

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH CHLOROPHYLL A BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LÔNG HIỆU NĂNG CAO

Đến tòa soạn 01-02-2021

Nguyễn Thành Đồng, Phạm Thị Yến, Nguyễn Thu Trang

Viện Công nghệ môi trường, Viện HLKH&CNVN

Đặng Vũ Khắc

Đại học sư phạm Hà Nội

SUMMARY

DETERMINATION OF CHLOROPHYLL A BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

A simple High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC) method was developed and validated for the determination of Chlorophyll a in phytoplankton and water. The separation was carried out by a Nova-Pak C18 column (150 mm × 3.9 mm; 4 μm) with mobile phase consisted of acetone: metanol (70:30 v/v). The flow rate was 0.6 mL/min and DAD detection at 430 nm. The retention time of Chlorophyll a was found at 4.8 min. The calibration curves were linear with the regression coefficient (R^2) of 0.9999 within the range from 0.005 to 5ppm. The detection and quantification limit were 0.002 and 0.005 ppm, respectively. This method was used to found sensitive, specific, and capable of estimation of Chlorophyll a in phytoplanktons and water. This method has been applied successfully, sensitively and specifically in the determination of Chlorophyll a in phytoplankton and water.

Keywords: Chlorophyll a, Chlorophyll a extraction, High-Performance Liquid Chromatography method.

1. MỞ ĐẦU

Chlorophyll- a (Chl- a) là sắc tố quang hợp chính của thực vật phù du, đã được sử dụng rộng rãi để ước tính sinh khối và hàm lượng thực vật phù du, từ đó đánh giá được mức độ phong phú của thực vật phù du trong nước [1]. Thực vật phù du đóng một vai trò quan trọng trong hệ sinh thái dưới nước, chúng cung cấp các hợp chất hữu cơ cho các sinh vật sống dưới nước để duy trì lưới thức ăn và duy trì các chức năng sinh thái thiết yếu. Mặt khác, thực vật phù du có thể liên quan đến các tác động bất lợi như hiện tượng tảo nở hoa làm ảnh hưởng đến hệ sinh thái sông, hồ, biển, ...[2]. Do đó, việc xác định hàm lượng Chl-a có vai trò rất quan trọng trong quá trình theo dõi sự phát triển của thực vật phù du theo thời gian và hỗ trợ cho việc đánh giá tác động ô nhiễm môi trường nước [3].

Một số phương pháp được công bố về bảo quản mẫu, quy trình chiết, dung môi thích hợp để sử dụng cho việc định lượng Chl-a như dùng acetone 90% [3], metanol, acetone, etanol, diethyl ether [4], hoặc bằng acetone, metanol trong điều kiện lạnh và tối [5]. Các phương pháp đã được dùng để xác định Chl-a như phương pháp quang phổ UV-VIS [6], [7], phương pháp quang phổ huỳnh quang [8], phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) [9], phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) [10], phương pháp sắc ký lỏng- khối phổ (LC-MS) [11],... Tuy nhiên, có một số nhà nghiên cứu đã chỉ ra rằng phương pháp quang phổ UV-VIS và quang phổ huỳnh quang có độ nhạy kém, thời gian phân tích lâu. Qua các nghiên cứu trên cho thấy ưu điểm của HPLC là có độ nhạy cao, khả năng định lượng tốt, sử dụng ít hóa chất do đó làm giảm chi phí

cho phân tích. Mặc khác, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào xác định Chl-a trong các mẫu nước biển và nước ngọt. Vì vậy trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector UV được phát triển để xác định Chl-a trong nước mặt, nước biển ven bờ. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là phát triển một phương pháp phân tích có độ nhạy cao, khoảng tuyến tính rộng, tiến hành nhanh và đơn giản.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất

Các loại hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm dung môi metanol (MeOH), axeton, etanol loại tinh khiết dùng cho sắc ký của hãng JT. Baker, USA. Etyl axetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) loại tinh khiết dùng cho sắc ký của hãng Merck (Darmstadt, Đức).

Chất chuẩn Chl- a ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$) thuộc hãng TRC, Canada. Chuẩn gốc Chl-a (1,00 mg/mL) được chuẩn bị trong acetone và được lưu giữ ở âm 20 °C.

Thiết bị

Hệ thống sắc ký HPLC (Shimadzu) bao gồm: bộ điều khiển (SCL-10A SP); bơm cao áp (LC-10A SP); bộ phận tiêm mẫu (SIL-10AF), detector DAD (SPD-M20A); bộ phận khử khí (DGU-14A); bộ gia nhiệt (HIC-10A) và cột sắc ký pha đảo Nova-Pak C18 (150 mm × 3,9 mm; 4 µm).

