

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241016002

引用格式: 陈山乔, 卢超艳, 尚海涛, 等. 合相色谱法定量检测蔬菜中的叶绿素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 290-297.

CHEN SQ, LU CY, SHANG HT, *et al.* Quantitative determination of chlorophyll content in vegetables by convergence chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 290-297. (in Chinese with English abstract).

## 合相色谱法定量检测蔬菜中的叶绿素含量

陈山乔<sup>1,2</sup>, 卢超艳<sup>3</sup>, 尚海涛<sup>1</sup>, 章豪<sup>1,2</sup>, 吴银良<sup>1,2</sup>, 范春波<sup>3</sup>, 孙志栋<sup>1\*</sup>

(1. 宁波市农业科学研究院, 宁波 315040; 2. 宁波市特色农产品质量安全检测与控制重点实验室, 宁波 315040; 3. 宁波新紫云堂水产食品有限公司, 宁波 315040)

**摘要: 目的** 建立合相色谱法(convergence chromatography, CC)测定蔬菜中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量。

**方法** 采用索氏抽提法对蔬菜及其制品中的叶绿素进行高效提取, 并使用超高效合相色谱仪结合紫外-可见检测器进行分离与检测。**结果** 通过对不同溶剂稳定性的对比, 选择了石油醚作为提取溶剂, 并优化了提取条件。经验证, 检出限为 0.02 mg/kg, 定量限为 0.06 mg/kg, 线性范围为 0.06~800.00 mg/kg, 加标回收率为 99%~102%, 真实样品相对标准偏差 2.2%~14.0%。通过对真实样品, 包括羽衣甘蓝、鲜芥菜、雪菜、梅干菜、蒸煮梅干菜、水煮梅干菜的检测精密度考察并与现行标准方法的交叉验证, 证明了该方法的可靠性和准确性。

**结论** 本研究建立了一种基于 CC 的检测蔬菜中叶绿素 a 和叶绿素 b 的方法, 具有较高的灵敏度、较宽的线性范围和良好的特异性和精密度。该方法不仅适用于实验室研究, 也具备实际应用潜力。

**关键词:** 合相色谱法; 叶绿素; 羽衣甘蓝; 芥菜; 雪菜; 梅干菜

## Quantitative determination of chlorophyll content in vegetables by convergence chromatography

CHEN Shan-Qiao<sup>1,2</sup>, LU Chao-Yan<sup>3</sup>, SHANG Hai-Tao<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1,2</sup>,  
WU Yin-Liang<sup>1,2</sup>, FAN Chun-Bo<sup>3</sup>, SUN Zhi-Dong<sup>1\*</sup>

(1. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China;  
2. Ningbo Key Laboratory of Testing and Control for Characteristic Agro-product Quality and Safety, Ningbo 315040, China; 3. Ningbo New Ziyuntang Aquatic Products Co., Ltd., Ningbo 315040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of chlorophyll a and chlorophyll b content in vegetables by convergence chromatography (CC). **Methods** The Soxhlet extraction method was used for efficient extraction of chlorophyll from vegetables and their products, followed by separation and detection using an ultra-performance convergence chromatography system coupled with a ultraviolet-visible detector. **Results** Through comparison of the stability of different solvents, petroleum ether was selected as the extraction solvent, and the extraction

收稿日期: 2024-10-16

基金项目: 宁波市公益类项目(2022S140); 绿色食品(绿色优质农产品)高质量创新发展技术研究项目(GFJY20240010); “科创甬江 2035”关键技术突破计划项目(20241ZDYF020210); 宁波市食品安全与营养健康重大专项(2022Z176)

第一作者: 陈山乔(1987—), 男, 工程师, 主要研究方向为食品科学与工程。E-mail: csq1306@gmail.com

\*通信作者: 孙志栋(1963—), 男, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: zdsun.cn@163.com

conditions were optimized. The method was validated with a limit of detection of 0.02 mg/kg, a limit of quantification of 0.06 mg/kg, a linear range of 0.06–800.00 mg/kg, a spike recovery rate of 99%–102%, and a relative standard deviation of 2.2%–14.0% for real samples. The reliability and accuracy of the method were confirmed through precision testing of real samples, including kale, fresh mustard greens, pickled mustard greens, dried pickled mustard greens, steamed dried pickled mustard greens, and boiled dried pickled mustard greens, as well as cross-validation with existing standard methods. **Conclusion** This study establishes a CC-based method for detecting chlorophyll a and chlorophyll b in vegetables, demonstrating high sensitivity, a wide linear range, good specificity, and precision. The method is not only suitable for laboratory research but also has practical application potential.

**KEY WORDS:** convergence chromatography; chlorophyll; kale; fresh mustard greens; pickled mustard; preserved pickled mustard

## 0 引言

叶绿素是自然界中最常见的色素之一,它吸收光线中的蓝光和红光,通过光合作用维持植物的生长<sup>[1]</sup>。此外叶绿素还广泛存在于加工食品中<sup>[2]</sup>,尤其是腌渍蔬菜<sup>[3]</sup>和果蔬汁<sup>[4]</sup>等。叶绿素作为功能性成分,具有抗氧化<sup>[5]</sup>、抗炎<sup>[6]</sup>和降低糖尿病风险<sup>[7]</sup>等潜力。而且叶绿素的含量,往往和食品的新鲜度存在相关性<sup>[8]</sup>。因为无论对于农业还是食品领域的研究,叶绿素的高效、准确测定都有着巨大的需求。然而,由于叶绿素在光和氧的存在下容易降解<sup>[9]</sup>,这种不稳定性会影响测定结果的准确性;叶绿素测定常依赖有机溶剂提取,其效率受提取时间、溶剂种类和样品状态的影响<sup>[10]</sup>,如果提取不充分,测定结果会受到影响;此外,植物组织中除了叶绿素,还有类胡萝卜素、酚类化合物等,可能与叶绿素的吸收峰重叠或在测定过程中相互干扰<sup>[11]</sup>。因此叶绿素的测定方法开发,一直是此领域中的难点。

