

## Количественное определение хлорофилла *a* в биомассе спирулины с помощью ЯМР <sup>1</sup>H

Д. В. Белых,<sup>a@</sup> Е. Н. Зайнуллина,<sup>a</sup> О. М. Старцева<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, 167000 Сыктывкар, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», 167000 Сыктывкар, Россия

@E-mail: belykh-dv@mail.ru

Предложена методика определения массовой доли хлорофилла *a* в биомассе спирулины – сырья для получения производных хлорофилла *a* – с использованием спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H без предварительного разделения компонентов экстракта (получен при исчерпывающем экстрагировании смесью хлороформа с этанолом). Ввиду относительной лабильности хлорофилла *a* для его определения проводили демеаллирование в мягких условиях (действием на экстракт 10 % соляной кислотой) с образованием более устойчивого феофитина *a*, который и служил дериватом для определения хлорофилла *a*. Для расчета массовой доли хлорофилла *a* в воздушно-сухой биомассе спирулины проводили определение содержания феофитина *a* в анализируемом экстракте методом внутреннего стандарта, в качестве которого был использован 4-нитробензальдегид. Соотношение количества феофитина *a* и добавленного в экстракт 4-нитробензальдегида определяли по интегральным интенсивностям сигналов протонов внутреннего стандарта и протонов в мезо-положениях молекулы феофитина *a*. Показано, что для повышения точности определения полезно предварительное удаление части липидных компонентов экстракцией гексаном. Массовая доля хлорофилла *a* в исследуемом сырье составила  $\omega(chl) = 0.81 \pm 0.05$  %. Полученный результат соответствует данным о препаративных выходах феофитина *a* и метилфеофорбида *a*, полученных из этого же образца спирулины (по выходам этих соединений можно судить о нижней границе содержания хлорофилла *a* в сырье). Предложенная методика может быть адаптирована для других видов сырья, содержащих хлорофилл *a* или его производные.

**Ключевые слова:** Хлорофилл *a*, феофитин *a*, спирулина, количественное определение, количественный анализ методом ЯМР <sup>1</sup>H.

## <sup>1</sup>H NMR Quantitative Determination of Chlorophyll *a* in the Spirulina Biomass

Dmitry V. Belykh,<sup>a@</sup> Elena N. Zainullina,<sup>a</sup> and Olga M. Startseva<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemistry of the Federal Research Center “Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences”, 167000 Syktyvkar, Russia

<sup>b</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Pitirim Sorokin Syktyvkar State University”, 167000 Syktyvkar, Russia

@Corresponding author E-mail: belykh-dv@mail.ru

A method for determining the mass fraction of chlorophyll *a* in the spirulina biomass — the feedstock for the preparation of chlorophyll *a* derivatives — using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy without preliminary separation of the extract components is proposed (the extract was obtained by exhaustive extraction with a mixture of chloroform and ethanol). Because of the relative lability of chlorophyll *a* for its determination the demetallation was performed under mild conditions (action on the extract by 10 % hydrochloric acid) with formation of more stable pheophytin *a*, which served as a derivate for the determination of chlorophyll *a*. The chlorophyll *a* mass fraction in the studied raw materials was calculated based on the amount of pheophytin *a* in the extract. The content of pheophytin *a* in the extract analyzed for calculating

of the chlorophyll *a* mass fraction in the air-dry biomass of spirulina was determined by the internal standard method. The 4-nitrobenzaldehyde was used as an internal standard. The ratio of the amount of pheophytin *a* and 4-nitrobenzaldehyde added to the extract was determined by the signal integrated intensities of protons of the internal standard and protons in the meso-positions of the pheophytin *a* molecule. It was shown that, to increase the accuracy of determination, preliminary removal of a part of the lipid components by extraction with hexane is useful. The mass fraction of chlorophyll *a* in the raw material studied was  $\omega(\text{chl}) = 0.81 \pm 0.05 \%$ . The result obtained corresponds to the data on the preparative yields of pheophytin *a* and methylpheophorbide *a* obtained from the same spirulina sample (the yields of these compounds can be used to judge the lower boundary of the content of chlorophyll *a* in the raw material). The proposed technique can be adapted for other types of raw materials containing chlorophyll *a* or its derivatives.