Một số thiết bị khác được dùng trong nghiên cứu như máy đo quang phổ UV-Vis (Lambda 35 – Perkin Elmer), máy li tâm (Centrifuge Combi 514R – Korea, Centurion Scientific K2015 – UK).

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu nước biển ven bờ ở khu vực Nghi Sơn – Thanh Hóa (NBVB) và mẫu nước mặt lấy tại hồ Tây – Hà Nội (NM).

2.3. Quy trình phân tích

2.3.1. Xây dựng phương pháp định lượng Chl-a trên HPLC

Các điều kiện sắc ký được khảo sát bao gồm: các hệ dung môi metanol/acetone/ etyl axetat, acetone/ etyl axetat, metanol/ etyl axetat, acetone/metanol, với các tỷ lệ khác nhau (60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90 (v/v)) và các tốc độ dòng khác nhau (0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 ml/phút) trên máy HPLC. Sau khi tối

ưu hóa được quy trình phân tích Chl-a trên hệ thống HPLC, tiến hành xác định tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng (tỷ lệ thu hồi), giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

2.3.2. Quy trình xử lý mẫu

Mẫu sau khi lấy sẽ được lọc ngay tại hiện trường bằng giấy lọc GF/F đường kính 25mm, kích thước lỗ 0,45µm. Lượng nước được lọc trong khoảng từ 0,1 – 2,0 lít trong điều kiện áp suất lọc không vượt quá 0,5atm. Làm khô giấy lọc trong chân không, khi vừa khô thì lấy khối giá đỡ và được bảo quản trong điều kiện tối và lạnh. Sau đó đem về và chuyển giấy lọc vào bình chiết thủy tinh, bổ sung 10 ml dung môi (metanol, acetone, etanol) với các nồng độ dung môi xác định (70-100%). Bình thủy tinh được bọc kín và được giữ trong điều kiện tối ở nhiệt độ 4 °C và thời gian thích hợp (1 – 24 giờ) với từng thí nghiệm. Sau đó, mẫu được ly tâm 4000 rpm trong 10 phút. Dịch nổi được thu hồi đem lọc qua màng 0,45 µm, sau đó pha loãng bằng pha động và phân tích trên HPLC.

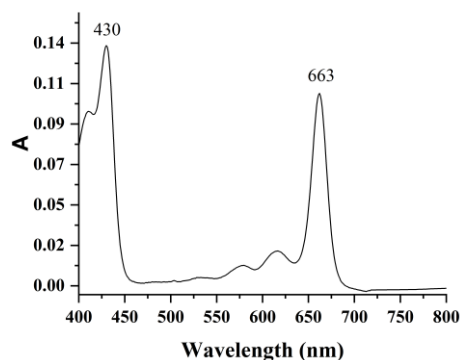
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích Chl-a bằng HPLC

3.1.1. Kết quả khảo sát các điều kiện sắc ký

a. Bước sóng hấp thụ cực đại của Chl a

Phổ hấp thụ cực đại của Chl-a được thể hiện ở hình 1. Kết quả cho thấy Chl-a có 2 đỉnh hấp thụ cực đại ở 430 và 663 nm. Tuy nhiên, ở bước sóng 430 nm cho độ hấp thụ quang cao hơn. Để có độ nhạy phân tích tốt nhất, bước sóng hấp thụ ở 430 nm được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Phổ hấp thụ của Chl a

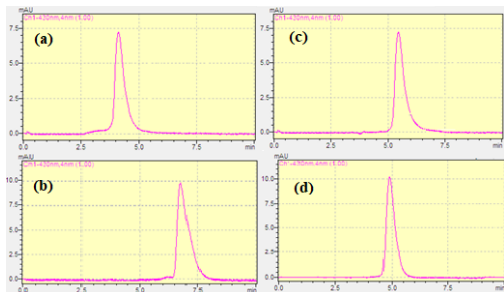
b. Thành phần pha động

Pha động không chỉ ảnh hưởng đến khả năng tách, thời gian lưu mà còn xác định dạng tồn