当前已经有不同原理的检测方法被应用于叶绿素的分析,其中主要包括分光光度法<sup>[12]</sup>、荧光光度法<sup>[13]</sup>、色谱法<sup>[14]</sup>、原位快速测定法<sup>[15]</sup>等。然而,不同溶剂及其配比对叶绿素的光谱特性影响很大,因此先前摸索出的计算公式对提取不同的提取溶剂并不适用<sup>[16]</sup>,甚至溶剂配制时的配比波动也会影响检测结果。除了前述的其他色素外,脱镁叶绿素等叶绿素降解产物由于存在相似化学结构,会干扰基于荧光光谱的叶绿素检测<sup>[17]</sup>。使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术对化合物进行预分离,是解决其他化合物干扰的可行方法,其中又以反相 HPLC 为最常见的固定相类型,例如利用 C<sub>18</sub> 填料的 HPLC 分析橄榄油中的水溶性叶绿素铜着色剂过程中,分离到了叶绿素 a 和叶绿素 b<sup>[18]</sup>;对胡萝卜、番茄、菠菜中不同色素抗氧化能力的研究中,使用了 C<sub>30</sub> 填料的 HPLC 分析了叶绿素 a 和叶绿素 b<sup>[19]</sup>。然而叶绿素分子具有强疏水性<sup>[20]</sup>,这使其在传统反向相色谱柱上的分离效果不佳,容易导致拖尾和峰形不理想,影响检测灵敏度<sup>[21]</sup>,且依然

容易受到其他脂溶性色素的干扰。为了解决这一问题,通常 HPLC 会与质谱检测器联用,通过对特征性离子的二次分离来提高定性和定量精度。例如大气压化学电离源的三重四极杆质谱法被用于检测茶叶中的叶绿素 a 和叶绿素 b<sup>[22]</sup>;电喷雾离子源结合离子阱质谱法被用以分析叶绿素及其降解产物<sup>[23]</sup>。然而质谱检测器会带来高硬件成本和更高的运行维护成本,使得分析方法欠缺经济性。并且叶绿素在质谱的离子源内会发生复杂的结构转变<sup>[24]</sup>,也会对定量带来影响。

合相色谱(convergence chromatography, CC)技术是一种结合了超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC)和 HPLC 优势的色谱技术。CC 的关键是使用超临界 CO<sub>2</sub> 与有机溶剂组成流动相。这种技术的核心特征是 CO<sub>2</sub> 在超临界状态时具有较低的黏度和较高的扩散系数,因此能够实现更高的分离效率和更快的分离速度<sup>[25]</sup>。合相色谱相比传统的反向 HPLC,由于 CO<sub>2</sub> 的低黏度和高扩散性,CC 通常比传统液相色谱在更短时间内提供更好的分离效率和分辨率,以及更广泛的化合物极性适用性。

本研究拟利用索氏抽提法对蔬菜及其制品中的叶绿素进行高效率提取,采用超高效 CC 仪结合紫外-可见检测器,进行分离与检测,并对方法进行了优化和验证。为叶绿素的精确定量提出了一种有潜力的分析方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

2 种羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* var. *sabellica*)来自浙江湖州,人工光照栽培;鲜芥菜(*Brassica juncea* var. *crispifolia*)采收自浙江宁波,品种为雨雪 5 号;雪菜由前述同品种芥菜腌制,15%盐料比腌制时间 6 个月;梅干菜由前述雪菜晒干制得,水分含量 34.7%;豆芽为实验室在严格避光环境下利用自动豆芽机萌发本地市场购得绿豆(*Vigna radiata*)而成<sup>[26]</sup>,萌发 5 d。

乙醇、石油醚(沸程 30–60 °C)、无水硫酸钠、丙酮(分

析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Supelco Analytical Products 公司); CO<sub>2</sub> (4N 级, 宁波市方辛气体有限公司); 叶绿素 a 对照品、叶绿素 b 对照品(纯度 90%, 上海源叶生物科技有限公司); 所用水均为实验室自制去离子水。

## 1.2 仪器与设备

Soxtec2500 自动索氏抽提仪(丹麦 FOSS 公司), 配备有 NDC 型循环水冷却器(浙江优纳特科学仪器有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); ACQUITY UPC<sup>2</sup> PDACC 系统、Torus DEA 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); BlueStar B 型紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司); KS4000ic 型控温摇床(德国 IKA 公司); R-210 型旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); N-EVAP 112 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); Quintix124 电子天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 试样制备

植物样品取叶片由高速粉碎机匀浆后, 进行后续测试, 现用现制备。豆芽收获后切取根部, 匀浆并检测确认无叶绿素后, 作为植物基质空白, -80 °C 下储存待用。

### 1.3.2 基于分光光度计的叶绿素测定

基于分光光度计的叶绿素含量依照 NY/T 3082—2017《水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定 分光光度法》进行测定。