**Keywords:** Chlorophyll *a*, pheophytin *a*, spirulina, quantification, quantitative analysis by  $^1\text{H}$  NMR.

## Введение

В настоящее время производные хлорофилла *a* широко используются для синтеза различных макрогетероциклических соединений, таких как противоопухолевые и антимикробные фотосенсибилизаторы (ФС),<sup>[1–11]</sup> модельные соединения для изучения различных аспектов фотосинтеза,<sup>[12–18]</sup> пигментов для светособирающих систем,<sup>[19]</sup> компонентов при конструировании гибридных материалов различного назначения.<sup>[20–23]</sup> Кроме того, производные хлорофилла *a* используют при встречном синтезе порфиринов, встречающихся в объектах живой и неживой природы.<sup>[24–31]</sup> Дальнейшее развитие фундаментальных и прикладных направлений, связанных с использованием хлорофилла *a* и его производных невозможно без удобных и доступных источников, позволяющих получать хлорофиллы *a*-ряда в достаточных количествах. В то же время, наличие хороших источников производных хлорофилла *a* стимулирует расширение сферы применения этих соединений для решения прикладных и фундаментальных задач.

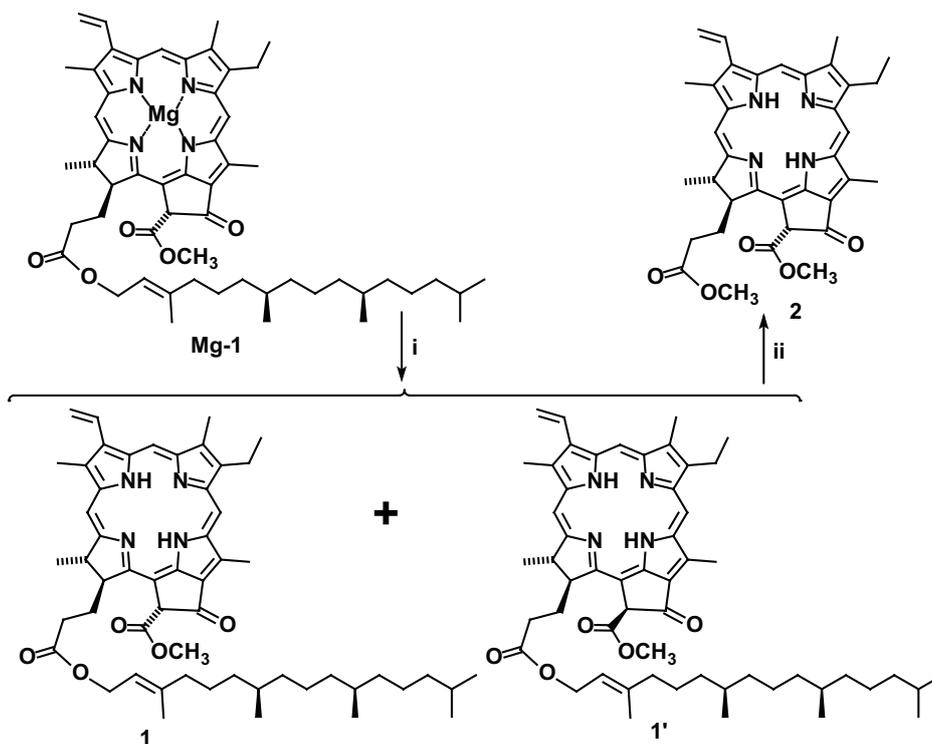
Хлорофилл *a* (**Mg-1**) (Схема 1) и его производные содержатся как в различных видах растительного сырья, так и в продуктах его переработки,<sup>[32–34]</sup> однако, далеко не каждое растительное сырье пригодно для крупномасштабного получения порфириновых соединений. Практика показывает, что оптимальный источник производных хлорофилла *a* должен иметь достаточно большое содержание **Mg-1** или какого-то из его производных. Желательно так же, чтобы в сырье исходно присутствовал минимальный набор хлорофилловых соединений, в идеале – только один хлорофилл. Этим требованиям полностью соответствует биомасса цианобактерии спирулины. В отличие от высших растений, которые использовались для получения хлорофиллов и их производных ранее (в основном, это листья шпината или крапивы),<sup>[32–34]</sup> спирулина содержит только хлорофилл *a*, причем его содержание может достигать, судя по косвенным данным, 1–2 %. Нижний предел содержания **Mg-1** в биомассе спирулины можно оценить по выходам различных соединений, таких как феофитин *a* (**1**), метилфеофорбид *a* (**2**) (Схема 1) и др., при препаративном получении из спирулины (см., например<sup>[32–36]</sup>). Содержание хлорофилла *a* в биомассе спирулины может варьироваться и зависит от многих факторов (условия выращивания, хранения и др.). В то

