌豆叶绿素能有效地抑制环磷酸胺诱导的小鼠睾丸染色体突变的发生。越来越多的研究表明, 叶绿素具有抗氧化、抗突变、抗癌、预防 DNA 的氧化损伤作用, 并通过螯合各种促氧化金属离子而抑制脂质氧化, 同时, 可以螯合多种金属离子, 作为重金属污染清除剂<sup>[17-19]</sup>。

叶绿素作为一种广泛存在于植物中的绿色色素, 具有很大的利用价值<sup>[20]</sup>。随着全球对绿色食品和环保理念的日益关注, 叶绿素作为植物营养素的重要组成部分, 不仅在食品、饲料、保健品、医药等领域具有显著应用价值, 还因其独特的健康益处而备受瞩目。在食品领域中, 叶绿素因其天然的色泽和丰富的营养价值, 被广泛应用于饮料、糖果、糕点等产品的着色和营养补充。叶绿素具有良好的抗氧化、抗炎等药理作用, 被广泛用于制造药品、保健品等。中国作为全球最大的食品生产和消费国, 叶绿素行业的市场规模和发展潜力巨大。根据市场调研在线发布的 2023—2029 年中国叶绿素行业市场调查研究及投资策略研究报告分析, 叶绿素市场规模从约 30 亿元人民币增长至近 60 亿元<sup>[21]</sup>。这种增长主要得益于国内食品安全意识

提升、生物技术的进步以及环保政策的推动, 特别是在植物蛋白替代品、绿色饲料添加剂等领域, 叶绿素的需求量持续攀升。不同食品中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量差异极其显著, 国内文献鲜少见报道食品中叶绿素 a 和叶绿素 b 的测定方法, 因此建立食品中叶绿素 a 和叶绿素 b 的测定方法对叶绿素产业的发展具有重要的促进作用。

国内外对叶绿素的测定开展了大量研究工作, 建立了 SPAD 叶绿素法<sup>[22-24]</sup>、分光光度法<sup>[25-26]</sup>、荧光光谱法<sup>[27]</sup>、原子吸收光谱法<sup>[5]</sup>、高效液相色谱质谱法<sup>[28]</sup>等多种叶绿素含量的测定方法。SPAD 叶绿素仪的特点是测量过程中不需试剂, 在保证植物与叶绿素仪接触的情况下可直接得出叶绿素的相对含量, 即 SPAD 值, 具有无损、实时检测等诸多优点, 弥补了传统实验室分析的不足, 但不同物种利用 SPAD 值预测叶绿素含量的模型准确度还存在一些差异<sup>[22]</sup>; 分光光度法前处理简便、经济实用, 但易受底物的干扰, 原子吸收光谱法通过间接测定叶绿素中镁元素的浓度进而测定叶绿素含量, 可以减少叶绿素的降解和损失, 分光光度法和原子吸收光谱法只能测定叶绿素的总量, 无法测出叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量<sup>[5]</sup>; 荧光光谱法和反射光谱法前处理比较复杂; 高效液相色谱-串联质谱法分析速度快、准确性和灵敏度高, 适合痕量物质的检测<sup>[29]</sup>, 但是溶剂难挥发、本底效应高, 叶绿素容易对仪器造成污染, 且仪器昂贵, 限制了仪器的推广使用。

高效液相色谱法具有快速、灵敏、准确度和精密度高等优点<sup>[30]</sup>, 建立食品中叶绿素测定的高效液相色谱法, 对于定量食品中叶绿素的含量具有重要意义。鉴于此, 本研究选择富含叶绿素 a 和叶绿素 b 的绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品作为代表性试材, 以提取溶剂、提取方式、提取时间为考察因素, 设计正交试验, 对叶绿素的提取条件进行选择, 建立高效液相色谱法测定食品中叶绿素的分析方法, 为食品中叶绿素含量测定标准方法的研制提供数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品, 市售。