### 1.3.3 标准溶液和加标样品的配制

分别准确称取适量的叶绿素 a 和叶绿素 b 固体对照品分别用乙醇溶解, 配制成 1 mg/mL 的单标和 1 mg/mL 的混标储备液, 在 -20 °C 下避光暂存, 配制后当日用。后续的标准曲线由甲醇逐级稀释为 40.0、20.0、10.0、5.0、2.0、1.0、0.5 μg/mL。提取溶剂优化实验中直接精确吸取储备液加入。植物基质加标样品由称取解冻后的空白基质, 精确吸取并添加计算后目标量的储备液后 0~2 °C 下搅拌 15 min 制成。标准曲线样品和加标样品现用现配。

### 1.3.4 色谱分析条件

Torus DEA 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相: A 为 CO<sub>2</sub>, B 为甲醇, 体积比为 A:B=92:8, 等度洗脱; 流速: 1.5 mL/min; 背压: 1800 psi; 柱温: 40 °C; 样品室温度: 4 °C; 进样量: 1 μL; 分析时间 5 min。

### 1.3.5 样品提取

样品提取以索氏抽提法进行。在烧杯中精确称取 5~10 g 样品匀浆, 并加入大致等量的无水硫酸钠, 使用玻璃棒充分搅拌均匀后, 放入索氏抽提仪滤纸杯中, 并用 10 mL 提取溶剂将烧杯和玻璃棒中的样品洗入滤纸杯(使用萃取铝杯接收滴出的溶剂)。将滤纸杯和萃取杯加载入抽提仪后, 加入 70 mL 萃取溶剂, 开始萃取。抽提完成后不进行溶剂回收, 不进行溶剂回收和干燥, 冷却至室温, 将抽提液旋转

蒸发浓缩, 并转移至氮吹仪吹干, 最终以甲醇复溶并定溶至约 1 mL, 若浓度过大可适当稀释, 过 0.45 μm 滤膜后上机待测。结果由标准曲线外标法定量。

### 1.3.6 提取条件优化

提取溶剂的选择, 通过考察将 1.3.3 种所描述的加标提取溶剂种叶绿素的稳定性进行, 具体为甲醇、乙醇、石油醚各 80 mL 分别加入萃取铝杯中, 不加载样品在索氏抽提仪中进行回流, 调整加热板温度至回流液体速率约为 2 滴/s, 到达回流时间后冷却至室温, 直接吸取铝杯中的溶剂上机检测。

### 1.3.7 检出限和定量限的确定

参考国家认证认可监督管理委员会颁布的《食品化妆品专业化学分析方法验证程序》, 根据预实验中了解到的方法的初步灵敏度情况, 以该浓度水平作为参考检出限(limit of detection, LOD)独立检测 6 个标准添加样品, 统计检测结果, 计算出标准偏差(standard deviation, SD)。以 LOD-3SD、LOD、LOD+3SD 3 个浓度水平分别检测 20 个标准添加样品, 有 19 个样品能被有效检出的浓度即为方法的检出限。定量限(limit of quantitation, LOQ)则定为 3 倍 LOD, 待后续方法学验证。

## 1.4 数据处理

实验中相对偏差、相对标准偏差等计算和数据处理使用 R-Studio (Version 1.3.1093)<sup>[27]</sup>软件, 基于 R (version 3.6.1)<sup>[28]</sup>进行。制表、绘图基于 ggplot2 软件包(version 3.3.3)<sup>[29]</sup>。除 LOD 设定实验重复次数为 20 外, 其他实验重复次数为 6。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件选择

叶绿素 a 和叶绿素 b 在全波长扫描下其在流动相溶剂中的紫外-可见光谱如图 1 所示。如图 1 所示, 叶绿素 a 和叶绿素 b 分别在 665.5 nm 和 655.6 nm 处有特征性的吸收, 且两者的特征吸收波长差异仅为 9.9 nm, 为了使检测方法能够适配仅配备单波长紫外-可见检测器的色谱仪, 故将检测波长设置为两者的平均数, 即为 660.5 nm。叶绿素 a 和叶绿素 b 的特征吸收波长分别为 665.5 nm 和 655.6 nm, 正好与它们在植物体中典型的吸收行为相似<sup>[30]</sup>, 但这与单纯甲醇中它们的吸收波长(叶绿素 a: 665 nm; 叶绿素 b: 650 nm)<sup>[31]</sup>略有差异, 这可能与 CC 流动相中的超临界二氧化碳(supercritical carbon dioxide, scCO<sub>2</sub>)有关, scCO<sub>2</sub> 的低极性可能导致叶绿素分子周围的溶剂化壳发生变化, 导致电子跃迁的能量略微不同<sup>[32]</sup>, 此外高压下溶剂密度的变化会进一步影响叶绿素的吸收特性<sup>[33]</sup>。在 660.5 nm 下的典型色谱图如图 2 所示, 从图 2 上可以看出叶绿素 a 和叶绿素 b 已经达到基线分离, 因此使用等度流动相即可满足分离需求, 同时能够缩短批量分析时间。