же время, с точки зрения использования биомассы спирулины как источника макрогетероциклических соединений содержание **Mg-1** является важным параметром, позволяющим не только выбрать наилучшее сырье из возможных вариантов и, тем самым, минимизировать трудозатраты и расходы реагентов, но и оценить эффективность использованного способа получения производных хлорофилла *a*. Таким образом, оценка содержания хлорофилла *a* в биомассе спирулины как одним из лучших видов сырья для получения порфириновых соединений, является актуальной задачей.

Метод ЯМР  $^1\text{H}$  может быть использован для идентификации и количественного определения хлорофиллов и их производных в сумме экстрактивных веществ различных хлорофилл-содержащих объектов без предварительного разделения компонентов экстракта,<sup>[37–44]</sup> причем определяемые количества хлорофиллов сопоставимы с таковыми при использовании оптических методов,<sup>[37,44]</sup> а содержание хлорофинов в описанных в литературе объектах, как правило, значительно ниже, чем в биомассе спирулины. Таким образом, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о возможности использования спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  для оценки содержания **Mg-1** в спирулине. В настоящей работе предложена методика количественного определения хлорофилла *a* в биомассе спирулины с использованием спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ .

## Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования выбрана воздушно-сухая биомасса спирулины (производство «Frontier co-ор», Норвегия), использованная нами ранее в качестве сырья для получения феофитина *a* (**1**)<sup>[35]</sup> и метилфеофорбида *a* (**2**).<sup>[6,45–51]</sup> Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  записывали на спектрометре «Bruker Avance II 300» (300.17 МГц) в  $\text{CDCl}_3$  при комнатной температуре, при анализе экстрактов методом ЯМР  $^1\text{H}$ : NS = 16; SW = 20 м.д. (от –7 до 13 м.д.); импульс 90 град.; задержка между импульсами  $d_1 = 8$  с; цифровое разрешение SI = 8K; отношение сигнал/шум для протонов (S/N) определено при помощи программы TopSpin, для сигналов в области от 7.8 до 10.2 м.д., использованной для анализа, величина соотношения сигнал/шум (S/N) для различных образцов находилась в диапазоне 650–750, для сигналов протонов всех компонентов экстракта (область от –2 до 10.2 м.д.) величина S/N была в диапазоне 18 000–22 000. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2016. ТСХ выполняли на пластинах Sorbfil (ООО «ИМИД»,



**Схема 1.** i: а)  $\text{CHCl}_3\text{-EtOH-HCl-H}_2\text{O}$ , комн. темп., 5–7 мин (при анализе); б)  $\text{EtOH-HCl-H}_2\text{O}$ , комн. темп. (при получении согласно<sup>[35]</sup>); ii:  $\text{MeOH/H}_2\text{SO}_4$ , 1 ч, кипячение.<sup>[32]</sup>

Россия). Для колоночной хроматографии использовали силикагель с диаметром частиц 0.06–0.2 мм «Alfa Aesar».