叶绿素 a 标准品(纯度 $\geq 95.0\%$ )、叶绿素 b 标准品(纯度 $\geq 95.0\%$ )(美国 Sigma 公司); 甲醇、二氯甲烷(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水硫酸钠、2,6-二叔丁基对甲酚

(2,6-butylated hydroxytoluene, BHT)、乙醇、丙酮(分析纯, 北京化工厂)。

## 1.2 仪器与设备

BS224S 万分之一分析天平[德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; ZHWY-110X30 往复式恒温水浴摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司); EYELA N-1100 旋转蒸发器(东京理化株式会社); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 色谱条件的选择

选择 C<sub>18</sub> 色谱柱, 甲醇等度洗脱, 通过 3D 全波长扫描模式确定叶绿素 a 和叶绿素 b 的最佳吸收波长。确定最佳吸收波长后, 选择甲醇:水=20:80 (V:V)、甲醇:水=40:60 (V:V)、甲醇:水=60:40 (V:V)、甲醇:水=80:20 (V:V)和甲醇作为流动相, 以叶绿素 a 和叶绿素 b 的出峰时间和分离度作为评价指标, 筛选高效液相色谱洗脱条件。确定色谱条件为色谱柱: C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)或等效柱; 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 叶绿素 a 为 665 nm, 叶绿素 b 为 468 nm; 进样量: 10 μL。

### 1.3.2 试样前处理条件的选择

绿宝石甜瓜和菠菜样品, 取可食部分经匀浆机匀浆后, 储存于样品瓶中。黑米样品经高速粉碎机粉碎后, 储存于样品瓶中, 样品现用现制备。称取样品于 50 mL 离心管中, 液体试样加入无水硫酸钠 1 g, 固体试样不需要加无水硫酸钠, 然后加入 0.1% BHT 甲醇溶液 15 mL, 涡旋混匀, 超声提取 2 min, 8000 r/min 离心 5 min, 将上层溶液转移至 150 mL 旋转蒸发瓶内, 重复提取 3 次, 合并提取液于蒸发瓶内。将蒸发瓶接在旋转蒸发器上, 40 °C 水浴减压蒸馏, 待瓶中萃取液剩下约 2 mL 时, 取下蒸发瓶, 立即用氮气吹至近干。用 0.1% BHT 甲醇溶液洗出蒸馏瓶中的组分, 转移到 5 mL 容量瓶中, 用 0.1% BHT 甲醇溶液定容。溶液过 0.45 μm 有机系微孔滤膜后, 采用高效液相色谱仪测定。根据样品中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量进行稀释。

在参考国内外方法和文献研究的基础上, 以提取溶剂的类型(A)、提取方式(B)、提取时间(C)为考察因素, 叶绿素 a 和叶绿素 b 提取率的高低为评价指标, 采用 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交试验设计, 对绿宝石甜瓜、黑米和菠菜中叶绿素的提取方法进行优化。因素和水平见表 1。

## 1.4 结果计算

试样中叶绿素 a、叶绿素 b 的质量分数按式(1)计算。

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \times f \quad (1)$$

式中:  $\omega_i$  为试样中叶绿素 a 或叶绿素 b 质量分数的数

值, mg/kg;  $\rho_i$  为根据标准曲线计算得到的叶绿素 a 或叶绿素 b 质量浓度的数值, μg/mL;  $V$  为试样溶液定容体积的数值, mL;  $m$  为测试样品质量的数值, g;  $f$  为稀释倍数。

试样中总叶绿素的含量按式(2)计算。

$$\omega = \omega_a + \omega_b \quad (2)$$

式中:  $\omega$  为试样中总叶绿素含量的数值, mg/kg;  $\omega_a$  为试样中叶绿素 a 含量的数值, mg/kg;  $\omega_b$  为试样中叶绿素 b 含量的数值, mg/kg。

表 1 因素和水平  
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A: 提取溶剂的类型	B: 提取方式	C: 提取时间/min
1	无水乙醇	超声提取	2
2	甲醇	涡旋振荡提取	5
3	乙醇:丙酮=1:1, V:V	50 °C 水浴振荡提取	10
4	甲醇:二氯甲烷=3:1, V:V	75 °C 水浴振荡提取	15