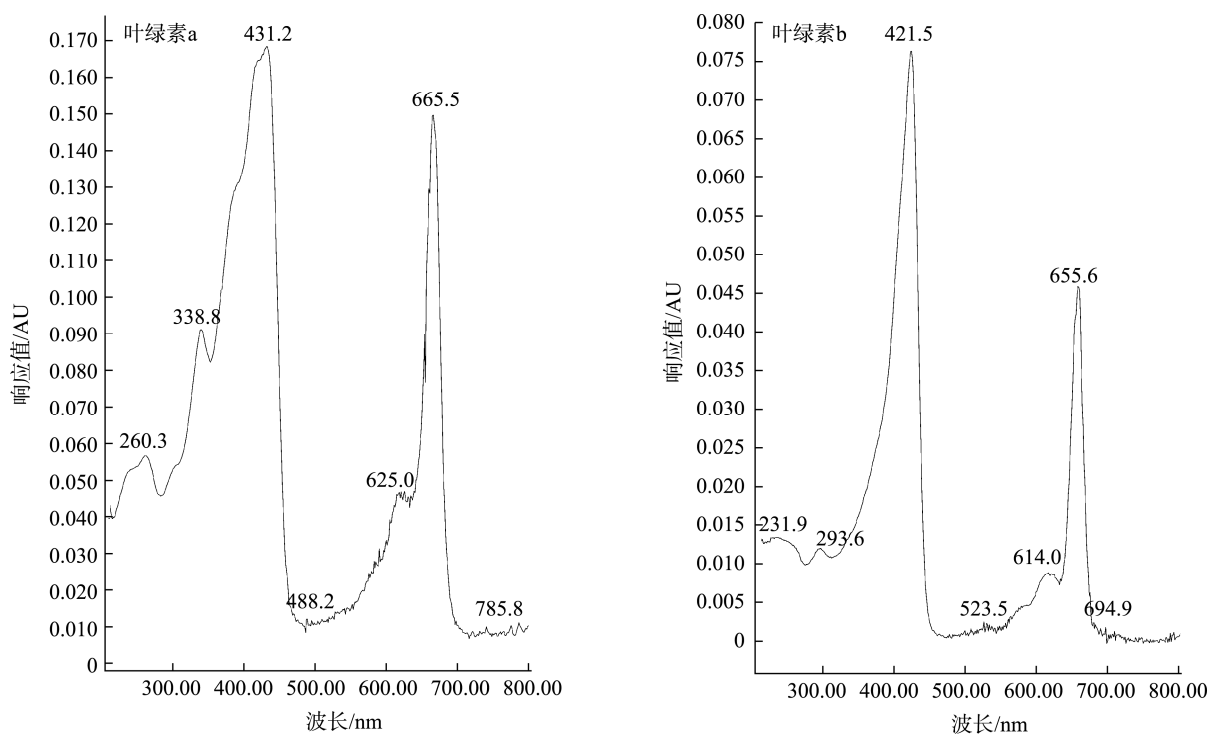
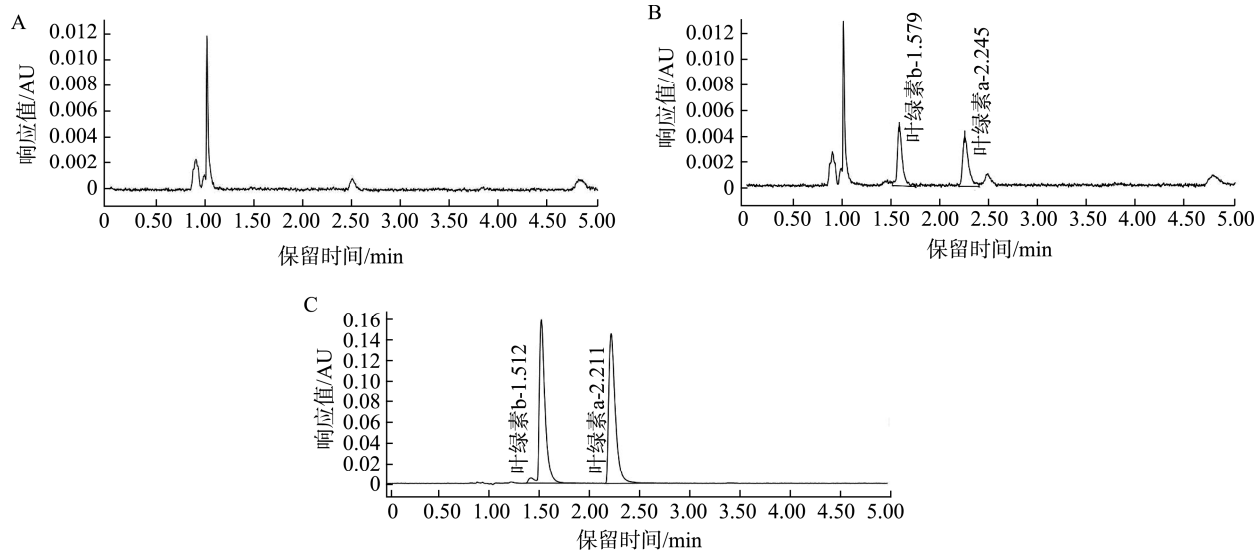


图 1 叶绿素 a 和叶绿素 b 的紫外-可见吸收光谱

Fig.1 UV-Vis absorption spectra of chlorophyll a and chlorophyll b



注: A. 空白基质; B. 定量限水平加标样品; C. 实测样品(鲜芥菜)。

图 2 660.5 nm 的典型色谱图

Fig.2 Typical chromatogram at 660.5 nm

## 2.2 提取条件的选择

经调整, 甲醇、乙醇和石油醚在索氏抽提仪中的回流速率约为 2 滴/s 时, 对应加热板温度分别为 70、135 和 175 °C。而相对的, 其在萃取杯中的降解曲线如图 3 所示。如图 3 所示, 甲醇和乙醇中, 无论叶绿素 a 还是叶绿素 b 都无法维持稳定。这主要是由于溶剂的沸点要求了更高的溶剂温度, 而高温导致了叶绿素的分解<sup>[34]</sup>, 此外溶剂本身的性质也有可能影响了叶绿素的热稳定性<sup>[35]</sup>。而从所获得的降