**Определение массовой доли хлорофилла *a* в биомассе спирулины.** Навеску воздушно сухой спирулины (около 500 мг) суспендировали в гексане (25 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Гексановый экстракт отделяли декантированием, спирулину заливали смесью 25 мл хлороформа с 5 мл этилового спирта. Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре большую часть экстракта декантировали и оставшуюся спирулину снова заливали смесью 25 мл хлороформа с 5 мл этилового спирта. Первый и второй экстракты отфильтровывали от остатков спирулины, объединяли, к полученному объединенному экстракту добавляли 1 мл 10 % соляной кислоты и перемешивали до изменения окраски с изумрудной до болотно-зеленой (примерно 5–7 минут, изменение окраски свидетельствует о деме­таллировании хлорофилла *a* **Mg-1** и образовании феофитина *a* **1**, Схема 1). Затем реакцию смесь разбавляли водой и органический слой промывали от этанола и избытка  $\text{HCl}$  до нейтральной реакции промывных вод. Полученный хлороформенный раствор сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении при температуре не выше 40 °С. К остатку после упаривания прибавляли навеску 4-нитробензальдегида (1.3–3.0 мг), растворяли в дейтерохлороформе (0.6–0.7 мл) и снимали спектр ЯМР  $^1\text{H}$  полученного раствора. Массовую долю хлорофилла *a* определяли согласно выкладкам, приведенным ниже в обсуждении результатов. Анализ повторяли 5 раз.

**Определение массовой доли основного вещества в образцах феофитина *a* и метилфеофорбида *a*.** К навеске образца феофитина *a* (10.0–15.0 мг) или метилфеофорбида *a* (5.0–8.0 мг) добавляли 4-нитробензальдегид (2.0–4.0 мг), растворяли в дейтерохлороформе (0.6–0.7 мл) и снимали спектр

ЯМР  $^1\text{H}$  полученного раствора. Массовую долю основного вещества определяли согласно выкладкам, приведенным ниже. Анализ повторяли 3 раза. Массовая доля основного вещества составила в случае феофитина *a* (**1**) –  $96 \pm 2 \%$ , в случае метилфеофорбида *a* (**2**) –  $99 \pm 2 \%$ .