## 1.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 进行数据分析, 采用正交设计助手进行正交试验设计和正交试验结果分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的选择

对叶绿素 a 和叶绿素 b 进行 3D 全波长扫描后确定叶绿素 a 最佳吸收波长是 665 nm, 叶绿素 b 最佳吸收波长是 468 nm。甲醇为流动相时, 叶绿素 a 和叶绿素 b 分离度大于 2, 峰形对称性良好, 叶绿素 a 出峰时间为 11.318 min, 叶绿素 b 出峰时间为 6.249 min。质量浓度均为 10 μg/mL 的叶绿素 a 和叶绿素 b 的混合标准工作溶液高效液相色谱图见图 1。

### 2.2 试样前处理条件的选择

绿宝石甜瓜正交试验结果分析如表 2 所示, 方差分析结果如表 3 所示。由表 2 可知, 各因素对叶绿素提取率影响程度的结果排序为 A>C>B, 即提取溶剂>提取时间>提取方式, 由表 3 方差分析结果可知, 提取溶剂对叶绿素提取率存在显著性影响(P<0.05), 最佳提取溶剂为甲醇。提取方式和提取时间对叶绿素提取率无显著性影响(P>0.05)。故选择操作简单, 方便快捷的提取方式和提取时间。最终确定最佳前处理条件为提取溶剂为甲醇, 提取方式为超声提取, 提取时间为 2 min。

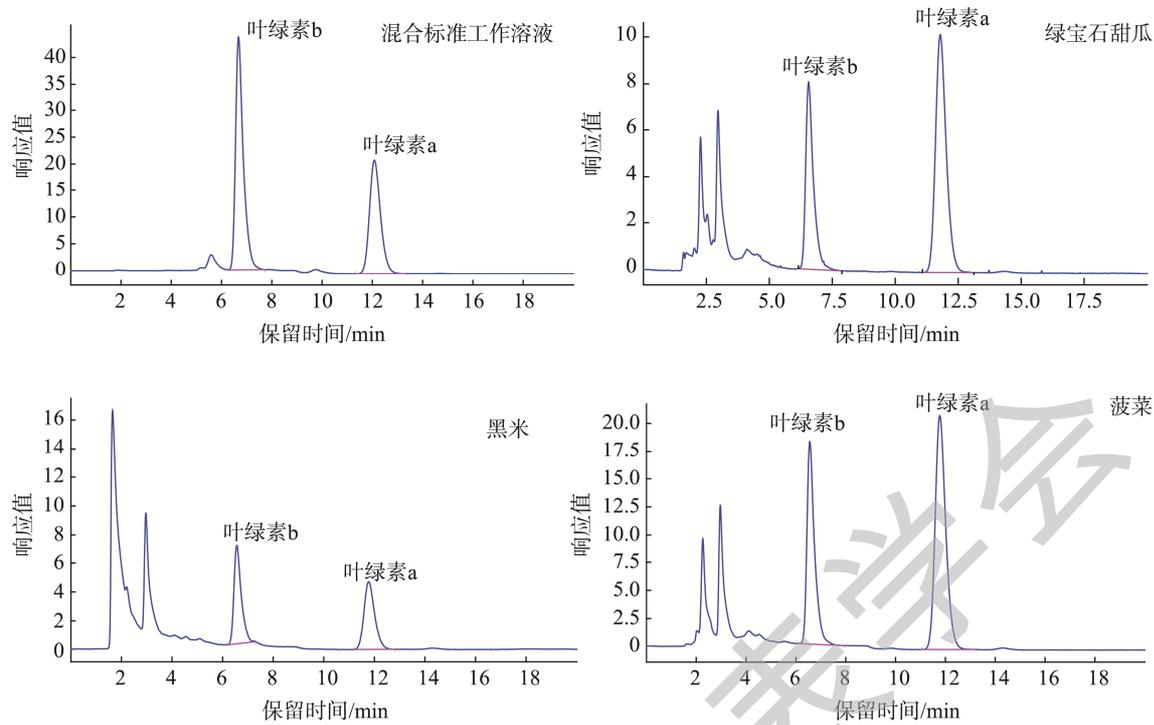


图1 叶绿素a和叶绿素b混合标准工作溶液和实际样品的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of chlorophyll a and chlorophyll b standard working solution and actual samples