解曲线可得, 石油醚中叶绿素含量能够在 12 h 内维持稳定, 没有降解, 因此适合于叶绿素的萃取。NY/T 3082—2017 中所述叶绿素提取溶剂为乙醇-丙酮溶液, 其中丙酮以其更强的渗透性能够有助于叶绿素从植物细胞中溶出, 但是由于丙酮在当前作为易制毒试剂进行管理, 在可得性和便利性上相比本方法的提取溶剂, 存在劣势。考虑到冗余, 本研究设定样品提取条件设定为以下。提取溶剂: 石油醚(沸程 30~60 °C); 提取时间: 8 h; 加热板温度: 70 °C。

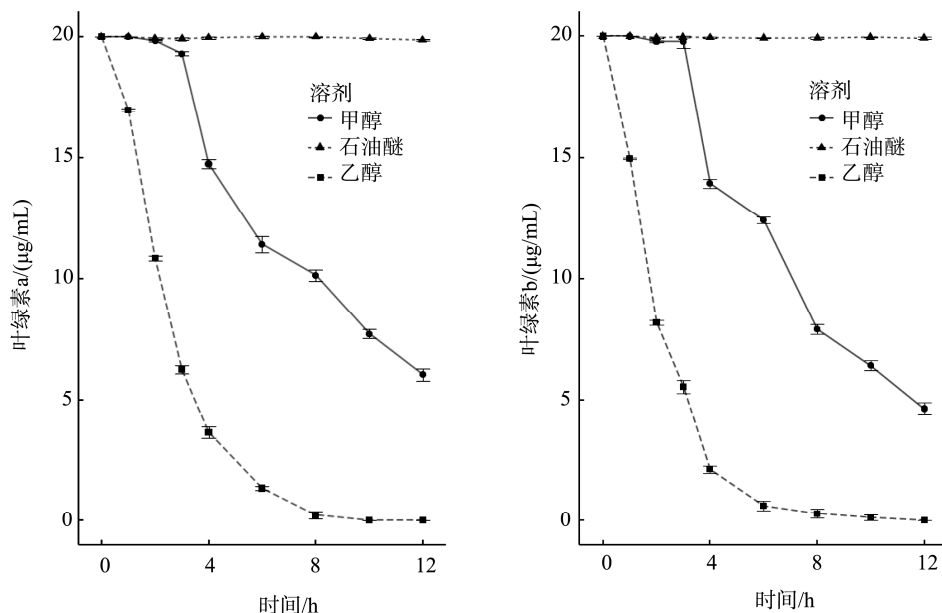


图3 叶绿素 a 和叶绿素 b 在不同溶剂(甲醇、乙醇、石油醚)萃取中的稳定性( $n=6$ )

Fig.3 Stability of chlorophyll a and chlorophyll b in methanol, ethanol, and petroleum ether under different solvent extractions ( $n=6$ )

## 2.3 方法学验证

### 2.3.1 标准曲线相关性验证

参考 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》要求验证了 6 组平行的标准曲线样品的相关系数( $r^2$ )均大于 0.99。其中典型叶绿素 a 标准曲线公式为  $Y=2.565 \times 10^4 X+1.005 \times 10^3$ ,  $r^2=0.9999$ ; 叶绿素 b 标准曲线公式为  $Y=2.480 \times 10^4 X-1.992 \times 10^3$ ,  $r^2=0.9993$ 。式中  $Y$  为上样液质量浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ,  $X$  为目标分析物的峰面积, 无量纲。

### 2.3.2 检出限和定量限验证

经过 6 平行 LOD 为 0.02 mg/kg 水平加标样品检测, 计算得到叶绿素 a 和叶绿素 b 对应的 SD 分别为 5.7  $\mu\text{g/kg}$  和 6.4  $\mu\text{g/kg}$ 。LOD-3SD、LOD、LOD+3SD 3 个水平的加标样品检测结果如表 1 所示, 经过计算, 叶绿素 a 和叶绿素 b 的 LOD 均为 0.02 mg/kg。LOQ 则定为 3 倍 LOD, 并且在标准曲线的范围内, 为 0.06 mg/kg。有研究使用高效液相色谱-串联质谱法检测叶绿素, 叶绿素 a 的 LOD 可以达到 0.24 ng/mL<sup>[36]</sup>, 以水的密度进行换算, 比本研究更灵敏, 但这更可能归因于质谱检测器相比紫外-可见更加灵敏。但是本研究的 LOD 和 LOQ 相较 NY/T 4357—2023《植物源性食品中叶绿素的测定 高效液相色谱法》和 NY/T 3082—2017《水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定 分光光度法》灵敏度更高。因此虽然 LOD 和 LOQ 不如某些高灵敏度技术低, 但在常规检测中已足够有效, 适用于较为常见的检测场景, 可以进行后续的方法学验证。

### 2.3.3 正确性验证

正确度通过测定空白样品基质中加入已知量分析物的回收率获得。可接受的回收率范围与分析目的和分析物在样品中的浓度有关, 参考《食品化妆品专业化学分析方法验证程序》中表 C.3。

表 1 LOD-3SD、LOD、LOD+3SD 水平加标的基质样品叶绿素 a 和叶绿素 b 的测定结果( $n=20$ )

Table 1 Determination of chlorophyll a and chlorophyll b in matrix samples spiked at LOD-3SD, LOD, and LOD+3SD levels ( $n=20$ )

目标物	浓度水平/ ( $\mu\text{g/kg}$ )	检测结果 /( $\mu\text{g/kg}$ )	检出概率 /%
叶绿素 a	20.0-3 $\times$ 5.7	3.84 $\pm$ 4.0	65
	20.0	18.0 $\pm$ 6.4	95
	20.0+3 $\times$ 5.7	39.3 $\pm$ 5.3	100
叶绿素 b	20.0-3 $\times$ 6.4	2.20 $\pm$ 2.8	45
	20.0	20.2 $\pm$ 5.5	95
	20.0+3 $\times$ 6.4	38.1 $\pm$ 4.3	100