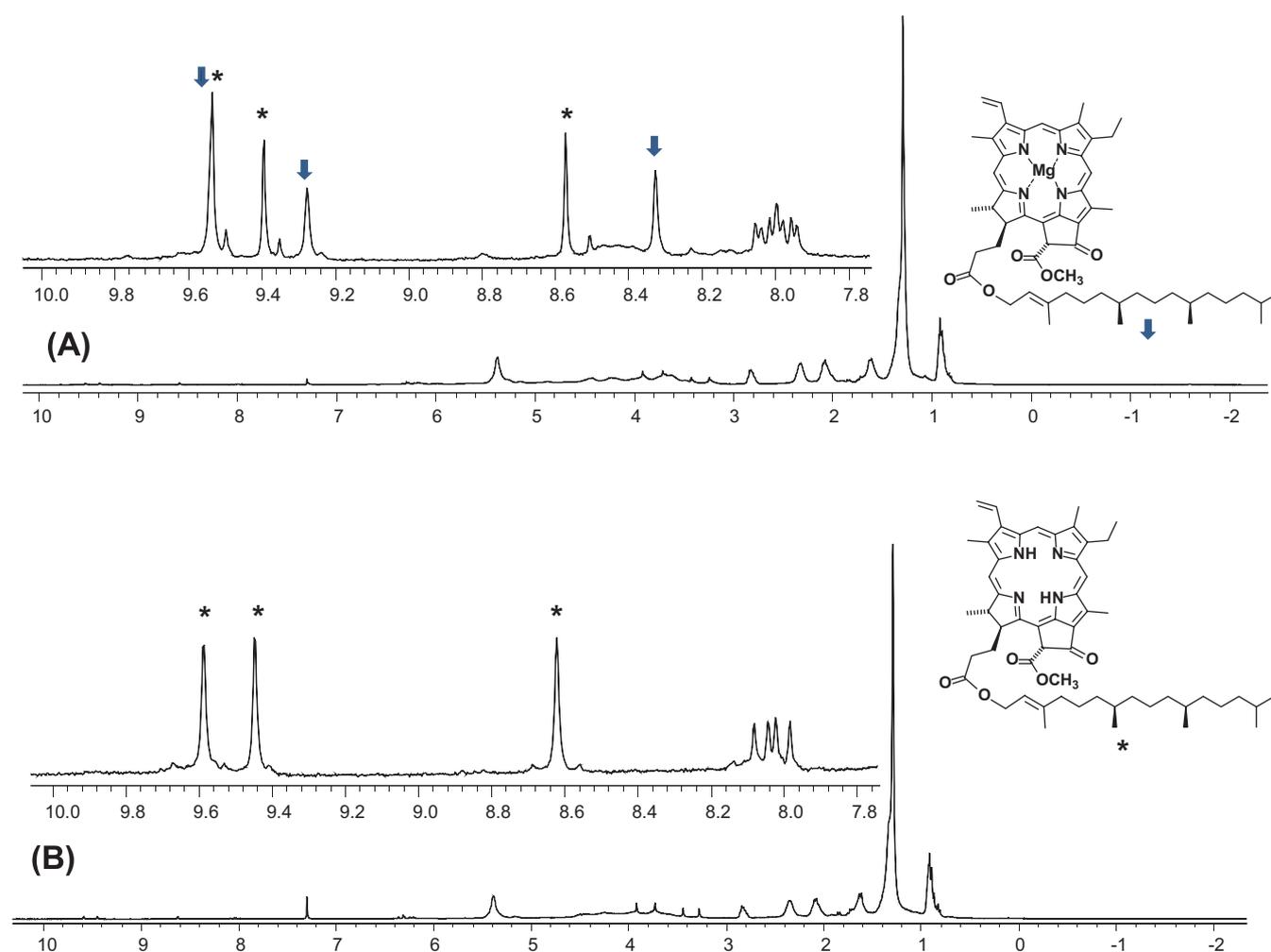
## Результаты и обсуждение

Для идентификации и количественного определения хлорофиллов и их производных при помощи спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  используют сигналы протонов этих соединений, расположенные в области от 10 до 7 м.д., главным образом, протонов в *мезо*-положениях макроцикла молекул природных хлорофинов.<sup>[37–44]</sup> Сигналы протонов других компонентов экстрактов в этой области практически не наблюдаются, в то же время сигналы различных производных хлорофилла достаточно хорошо разрешены. Для определения содержания хлорофилла *a* (**Mg-1**) требуется провести экстракцию исследуемого сырья таким образом, чтобы при исчерпывающем извлечении хлорофилла как можно меньшее его количество подверглось деградации. Для этого необходимо использовать экстрагент, который, с одной стороны, хорошо растворяет хлорофилл *a* и его производные, с другой стороны, может растворить содержащуюся в клетках спирулины воду, предотвращая возникновение границы раздела вода–органический растворитель и, тем самым, ускоряя процесс экстракции, провести его в мягких условиях. В связи с этим в качестве экстрагента нами была использована смесь

хлороформа с этиловым спиртом (5 к 1 по объему) при комнатной температуре, что позволяет провести исчерпывающую экстракцию хлорофилла *a* из исследуемого образца.

Исследование полученной таким образом суммы экстрактивных веществ методом ЯМР показывает, что, как и следовало ожидать, в ней преобладают различные липиды (Рисунок 1). Что касается тетрапиррольных пигментов, то в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  экстракта наблюдаются сигналы двух хлоринов (Рисунок 1), один из которых был идентифицирован как феофитин *a* (**1**) (ТСХ, метод смешанной пробы). Как будет показано далее, второй хлорин представляет собой хлорофилл *a* (**Mg-1**). Феофитин *a* (**1**), по-видимому, образуется при деметаллировании хлорофилла *a* (**Mg-1**) (Схема 1). Образование **1** при экстрагировании является нежелательным, так как приводит к снижению интенсивности сигналов, используемых для измерения и, тем самым, затрудняет определение массовой доли **Mg-1** в исследуемом образце. Для решения этой проблемы можно либо каким-то образом предотвратить деметаллирование хлорофилла *a*, либо целенаправленно деметаллировать хлорофилл *a* для его количественного