表 2 绿宝石甜瓜正交试验设计与结果  
Table 2 Orthogonal experimental design and results of emerald melon

序号	因素			叶绿素含量/ (mg/kg)
	A	B	C	
1	1	1	1	17.20
2	1	2	2	27.96
3	1	3	3	20.60
4	1	4	4	23.90
5	2	1	2	32.32
6	2	2	1	33.26
7	2	3	4	29.64
8	2	4	3	31.58
9	3	1	3	28.16
10	3	2	4	20.97
11	3	3	1	28.38
12	3	4	2	26.65
13	4	1	4	29.28
14	4	2	3	32.85
15	4	3	2	30.19
16	4	4	1	32.35
$\bar{k}_1$	22.42	26.74	27.80	
$\bar{k}_2$	31.70	28.76	29.28	
$\bar{k}_3$	26.04	27.20	28.30	
$\bar{k}_4$	31.17	28.62	25.95	
R	8.73	2.02	3.33	

表 3 绿宝石甜瓜方差分析结果  
Table 3 Analysis of variance results of emerald melon

变异来源	平方和	自由度	均方	F 比	显著性
A	234.52	3	78.17	8.14	**
B	12.28	3	4.09		
C	23.46	3	7.82		
D(误差)	79.54	6	13.26		

注:  $F_{0.05(3,12)}=3.49$ ,  $F_{0.01(3,12)}=5.95$ 。 \*\*表示数据具有显著性差异,  $P<0.05$ , 表 5 同。

黑米正交试验结果分析如表 4 所示, 方差分析结果如表 5 所示。由表 4 可知, 各因素对叶绿素提取率影响程度的结果排序为  $A>B>C$ , 即提取溶剂>提取方式>提取时间, 由表 5 方差分析结果可知, 提取溶剂对叶绿素提取率存在显著性影响( $P<0.05$ ), 最佳提取溶剂为甲醇。提取方式和提取时间对叶绿素提取率无显著性影响( $P>0.05$ )。故选择操作简单, 方便快捷的提取方式和提取时间。最终确定最佳前处理条件为提取溶剂为甲醇, 提取方式为超声提取, 提取时间为 2 min。

菠菜正交试验结果分析如表 6 所示, 方差分析结果如表 7 所示。由表 6 可知, 各因素对叶绿素提取率影响程度的结果排序为  $B>A>C$ , 即提取方式>提取溶剂>提取时间, 由表 7 方差分析结果可知, 提取溶剂、提取方式和提取时间对叶绿素提取率无显著性影响( $P>0.05$ )。故选择操作简

单, 方便快捷的提取方式和提取时间。最终确定最佳前处理条件为提取溶剂为甲醇, 提取方式为超声提取, 提取时间为 2 min。

表 4 黑米正交试验设计与结果

Table 4 Orthogonal experimental design and results of black rice

序号	因素			叶绿素含量/(mg/kg)
	A	B	C	
1	1	1	1	10.77
2	1	2	2	8.80
3	1	3	3	15.96
4	1	4	4	10.38
5	2	1	2	20.29
6	2	2	1	17.87
7	2	3	4	20.33
8	2	4	3	20.76
9	3	1	3	16.57
10	3	2	4	14.92
11	3	3	1	16.81
12	3	4	2	19.91
13	4	1	4	18.57
14	4	2	3	19.45
15	4	3	2	18.76
16	4	4	1	16.97
$\bar{k}_1$	11.48	16.55	15.60	
$\bar{k}_2$	19.81	15.26	16.94	
$\bar{k}_3$	17.05	17.96	18.19	
$\bar{k}_4$	18.44	17.00	16.05	
R	8.33	2.70	2.58	