分别以本研究所开发的 CC 方法和基于分光光度法两种分析原理不同的方法, 检测真实新鲜蔬菜样品的叶绿素含量, 并额外对腌制后的雪菜和晒干后的梅干菜中叶绿素进行测定, 其结果如表 2 所示。对比两种方法的结果, 可见其相对相差在 3 种样品中均小于 10%(标准要求的相对相差), 可见本研究所述方法在多种可能存在的共存物质干扰下, 依然保持与标准方法相似的检测结果, 这表明其对叶绿素的特异性较高。

### 2.3.4 LOQ、线性范围和方法正确度验证

参考《食品化妆品专业化学分析方法验证程序》, 由于没有有证标准物质(certified reference material, CRM), 正确度通过测定空白样品基质中加入已知量分析物的回收率获得。设置了 LOQ、2 倍 LOQ、10 倍 LOQ 的加标样品进行了正确度的验证, 此外还设置了低水平(8 mg/kg)、中水平(80 mg/kg)以及线性范围内的最高检测含量 800 mg/kg 含量水平的基质加标样品并标记为高水平, 其检测结果如表 3 所示。对比验证程序中的回收率要求, 本研究所述方

表 2 真实样品的分光光度计检测叶绿素结果及与 CC 检测结果的相对相差( $n=6$ )  
Table 2 Spectrophotometric chlorophyll results of real samples and relative differences with CC results ( $n=6$ )

样品	叶绿素 a			叶绿素 b		
	分光光度计测得含量/(mg/kg)	CC 测得含量/(mg/kg)	相对相差/%	分光光度计测得含量/(mg/kg)	CC 测得含量/(mg/kg)	相对相差/%
羽衣甘蓝 1	$(2.09 \pm 0.13) \times 10^2$	$(2.14 \pm 0.06) \times 10^2$	1.90	$(3.04 \pm 0.22) \times 10^2$	$(3.19 \pm 0.12) \times 10^2$	1.30
羽衣甘蓝 2	$(1.92 \pm 0.13) \times 10^2$	$(1.89 \pm 0.05) \times 10^2$	1.60	$(2.67 \pm 0.24) \times 10^2$	$(2.71 \pm 0.08) \times 10^2$	1.50
鲜芥菜	$(5.05 \pm 0.36) \times 10$	$(5.01 \pm 0.24) \times 10$	0.65	$(6.10 \pm 0.53) \times 10^2$	$(6.09 \pm 0.13) \times 10^2$	0.09

表 3 基质加标样品的检测结果和回收率( $n=6$ )  
Table 3 Results and recoveries of matrix spiked samples ( $n=6$ )

样品	叶绿素 a			叶绿素 b		
	含量/(mg/kg)	回收率/%	回收率要求/%	含量/(mg/kg)	回收率/%	回收率要求/%
LOQ	$(6.04 \pm 0.40) \times 10^{-2}$	101	70~110	$(5.98 \pm 0.30) \times 10^{-2}$	100	70~110
2 LOQ	0.119±0.003	99	80~110	0.120±0.006	100	80~110
10 LOQ	0.604±0.012	101	80~110	0.610±0.022	102	80~110
低水平	8.09±0.16	101	80~110	7.95±0.21	99	80~110
中水平	80.7±1.6	101	80~110	80.5±1.0	100	80~110
高水平	$(7.97 \pm 0.06) \times 10^2$	100	90~100	$(8.00 \pm 0.08) \times 10^2$	100	90~100

法均在可接受范围内,并且在较高浓度下其回收率能够非常接近 100%,说明本方法结果的偏倚度符合分析方法开发的要求。其中 LOQ 水平下,回收率符合要求,证明本方法对于 LOQ 水平的样品能够准确定量。同样,对于线性范围内最高浓度水平(HQC)的正确性考察表明,本方法在线性范围为 0.06~800.00 mg/kg 下,能够准确定量。虽然回收率接近 100%是正面的,但是由于加标样品并不能完全代表真实样品的性质,会使验证结果存在一定局限性。特别是使用固液提取方法进行叶绿素提取时,往往由于溶剂穿透性差异而导致提取效率相对加标样品存在差异<sup>[37]</sup>。因此,必须综合考虑准确性和利用其他不同原理检测方法进行交叉验证。而对比和表 2 来看,本方法的正确性能够满足实际检测的需求。

#### 2.4 真实样品实际应用

本研究中,对于相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)的要求受到其具体含量的影响,可接受 RSD ( $RSD_r$ )与样品中含量有关,通过 Horwitz 方程<sup>[38]</sup>的 2/3 水平进行计算,计算方法见公式(1)。Horwitz 方程以一种简

单的数学表达式呈现,便于快速估算测量不确定性和再现性标准差,特别是跨实验室研究中,能够快速评估结果的可靠性和一致性,并且适用于广泛的浓度范围,从百分级到痕量级,为不同浓度下的分析方法提供了可靠的精度评估<sup>[39]</sup>。根据计算结果(表 4),在 5 种真实样品中,本研究所所述方法的精密密度均符合方法开发程序要求。此结果的 RSD 即为重复性精密密度,是指在相同的条件下,对一样本进行多次测量或实验时,所得到结果的一致性 or 接近程度,是误差的一种度量方式,用于评价多次测量之间的变异性。重复性精密密度越高,说明多次测量结果之间的差异越小,测量结果越稳定。此外通过对梅干菜、蒸煮梅干菜、水煮梅干菜中叶绿素的检测结果可见,如文献报道所述,叶绿素在高温烹调的情况下会逐渐降解<sup>[40]</sup>。并且在长时间加热下本方法依然能检测到残留的叶绿素,表明本方法的低检出限对于食品加工领域研究的价值。

$$RSD_r = \frac{2}{3} \times 2(1-0.5)\log_{10}C^2 \quad (1)$$

式中:  $RSD_r$  为可接受 RSD, %;  $C$  为试样中叶绿素 a 或叶绿素 b 的质量分数,无量纲。

表 4 真实样品的 CC 检测结果( $n=6$ )  
Table 4 CC test results of real samples ( $n=6$ )