определения в виде феофитина *a*. Деметаллирование хлорофилла *a* в процессе экстракции происходит, по всей видимости, под действием «кислых» примесей, содержащихся в хлороформе или в самом образце. Устранение их действия потребует существенного усложнения пробоподготовки. Деметаллирование **Mg-1** легко и с количественным выходом может быть осуществлено действием разбавленной соляной кислоты на экстракт с последующим удалением хлороводорода и этилового спирта при промывании водой, что делает этот вариант более привлекательным. В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  суммы экстрактивных веществ, обработанных 10 % соляной кислотой наблюдаются только сигналы феофитина *a* (идентификация методом ТСХ и ЯМР, подробнее см. ниже). Тот факт, что при действии соляной кислоты образуется феофитин *a*, свидетельствует о том, что сигналы второго хлорина, наблюдающиеся в спектре необработанного кислотой экстракта, соответствуют *мезо*-протонам хлорофилла *a*. Помимо упрощения спектра ЯМР  $^1\text{H}$  экстракта в слабом поле, дополнительная обработка позволяет удалить те компоненты, которые плохо растворяются в дейтерированном хлороформе, что упрощает исследование методом ЯМР  $^1\text{H}$ .

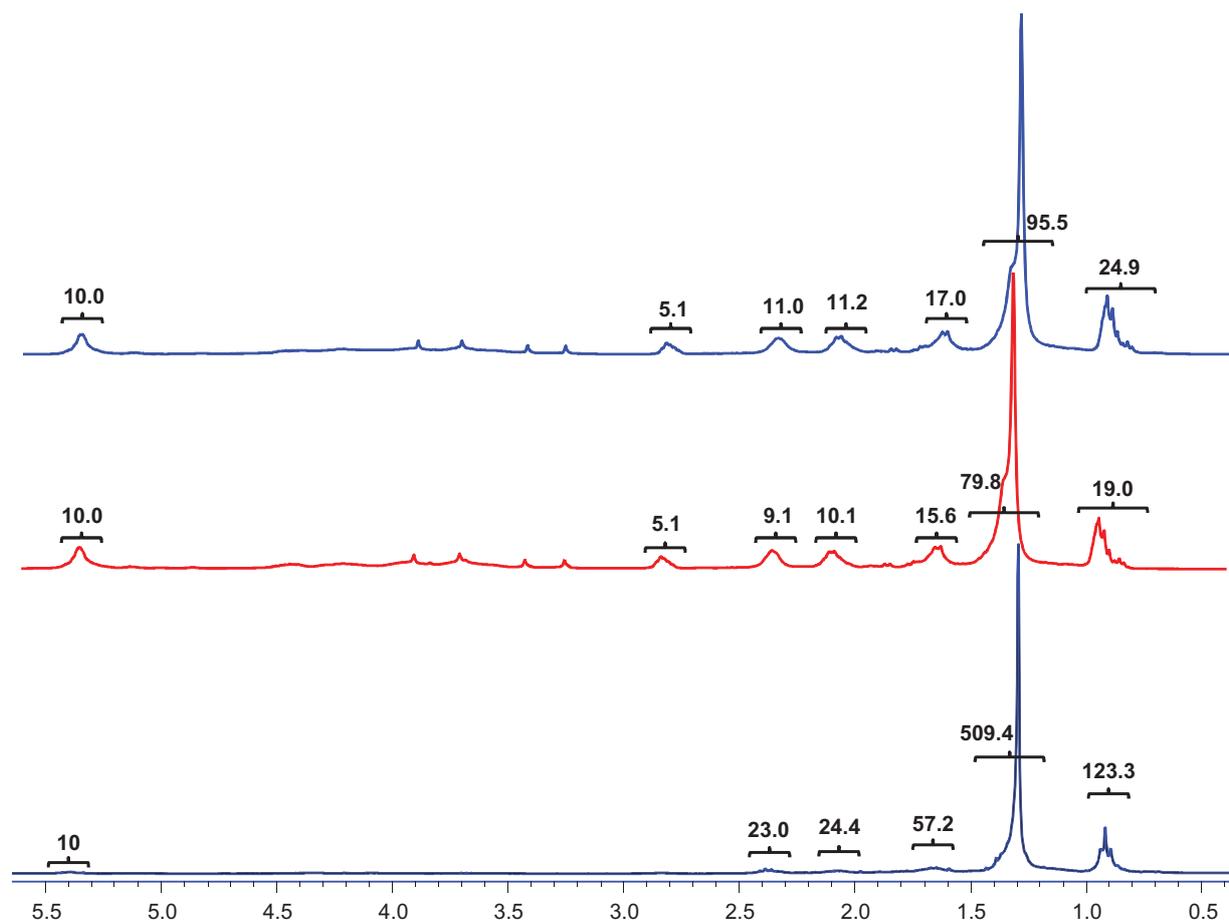


**Рисунок 1.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактивных веществ биомассы спирулины (экстрагент – смесь хлороформа с этанолом 5 к 1 по объему) (A); спектр ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактивных веществ биомассы спирулины (экстрагент – смесь хлороформа с этанолом 5 к 1 по объему) после деметаллирования хлорофилла *a* обработкой соляной кислотой (B) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 МГц).