tại của chất phân tích. Trong nghiên cứu này sử dụng dung dịch Chl-a 0,5ppm để khảo sát các hệ pha động khác nhau gồm: acetone/ etyl axetat, meoh/ etyl axetat, metanol/acetone/ etyl axetat, acetone/metanol ở cùng một điều kiện sắc ký. Kết quả sắc ký đồ của các hệ pha động khác nhau được trình bày trong hình 2. Kết quả chỉ ra rằng hệ pha động gồm acetone và metanol cho pic cân đối (hệ số bất đối là $A_{sys} \approx 1$) và thời gian lưu phù hợp. Do đó, pha động gồm metanol và acetone được chọn để phục vụ cho các nghiên cứu sau. Tỷ lệ thành phần giữa metanol và acetone có thể ảnh hưởng đáng kể đến độ hòa tan của chất phân tích. Kết quả thay đổi tỷ lệ thành phần pha động được trình bày ở hình 3 cho thấy, chiều cao pic đạt cực đại với tỷ lệ metanol/acetone là 30/70. Do đó, pha động metanol/acetone (30/70) được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

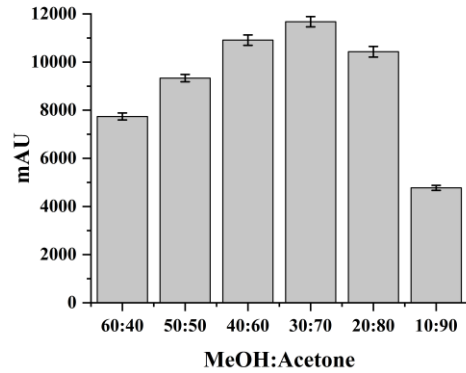
c. Tốc độ dòng

Tốc độ dòng của pha động được khảo sát với các mức là 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 và 1,2 ml/phút với thời gian lưu tương ứng lần lượt là 7,20; 4,81; 3,42; 2,72; 2,32 phút. Kết quả cho thấy, khi tốc độ dòng tăng, thời gian lưu và chiều cao pic giảm. Thời gian lưu ngắn trong trường hợp mẫu có nền phức tạp dễ bị ảnh hưởng bởi tạp chất, thời gian duy trì lâu sẽ làm tổn nhiều pha động và thời gian phân tích. Vì vậy, tốc độ dòng được chọn trong nghiên cứu này là 0,6 ml/phút.



Hình 2. Sắc ký đồ của Chl-a với các hệ pha động khác nhau

- (a) Acetone/ Etyl axetat=7/3;
- (b) Metanol/ Etyl axetat =8/2;
- (c) Metanol/ Acetone/ Etyl axetat = 6/3/1;
- (d) Metanol/Acetone = 3/7



Hình 3. Sự phụ thuộc của chiều cao pic vào thành phần pha động ($n=5$)

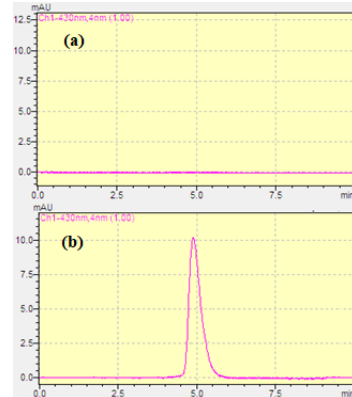
Bảng 1. Điều kiện phân tích trên hệ thống HPLC

Cột sắc ký	Nova-Pak C18, Water (150mm×3,9 mm; 4 μ m)
Bước sóng hấp thụ	430 nm
Pha động	MeOH/acetone (30/70)
Chế độ rửa giải	Đẳng dòng
Tốc độ dòng	0,6 ml/phút
Thể tích bơm mẫu	20 μ l

3.1.2. Đánh giá phương pháp xác định Chl a

a. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng (pha động) và mẫu có chứa 0,5 ppm Chl-a theo điều kiện sắc ký đã lựa chọn (bảng 1). Các sắc đồ được thể hiện ở hình 4 cho thấy, tín hiệu pic của mẫu chứa Chl-a xuất hiện tại thời gian lưu là $t_R=4,81$ phút. Trong khi đó trên sắc đồ mẫu blank, không thấy xuất hiện tín hiệu pic tại thời gian lưu này. Điều này chứng tỏ, phương pháp có tính chọn lọc phù hợp cho phân tích Chl-a.