样品	叶绿素 a			叶绿素 b		
	含量/(mg/kg)	RSDs/%	RSD 要求/%	含量/(mg/kg)	RSDs/%	RSD 要求/%
羽衣甘蓝 1	$(2.14 \pm 0.06) \times 10^2$	2.6	11	$(3.19 \pm 0.12) \times 10^2$	3.7	10
羽衣甘蓝 2	$(1.89 \pm 0.05) \times 10^2$	2.8	11	$(2.71 \pm 0.08) \times 10^2$	3.1	10
鲜芥菜	50.1±2.4	4.7	13	$(6.09 \pm 0.13) \times 10^2$	2.2	9.1
雪菜	17.3±0.8	4.4	16	25.7±0.9	3.4	15
梅干菜	2.69±0.14	5.0	21	11.6±0.7	5.7	17
蒸煮梅干菜	0.389±0.036	9.4	28	1.13±0.08	7.0	24
水煮梅干菜	$(6.53 \pm 0.70) \times 10^{-2}$	10.7	36	0.187±0.026	14.0	31

### 3 结 论

本研究建立了一种基于 CC 检测蔬菜中叶绿素 a 和叶绿素 b 的方法。其优化后的前处理方法为利用石油醚(沸程 30~60 °C)在加热板温度 70 °C 下对匀浆后并用无水硫酸钠脱水的样品进行 8 h 的索氏抽提, 抽提液浓缩吹干后以甲醇复溶上机 CC 检测。色谱柱为 Torus DEA 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相: A: CO<sub>2</sub>, B: 甲醇, A:B=92:8 (V:V); 流速: 1.5 mL/min; 背压: 1800 psi; 柱温: 40 °C; 样品室温度: 4 °C; 进样量: 1 μL; 分析时间 5 min; 检测波长 660.5 nm。经过验证, 本研究的 LOD 为 0.02 mg/kg, LOQ 为 0.06 mg/kg, 线性范围为 0.06~800.00 mg/kg, 经过真实样品和加标基质样品考察结合与基于现行标准分光光度法的交叉验证, 其特异性、精密度、正确度均满足实际应用要求。但是由于条件所限, 本研究仅进行了重复性精密度考察, 后续研究中需要进行在不同的实验室, 由不同的操作人员使用不同设备, 按相同的测试方法, 对同一被测对象相互独立进行的测试的再现性精密度考察。

### 参考文献

- [1] LI R, HE Y, CHEN J, *et al.* Research progress in improving photosynthetic efficiency [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9286.
- [2] MARTINS T, BARROS AN, ROSA E, *et al.* Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: A comprehensive review [J]. *Molecules*, 2023, 28(14): 5344.
- [3] TAN X, CUI F, WANG D, *et al.* Fermented vegetables: Health benefits, defects, and current technological solutions [J]. *Foods*, 2024, 13(1): 38.
- [4] BERNAŠ E, FIUTAK G. The influence of pre-treatment, preservation method, and storage time on carotenoid and chlorophyll profile in nettle juices and its relation to colour changes [J]. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, 2023, 27(2): 199–212.
- [5] UĞUZ AC, ROCHA-PIMIENTA J, MARTILLANES S, *et al.* Chlorophyll pigments of olive leaves and green tea extracts differentially affect their antioxidant and anticancer properties [J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2779.
- [6] MARTÍNEZ-GARCÍA M, GARDUÑO-SOLÓRZANO G, LOPES G, *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and anti-obesity potential of extracts containing phenols, chlorophyll and carotenoids from mexican wild populations of *bacopa monnieri* (L.) wettst [J]. *Biology*, 2023, 12(4): 620.
- [7] WUNDERLICH ALM, AZEVEDO S, YAMADA LA, *et al.* Chlorophyll treatment combined with photostimulation increases glycolysis and decreases oxidative stress in the liver of type 1 diabetic rats [J]. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 2020, 53(1): e8389.
- [8] MAKINO Y, AMINO G. Digitization of broccoli freshness integrating external color and mass loss [J]. *Foods*, 2020, 9(9): 1305.
- [9] PETROVIĆ SM, SAVIĆ SR, MARKOVIĆ DZ, *et al.* *In vitro* studies of temperature and pH influence on chlorophyll degradation by horseradish peroxidase: Spectroscopic and HPLC studies [J]. *Hemijska Industrija*, 2014, 68(2): 233–239.
- [10] AHMADI K, OMIDI H, MEHRNIA M, *et al.* Comparative extraction efficacy of different organic solvents for leaf chlorophylls and carotenoids in (*Portulaca oleracea* L.) varying with growth behavior and stress type [M]. Preprints: Preprints, 2019.
- [11] SANCHINI A, GROSJEAN M. Quantification of chlorophyll a, chlorophyll b and pheopigments a in lake sediments through deconvolution of bulk UV-Vis absorption spectra [J]. *Journal of Paleolimnology*, 2020, 64(3): 243–256.
- [12] ERGUN E, DEMIRATA B, GUMUS G, *et al.* Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 379(5): 803–811.
- [13] POWER SM, FREE L, DELGADO A, *et al.* A novel low-cost plug-and-play multi-spectral led based fluorometer, with application to chlorophyll detection [J]. *Analytical Methods*, 2023, 15(41): 5474–5482.
- [14] DAS A, GUYER L, HÖRTENSTEINER S. Chlorophyll and chlorophyll catabolite analysis by hplc [M]. Guo Y. *Plant senescence: Methods and protocols*. New York, NY; Springer New York, 2018: 223–235.
- [15] ZHANG K, LI W, LI H, *et al.* A leaf-patchable reflectance meter for in situ continuous monitoring of chlorophyll content [J]. *Advanced Science*, 2023, 10(35): 2305552.
- [16] LICHTENTHALER H. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 350–382.
- [17] GIBBS C. Chlorophyll b interference in the fluorometric determination of chlorophyll a and 'phaeo-pigments' [J]. *Marine and Freshwater Research*, 1979, 30(5): 597–606.
- [18] GANDUL-ROJAS B, ROCA M, GALLARDO-GUERRERO L. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (e-141ii colorant) [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 46(1): 311–318.
- [19] SÖZGEN-BAŞKAN K, TÜTEM E, ÖZER N, *et al.* Spectrophotometric and chromatographic assessment of contributions of carotenoids and chlorophylls to the total antioxidant capacities of plant foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(47): 11371–11381.
- [20] MATHIYALAGAN S, MANDAL BK, SINHA M, *et al.* Synthesis of different metallochlorophyllins and quantification in food samples by reversed phase-high performance liquid chromatography [J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(21): 3120–3126.
- [21] VIERA I, HERRERA M, ROCA M. *In vitro* bioaccessibility protocol for chlorophylls [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(31): 8777–8786.
- [22] DELPINO-RIUS A, COSOVANU D, ERAS J, *et al.* A fast and reliable ultrahigh-performance liquid chromatography method to assess the fate of chlorophylls in teas and processed vegetable foodstuff [J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1568: 69–79.