表 5 黑米方差分析结果

Table 5 Analysis of variance results of black rice

变异来源	平方和	自由度	均方	F 比	显著性
A	160.45	3	53.482	12.73	**
B	15.12	3	5.042		
C	15.53	3	5.177		
D(误差)	19.77	6	3.29		

## 2.3 方法学验证

### 2.3.1 方法的线性范围

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中, 测定相应的峰面积, 以标准工作液的质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 8, 可见, 叶绿素 a 和叶绿素 b 在 0.50~20.00  $\mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积线性关系良好, 可以满足检测需求。

表 6 菠菜正交试验设计与结果

Table 6 Orthogonal experimental design and results of spinach

序号	因素			叶绿素含量/(mg/kg)
	A	B	C	
1	1	1	1	1280.58
2	1	2	2	1022.22
3	1	3	3	1076.73
4	1	4	4	1117.10
5	2	1	2	1120.19
6	2	2	1	1120.12
7	2	3	4	1170.65
8	2	4	3	1086.99
9	3	1	3	1176.56
10	3	2	4	1211.01
11	3	3	1	1066.96
12	3	4	2	1088.51
13	4	1	4	1108.86
14	4	2	3	1125.86
15	4	3	2	1081.65
16	4	4	1	857.72
$\bar{k}_1$	1124.16	1171.55	1081.34	
$\bar{k}_2$	1124.49	1119.80	1078.15	
$\bar{k}_3$	1135.76	1099.00	1116.54	
$\bar{k}_4$	1043.52	1037.58	1151.90	
R	92.24	133.97	73.76	

表 7 菠菜方差分析结果

Table 7 Analysis of variance results of spinach

变异来源	平方和	自由度	均方	F 比	显著性
A	21827.03	3	7275.68		
B	36852.59	3	12284.20	1.69	
C	14392.75	3	4797.58		
D(误差)	50803.60	6	8467.27		

表 8 叶绿素 a 和叶绿素 b 标准曲线方程和浓度范围

Table 8 Standard curve equations and concentration ranges of chlorophyll a and chlorophyll b

组分	回归方程	相关系数	质量浓度范围/ $(\mu\text{g/mL})$
叶绿素 a	$Y=35.622X$	0.9998	0.50~20.00
叶绿素 b	$Y=55.253X$	0.9991	0.50~20.00

### 2.3.2 方法的检出限和定量限

取样品按照试验建立方法处理, 上机测定观察信噪比, 适当进行稀释, 检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别以 3 和 10 倍的信噪比计算。当样品

取样量为 10.0 g, 定容体积为 5 mL 时, 叶绿素 a 的检出限为 0.06 mg/kg, 叶绿素 b 的检出限为 0.03 mg/kg。叶绿素 a 的定量限为 0.2 mg/kg, 叶绿素 b 的定量限为 0.1 mg/kg。

### 2.3.3 方法的精密度

以绿宝石甜瓜、黑米、菠菜为研究对象, 重复性测定 6 次, 考察方法的精密度。根据 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》重复性精密度要求, 目标分析物质量分数在 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~10 g/kg 之间, 重复性相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。由表 9 可知, 样品中叶绿素 a 和叶绿素 b 重复性测定 6 次的相对标准偏差均小于 5%, 表明该方法的精密度良好, 适合定量分析。

表 9 精密度试验结果( $n=6$ )  
Table 9 Results of precision experiment ( $n=6$ )

样品名称	组分	平均值 (mg/kg)	相对标准偏差 /%
绿宝石甜瓜	叶绿素 a	20.95	3.75
	叶绿素 b	7.46	3.94
黑米	叶绿素 a	10.55	3.96
	叶绿素 b	7.47	2.82
菠菜	叶绿素 a	822.55	3.09
	叶绿素 b	335.35	3.97