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a) và mẫu có chứa chlorophyll a (b).

b. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký, tiến hành pha 01 mẫu đối chiếu có nồng độ 0,5ppm, sau đó đo lặp lại 5 lần với điều kiện đã lựa chọn (bảng 1) và cho kết quả ở bảng 2. Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian và chiều cao pic lần lượt là 0,19 và 1,33% (đều <2%). Kết quả cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn trên hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích định lượng Chl-a.

c. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính của phương pháp

Mối tương quan giữa nồng độ Chl-a (x, ug/l) và chiều cao pic (y, mAU) được xác định trong khoảng tuyến tính từ 5ppb-5ppm, với phương trình đường tuyến tính thu được là $y = (19,6368 \pm 0,02856)x + (194,6485 \pm 51,5541)$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$. LOD và LOQ của phương pháp tương ứng là 0,001 và 0,005ppm với tỉ lệ S/N (tín hiệu chất phân tích/ tín hiệu đường nền) tương ứng lần lượt là 3 và 10.

d. Độ chính xác

Kết quả phân tích 5 lần tại các nồng độ 0,015; 0,5 và 3 ppm trong cùng ngày và trong các ngày khác nhau (bảng 3) của các phép phân tích cho độ lặp lại tốt tương ứng với RSD_R (1,10 -3,58%) và RSD_r (1,33 -4,11%), độ thu hồi của phép phân tích đạt từ 97,33 - 102,06 %. Như vậy phương pháp phân tích có độ chính xác cao theo qui định của AOAC [12].

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Trung bình	RSD (%)
t_R	4,82	4,82	4,81	4,82	4,80	4,81	0,19
H	11711	11900	11883	11539	11637	11734	1,33

Bảng 3. Kết quả độ chính xác của chất chuẩn Chl-a (n=5)

Nồng độ chất chuẩn (mg/l)	Kết quả phân tích (mg/l)	RSD_R (%)	RSD_r (%)	Độ thu hồi (%)
0,015	0,015±0,001	3,58	4,11	97,33
0,5	0,495±0,008	1,21	1,56	99,02
3	3,062±0,041	1,10	1,33	102,06

3.2. Khảo sát điều kiện chiết mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Chl-a có khả năng tan tốt trong các dung môi hữu cơ như etanol, metanol, acetone, hỗn hợp metanol/nước hoặc etanol/nước. Chính vì vậy, các loại dung môi chiết Chl-a trình bày trong bảng 4 được khảo sát nhằm tìm được dung môi chiết thích hợp cho các mẫu khác nhau (nước mặt, nước biển ven bờ). Kết quả cho thấy nồng độ Chl-a thay đổi theo loại dung môi và nồng độ dung môi sử dụng để chiết mẫu. Khi giảm nồng độ dung môi metanol thì nồng độ Chl-a thu được giảm dần và đạt giá trị cao nhất ở metanol 100 % ở tất cả các mẫu. Đối với dung môi acetone và etanol cho giá trị cực đại tại nồng độ 80 và 90%. Etanol 90% là dung môi cho hàm lượng Chl-a thu nhận được cao nhất đối với tất cả các mẫu. Vì vậy trong nghiên cứu dung môi etanol 90% được sử dụng để chiết mẫu.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dung môi và nồng độ dung môi lên lượng Chlorophyll a thu nhận sau khi tách chiết

Dung môi	Nồng độ dung môi (%)	Nồng độ Chl-a (ug/l) (n=5)	
		NM	NBVB
Etanol	100	49,64±1,69	5,05±0,37
	90	57,89±1,98	5,17±0,35
	80	53,96±1,84	4,95±0,36
	70	50,48±1,72	4,07±0,3
Metanol	100	50,21±1,71	4,70±0,34
	90	49,44±1,69	4,60±0,34
	80	47,76±1,63	4,57±0,33
	70	43,22±1,47	4,50±0,33
Acetone	100	39,96±1,36	4,20±0,31
	90	41,27±1,41	4,26±0,31
	80	42,36±1,45	4,32±0,32
	70	32,56±1,11	4,16±0,30

3.2.2. Khảo sát thời gian chiết

Thay đổi thời gian chiết từ 1 đến 24 giờ, kết quả thu được trình bày ở bảng 5 cho thấy có sự khác biệt về lượng Chl-a ở các thời gian chiết Chl-a khác nhau trong dung môi; tuy nhiên, sự khác biệt là không quá lớn. Kết quả thực nghiệm cho thấy, với thời gian chiết 6 giờ, hàm lượng Chl-a trong dung dịch là cao nhất trong tất cả các mẫu. Vì vậy lựa chọn thời gian chiết

mẫu là 6 giờ để làm điều kiện chiết mẫu tối ưu.