Таким образом, добавление стадии деметаллирования является целесообразным.

Сигналы протонов феофитина *a* (1) могут быть надежно обнаружены и проинтегрированы в спектре экстрактивных веществ, полученных из 300–500 мг исследованного нами образца биомассы спирулины (для сигналов в области от 7.8 до 10.2 м.д., использованной для анализа, соотношение сигнал/шум (S/N) для различных образцов в диапазоне 650–750, что больше требуемого для анализа  $S/N > 250^{[52,53]}$ ), при меньших навесках получить достаточно хорошие для интегрирования сигналы не удастся. Как видно из Рисунка 1, наибольшую интенсивность в спектре экстракта имеют сигналы компонентов, проявляющиеся в области 1.1–1.5 м.д., значительную интенсивность имеют так же накладывающиеся друг на друга триплеты, соответствующие концевым метильным группам алкильных цепей (0.8–1.0 м.д.). Снижение интенсивности этих сигналов могло бы снизить соотношение интенсивностей сигналов с наибольшей и наименьшей интенсивностью (к последним относятся сигналы протонов феофитина *a*). Известно, что многие липиды, в отличие от хлорофилла *a*, растворимы в гексане, поэтому предварительная обработка образца гексаном может способствовать уменьшению соотношения интегральных

интенсивностей сигналов этих липидных компонентов и протонов феофитина *a* в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  экстракта. Оказалось, что полного извлечения липидов, растворимых в гексане, удается достичь при однократной экстракции при комнатной температуре (25 мл гексана на 500 мг спирулины). В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  полученного экстракта наиболее интенсивными являются сигналы, соответствующие метиленовым и метильным группам углеводородных цепей (Рисунок 2). Сигналы протонов других компонентов в областях 1.5–1.8, 2.0–2.2, 2.2–2.5, 2.7–2.9, 3.2–4.7 и 5.2–5.5 м.д. имеют очень низкую интенсивность. Это позволяет заключить, что компоненты, сигналы протонов которых наблюдаются в этих областях, гексаном практически не экстрагируются. Таким образом, имеется возможность оценить снижение интенсивности сигналов в областях 0.8–1.0 и 1.1–1.5 м.д., которое может быть достигнуто при удалении растворимых в гексане липидов путем сопоставления интенсивностей этих сигналов с интенсивностью сигналов протонов в области 5.2–5.5 м.д. (Рисунок 2). Оказалось, что удаление растворимых в гексане липидов позволяет снизить интенсивность сигналов 0.8–1.0 и 1.1–1.5 м.д. примерно на 20–30 %. Удаление хлорофлорода и этилового спирта после деметаллирования при промывании водой существенно осложняется образо-



**Рисунок 2.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 МГц, 0.5–5.5 м.д.): экстрактивных веществ биомассы спирулины (экстрагент – смесь хлороформа с этанолом 5 к 1 по объему) (синяя линия); экстрактивных веществ биомассы спирулины после удаления липидов, растворимых в гексане (экстрагент – смесь хлороформа с этанолом 5 к 1 по объему) (красная линия); липидов, растворимых в гексане (черная линия). Числа над спектрами показывают относительную интегральную интенсивность сигналов.

ванием устойчивой эмульсии. Однако при повторении аналогичных процедур экстракции, демееталлирования, удаления HCl и этанола с предварительно обработанной гексаном спирулиной образование эмульсии на последней стадии не наблюдается. По всей видимости, повышению устойчивости эмульсии способствуют липидные компоненты, удаляемые гексаном. Поэтому несмотря на то, что снижение интенсивности сигналов в областях 0.8–1.0 и 1.1–1.5 м.д. относительно невелико, предварительное удаление части липидов экстракцией гексаном существенно упрощает последующую пробоподготовку и было использовано в дальнейшем.