### 2.3.4 方法的回收率与相对标准偏差

分别准确称取绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品, 向样品本底添加低、中、高 3 个浓度水平的标准溶液, 进行三水平六平行加标回收试验, 计算叶绿素 a 和叶绿素 b 的回收率和相对标准偏差。根据 GB 5009.295—2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》要求, 目标分析物质量分数在 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1000 mg/kg 之间, 相对标准偏差为 10%~20%, 回收率为 80%~110%。由表 10 知, 绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品中叶绿素 a 和叶绿素 b 的平均加标回收率分别在 92.21%~101.35%、93.58%~103.58%之间, 加标回收率的相对标准偏差均小于 10%, 各组分回收率结果满足 GB 5009.295—2023 的要求, 表明方法回收率高, 适合食品中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的测定。

### 2.3.5 方法的特异性

选取绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品, 按照试验建立的方法进行前处理和测定, 以验证方法的特异性, 高效液相色谱图见图 1。结果表明绿宝石甜瓜中叶绿素 a 和叶绿素 b 的保留时间分别为 11.787 min 和 6.559 min; 黑米中叶绿素 a 和叶绿素 b 的保留时间分别为 11.785 min 和 6.564 min; 菠菜中叶绿素 a 和叶绿素 b 的保留时间分别为 11.782 min 和 6.560 min, 表明本方法不受样品基质效应的影响, 特异性良好。

表 10 回收率验证结果( $n=6$ )  
Table 10 Results of recovery verification ( $n=6$ )

样品名称	组分	本底值 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	平均加标 回收率/%	相对标准 偏差/%
绿宝石甜瓜	叶绿素 a		9.52	95.03	2.28
		20.27	19.04	95.33	1.92
	叶绿素 b		28.56	96.83	2.21
		7.27	7.74	97.81	1.93
	叶绿素 a		11.61	97.04	0.83
		10.55	9.92	96.46	1.90
叶绿素 b		4.96	93.81	2.08	
	14.88	101.35	1.47		
黑米	叶绿素 a	3.89	97.34	2.00	
	叶绿素 b	7.47	7.78	98.60	2.67
菠菜	叶绿素 a		11.67	103.38	2.67
		833.52	794.44	95.33	3.92
	叶绿素 b		397.22	92.21	2.85
		338.58	387.60	94.14	2.42
		581.40	93.58	2.41	

## 3 结论

试验选择绿宝石甜瓜、黑米、菠菜样品作为代表性试材, 以提取溶剂、提取方式、提取时间为考察因素, 设计正交试验, 对叶绿素的提取条件进行选择, 确定叶绿素最佳提取条件是用甲醇溶液超声提取 2 min。以绿宝石甜瓜、黑米、菠菜为代表性样品, 对食品中叶绿素含量的高效液相色谱测定方法的线性范围、检出限和定量限、精密度、准确度、特异性等指标进行考察, 结果表明, 该方法操作简单、快速, 准确度高, 重现性好, 特异性强, 适用于食品中叶绿素含量的测定。

## 参考文献

- 王修顺, 李杰, 邱念伟. 叶绿素家族概述[J]. 生物学教学, 2017, 42(9): 70-72.  
WANG XS, LI J, QIU NW. Overview of chlorophyll family [J]. Biol Teach, 2017, 42(9): 70-72.
- 吴志强, 周韦. 叶绿素的类别概述[J]. 生物学通报, 2014, 49(9): 12-14.  
WU ZQ, ZHOU W. Overview of chlorophyll categories [J]. Bull Biol, 2014, 49(9): 12-14.