3.3. Phân tích hàm lượng Chl-a trong mẫu

Kết quả phân tích lặp 5 lần mẫu và mẫu thêm chuẩn của các mẫu nước mặt, nước biển ven bờ được thể hiện trong bảng 5. Kết quả cho thấy, các mẫu phân tích đều có độ lặp lại tốt với $RSD < 6,77\%$, độ thu hồi cao $H \approx 97,33 \div 99,02\%$.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian chiết lên lượng Chlorophyll a thu nhận sau khi tách chiết ($n=5$)

Thời gian (giờ)	Nồng độ Chl-a (ug/l)	
	NM	NBVB
1	46,31±1,78	4,29±0,34
3	55,57±1,81	4,98±0,34
6	57,89±1,98	5,17±0,35
12	57,83±1,96	5,16±0,35
18	57,31±1,94	5,12±0,35
24	57,31±1,94	5,12±0,35

Bảng 6. Kết quả phân tích Chl-a trong mẫu mặt và nước biển ven bờ ($n=5$)

Loại mẫu	Nồng độ Chl-a (ug/l)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)
NM	57,89±1,98	2,59	97,33
NBVB	5,17±0,35	6,77	99,02

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình chiết Chl a bằng dung dịch Etanol 90% trong 6 giờ ở điều kiện lạnh 4 oC và trong bóng tối. Quy trình định lượng Chl a trong dịch chiết được thực hiện bằng HPLC trên cột C18, pha động metanol/acetone (30/70), tốc độ dòng 0,6 ml/phút, thể tích tiêm 20µl, $\lambda_{max} = 430$ nm. Phương pháp phân tích cho tính tương thích hệ thống cao ($RSD < 2\%$) và được đánh giá thẩm định tốt, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính rộng (5ppb – 5 ppm), độ chính xác và độ đúng đạt yêu cầu với LOD và LOQ của phương pháp lần lượt là 0,002 và 0,005 ppm. Phương pháp phân tích đề xuất đã được áp dụng xác định hàm lượng Chl-a cho một số mẫu nước mặt, nước biển ven bờ cho độ chính xác cao ($RSD <$

6,77 %, $H \approx 97,33 \div 99,02\%$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z. liang Liao, H. Chen, B. rong Zhu, and H. zheng Li, “Combination of powdered activated carbon and powdered zeolite for enhancing ammonium removal in micro-polluted raw water,” Chemosphere, vol. 134. pp. 127–132, 2015, doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.088.
- [2] D. Zhang, S. Lavender, J. P. Muller, D. Walton, B. Karlson, and J. Kronsell, “Determination of phytoplankton abundances (Chlorophyll-a) in the optically complex inland water - The Baltic Sea,” Sci. Total Environ., vol. 601–602, pp. 1060–1074, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.245.
- [3] R. Schumann, N. Häubner, S. Klausch, and

- U. Karsten, "Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 55, no. 3, pp. 213–222, 2005.
- [4] J. M. López, R. E. Lucena, L. M. Marcó P., N. Mogollón, R. Rivas, and A. Anzalone G., "Design of a flow injection method for chlorophyll determination in in vitro plants," *Talanta*, vol. 64, no. 5 SPEC. ISS., pp. 1304–1308, 2004.
- [5] K. Iriyama, M. Shiraki, and M. Yoshiura, "An improved method for extraction, partial purification, separation and isolation of chlorophyll from spinach leaves," *J. Liq. Chromatogr.*, vol. 2, no. 2, pp. 255–276, 1979.
- [6] M. A. Costache, G. Campeanu, and G. Neata, "Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables," *Rom. Biotechnol. Lett.*, vol. 17, no. 5, pp. 7702–7708, 2012.
- [7] T. L. Wheeler, "Organization security metrics: Can organizations protect themselves?," *Inf. Secur. J.*, vol. 17, no. 5–6, pp. 228–242, 2008.
- [8] A. M. F. Pinto, E. Von Sperling, and R. M. Moreira, "Chlorophyll-a determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development," *Water Res.*, vol. 35, no. 16, pp. 3977–3981, 2001.
- [9] I. Maróti and É. Gabnai, "Separation of Chlorophylls and Carotenoids By Thin-Layer Chromatography," *Acta Biol. Szeged*, vol. 17, no. 4, pp. 67–77, 1971.
- [10] V. Hynstova, D. Sterbova, B. Klejdus, J. Hedbavny, D. Huska, and V. Adam, "Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 148, pp. 108–118, 2018.
- [11] T. H. Kao, S. C. Huang, B. S. Inbaraj, and B. H. Chen, "Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 626, no. 2, pp. 200–211, 2008.
- [12] Trần Cao Sơn, "Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật." Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội 2010.