- [23] PETROVIĆ S, ZVEZDANOVIĆ J, MARKOVIĆ D. Chlorophyll degradation in aqueous mediums induced by light and UV-b irradiation: An UHPLC-ESI-MS study [Z]. 2017.
- [24] MÜLLER T, VERGEINER S, KRÄUTLER B. Structure elucidation of chlorophyll catabolites (phytylobilins) by ESI-mass spectrometry-pseudo-molecular ions and fragmentation analysis of a nonfluorescent chlorophyll catabolite (ncc) [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2014, 365-366(5): 48-55.
- [25] HUDALLA CJ, MCDONALD PD. A new separation tool for a broad range of analytical challenges: Ultraperformance convergence chromatography [J]. Chromatography Today, 2012, 16(7a8): 518-520.
- [26] PERCHUK IN, SHELENGA TV, BURLYAEVA MO. The effect of illumination patterns during mung bean seed germination on the metabolite composition of the sprouts [J]. Plants (Basel), 2023, 12(21): 37960128.
- [27] RSTUDIO TEAM. Rstudio: Integrated development environment for R [Z]. 2020.
- [28] R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing [M]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024.
- [29] HADLEY W. Ggplot2: Elegant graphics for data analysis [M]. Newyork: Springer, 2009.
- [30] BORSUK AM, BRODERSEN CR. The spatial distribution of chlorophyll in leaves [J]. Plant Physiology, 2019, 180(3): 1406-1417.
- [31] IRIYAMA K, YOSHIURA M. Absorption spectroscopy of chlorophylls a and b in methanol, dioxane and/or water [J]. Colloid and Polymer Science, 1977, 255(2): 133-139.
- [32] HEDAYATIFAR L, IRANI E, MAZAREI M, *et al.* Optical absorption and electronic spectra of chlorophylls a and b [J]. RSC Advances, 2016, 6(111): 109778-109785.
- [33] ED-DAHMOUNY A, SALI A, ES-SBAI N, *et al.* The impact of hydrostatic pressure and temperature on the binding energy, linear, third-order nonlinear, and total optical absorption coefficients and refractive index changes of a hydrogenic donor impurity confined in *gaas/alxga1-xas* double quantum dots [J]. The European Physical Journal Plus, 2022, 137(7): 784.
- [34] RUDRA SG, SARKAR BC, SHIVHARE US. Thermal degradation kinetics of chlorophyll in pureed coriander leaves [J]. Food and Bioprocess Technology, 2008, 1(1): 91-99.
- [35] NGCOBO S, BADA SO, UKPONG AM, *et al.* Optimal chlorophyll extraction conditions and postharvest stability in moringa (*m. Oleifera*) leaves [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2024, 18(3): 1611-1626.
- [36] MANDAL BK, LING YC. Analysis of chlorophylls/chlorophyllins in food products using HPLC and HPLC-MS methods [J]. Molecules, 2023, 28(10): 4012.
- [37] GEORGIPOULOU I, TZIMA S, LOULI V, *et al.* Process optimization of microwave-assisted extraction of chlorophyll, carotenoid and phenolic compounds from *Chlorella vulgaris* and comparison with conventional and supercritical fluid extraction [J]. Applied Sciences, 2023, 13(4): 13042740.
- [38] HORWITZ W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs [J]. Analytical Chemistry, 1982, 54(1): 67-76.
- [39] THOMPSON M. Towards an explanation of the horwitz function [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(4): 1671-1676.
- [40] WEEMAES CA, OOMS V, VAN LOEY AM, *et al.* Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2404-2409.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)