- [3] 再吐娜·买买提, 许建, 姚军, 等. 甜瓜果实发育过程中叶绿素和类胡萝卜素含量的变化[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(8): 44-48.  
ZAITUNA·MMT, XU J, YAO J, *et al.* Changes of chlorophyll and carotenoid content in melon during fruit development[J]. China Cucurb Veg, 2021, 34(8): 44-48.
- [4] KAPOTIS G, ZERVOUDAKIS G, VELTSISTAS T, *et al.* Comparison of chlorophyll meter readings with leaf chlorophyll concentration in *Amaranthus vlitus*: correlation with physiological processes [J]. Russian J Plant Physiol, 2003, 5(3): 395-397.
- [5] 艾佳音, 何明莉, 才丰, 等. 温室甜樱桃不同叶龄叶片光合能力比较研究[J]. 中国果树, 2023(11): 96-98, 107.  
AI JY, HE ML, CAI F, *et al.* Comparative study on photosynthetic ability of sweet cherry at different leaf ages in greenhouses [J]. China Fruits, 2023(11): 96-98, 107.
- [6] 闫震, 聂继云, 程杨, 等. 水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定[J]. 中国果树, 2018(2): 59-62, 72.  
YAN Z, NIE JY, CHENG Y, *et al.* Determination of chlorophyll content in fruits, vegetables and their products [J]. China Fruits, 2018(2): 59-62, 72.
- [7] GRUSKIN B. Chlorophyll-Its therapeutic place in acute and suppurative disease: Preliminary report of clinical use and rationale [J]. Am J Surg, 1940, 49(1): 49-55.
- [8] KIYOKA HO, OKAI Y. Potent suppressive activity of chlorophyll a and b from green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin [J]. J Uoen, 1998, 20(3): 181-188.
- [9] 施浩, 张莉君, 张春业, 等. 一种叶绿素衍生物的光动力抗肿瘤活性研究[J]. 生物技术世界, 2014(12): 152-153.  
SHI H, ZHAGN LJ, ZHANG CY, *et al.* Study on the photodynamic antitumor activity of a chlorophyll derivative [J]. Biotech World, 2014(12): 152-153.
- [10] XIE Y, ZHOU G. Effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, potassium iodide and chlorophyll on lead accumulation in male mice [J]. Inter J Occupat Med Environ Health, 2017, 30(1): 87-93.
- [11] 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(2): 146-148.  
ZHENG GD, OUYANG W, YAN M, *et al.* Progress in pharmacological research of chlorophyll and its derivatives [J]. Central South Pharm, 2006(2): 146-148.
- [12] SUPARMI S, SAMPURNA S, ANNA N, *et al.* Antianemia effect of chlorophyll from katuk (*Sauropus androgynus*) leaves on female mice induced sodium nitrite [J]. Pharma J, 2016, 8(4): 375-379.
- [13] 迟翠翠, 翟二林, 李春燕, 等. 芹菜叶绿素铁钠与其他补血药物功效的比较研究[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 289-292.  
CHI CC, QU ERL, LI CY, *et al.* Comparative study of hematinic function of celery sodium iron chlorophyllin and other blood tonic drugs [J]. Food Sci, 2013, 34(7): 289-292.
- [14] FAEHRNICH B, LUKAS B, HUMER E, *et al.* Phytogetic pigments in animal nutrition: Potentials and risks [J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(5): 1420-1430.
- [15] KAMAT JP, BOLOOR KK, DEVASAGAYAM TPA. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1487(2-3): 113-127.
- [16] 吴小楠, 汪家梨. 豌豆叶绿素抗突变作用的试验研究[J]. 食品科学, 1997(12): 43-44.  
WU XN, WANG JL. Experimental study on the anti mutagenic effect of pea chlorophyll [J]. Food Sci, 1997(12): 43-44.
- [17] HUWS SA, KIM EJ, KINGSTON-SMITH AH, *et al.* Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts [J]. Fems Microbiol Ecol, 2009, 69(3): 461-471.
- [18] LEIBER F, KREUZER M, NIGG D, *et al.* A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin [J]. Lipids, 2005, 40(2): 191-202.
- [19] 葛俊珂, 孙丽娜, 赵涵, 等. 叶绿素的提取方法及药理作用进展[J]. 科技创新与应用, 2016(24): 14.  
GE JH, SUN LN, ZHAO H, *et al.* Progress in extraction methods and pharmacological effects of chlorophyll [J]. Technol Innov Appl, 2016(24): 14.
- [20] 王贺泽, 丁宏标, 李习龙, 等. 叶绿素及其在动物生产中的应用[J]. 饲料工业, 2020, 41(6): 7-10.  
WANG HZ, DING HB, LI XL, *et al.* Chlorophyll and its application in animal production [J]. Feed Ind, 2020, 41(6): 7-10.
- [21] 中国叶绿素行业市场占有与竞争格局深度剖析[EB/OL]. [2024-08-02]. [https://www.sohu.com/a/797955224\\_121875101](https://www.sohu.com/a/797955224_121875101)  
In depth analysis of market share and competitive landscape in China's chlorophyll industry [EB/OL]. [2024-08-02]. [https://www.sohu.com/a/797955224\\_121875101](https://www.sohu.com/a/797955224_121875101)
- [22] 赵京东, 宋彦涛, 何畅, 等. 不同叶绿素测定方法的比较研究[J]. 大连民族大学学报, 2020, 22(5): 405-410.  
ZHAO JD, SONG YT, HE C, *et al.* Comparative study on different methods of chlorophyll determination [J]. J Dalian Minzu Univ, 2020, 22(5): 405-410.
- [23] 安荣, 杨飞, 刘鑫, 等. 设施栽培下不同枣树品种叶绿素含量分析[J]. 花卉, 2020(6): 26-27.  
AN R, YANG F, LIU X, *et al.* Analysis of chlorophyll content in different jujube tree varieties under facility cultivation [J]. Flowers, 2020(6): 26-27.
- [24] 张体德, 武轲, 杜振伟, 等. 芝麻开花期光合特性及叶绿素含量的研究[J]. 种子, 2019, 38(9): 7-10, 17.  
ZHANG TD, WU K, DU ZW, *et al.* Studies on photosynthetic characteristics and chlorophyll content of sesame seeds during flowering period [J]. Seed, 2019, 38(9): 7-10, 17.
- [25] 孟祥武, 韩忠才, 张胜利, 等. 马铃薯叶片叶绿素动态变化及其与产量的相关性[J]. 东北农业科学, 2021, 46(3): 79-81, 89.  
MENG XW, HAN ZC, ZHANG SL, *et al.* Dynamic changes of chlorophyll in potato leaves and their correlation with yield [J]. J Northeast Agric Sci, 2021, 46(3): 79-81, 89.
- [26] 孔凡亭, 王坤, 赵芳辉. 分光光度法测定地表水叶绿素 a 的测量不确定度分析[J]. 绿色科技, 2019(10): 79-82.

- KONG FT, WANG S, ZHAO FH. Measurement uncertainty analysis of chlorophyll-a in surface water by spectrophotometry [J]. *J Green Sci Technol*, 2019(10): 79–82.
- [27] 徐法君. 荧光光谱法间接测定叶绿素的含量[J]. *分析实验室*, 2005(9): 47–49.
- XU FJ. Indirect determination of chlorophyll content with spectrofluorimetry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2005(9): 47–49.
- [28] LOH CH, INBARAJ BS, LIU MH, *et al.* Determination of chlorophylls in *Taraxacum formosanum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and preparation by column chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(24): 6108–6115.
- [29] 王佳琪, 李剑军, 李超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测畜产品中 67 种兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(14): 93–104.
- WANG JQ, LI JJ, LI C, *et al.* Simultaneous determination of 67 kinds of veterinary drug residues in livestock products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(14): 93–104.
- [30] 许星鸿, 丁子媛, 王迅, 等. 高效液相色谱法检测水产品中双酚 A 及其蓄积特征研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(20): 6482–6487.
- XU XH, DING ZY, WANG X, *et al.* Determination of bisphenol A content in aquatic products by high performance liquid chromatography and its

accumulation characteristics [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(20): 6482–6487.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

### 作者简介



孔凡华, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食物营养分析检测及应用研究。  
E-mail: 605085941@qq.com



李菁菁, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食物营养分析检测及应用研究。  
E-mail: lijingjing253@126.com



周琪乐, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品功能因子和中药药效物质研究。  
E-mail: zqlllzmy@163.com

中国仪器仪表行业协会