Известно, что при манипуляциях с растительным сырьем возможны различные реакции с участием хлорофилла *a* (окисление, конденсация и др.), учет которых необходим при его определении.<sup>[32–34]</sup> Исследование методом ТСХ показывает, что после обработки соляной кислотой в смеси содержится только одно производное хлорофилла *a* (для анализа методом ТСХ в качестве элюэтов использовали смеси CCl<sub>4</sub>-ацетон в соотношении 8 к 1, 4 к 1 и 2 к 1 по объему и смесь CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 10 к 1 по объему; использованные элюэнты позволяют выявить все хлорины, которые могут образоваться в ходе пробоподготовки). Это позволяет предположить, что в ходе всех проводимых нами манипуляций хлорофилл *a* не подвергается нежелательным превращениям, и сигналы протонов в области 7–10 м.д. соответствуют феофитину *a*. Для более надежной идентификации феофитина *a* в сумме экстрактивных веществ, полученных при реализации итоговой схемы пробоподготовки (см. ниже), было проведено выделение феофитина *a* из суммы экстрактивных веществ, полученных при небольшом (в 2–3 раза) масштабировании (колоночная хроматография экстрактивных веществ из 1 г биомассы спирулины). Спектральные характеристики полученного таким образом феофитина *a* совпадают с описанными в литературе.<sup>[35]</sup>

Для количественного определения содержания феофитина *a* наиболее удобны те сигналы, которые не перекрываются с сигналами других компонентов экстракта. Таковыми являются только сигналы протонов в положениях 5, 10 и 20 молекулы феофитина *a* (1). Помимо сигналов феофитина *a* в спектре экстракта наблюдаются сигналы его стереоизомера по положению 13(2) – феофитина *a'* (1'). Поскольку оба диастереомера образуются из хлорофилла *a*, для расчета его массовой доли в биомассе спирулины была взята суммарная интегральная интенсивность сигналов феофитина *a* и *a'*.

Для определения массовой доли хлорофилла *a* нами был использован метод внутреннего стандарта (аналитический сигнал – интегральная интенсивность сигналов протонов в спектре ЯМР <sup>1</sup>H). Выбор соединения для использования в качестве внутреннего стандарта был осуществлен исходя из следующих соображений. В спектре ЯМР <sup>1</sup>H внутреннего стандарта должно быть относительно небольшое количество сигналов, отличающихся по химическому сдвигу от сигналов анализируемого соединения настолько, чтобы все или большую часть сигналов протонов внутреннего стандарта можно было проинтегрировать отдельно от сигналов определяемого соединения.

Вещество, используемое в качестве внутреннего стандарта, должно быть инертно по отношению к компонентам экстракта (не должно происходить не только химических реакций, но и значительных по энергии межмолекулярных взаимодействий). Молекулярная масса внутреннего стандарта должна быть достаточно велика для того, чтобы можно было брать навески внутреннего стандарта одного порядка (по молям) с предполагаемым количеством феофитина *a* в пробе (не менее 150 г/моль), а его растворимость в дейтерохлороформе была сопоставима с растворимостью феофитина *a*. Тогда разница в интегральной интенсивности сигналов протонов определяемого соединения и внутреннего стандарта будет не более, чем в 4–5 раз. Необходимо, чтобы соединение, используемое в качестве внутреннего стандарта, содержало не менее 99 % основного вещества (то есть было доступно в квалификации «хч» или аналогичной в других классификациях). Желательно, чтобы оно было твердым при обычных условиях с достаточно большой температурой плавления (для удобства взвешивания). Всем этим критериям соответствует 4-нитробензальдегид, который и был использован в качестве внутреннего стандарта в настоящей работе. При молярной массе 151.12 г/моль все сигналы в его спектре ЯМР <sup>1</sup>H находятся в области 8.0–10.2 м.д., причем два из трех его сигналов не перекрываются с сигналами компонентов исследуемой смеси, в том числе феофитина *a* (для интегрирования использовали сигналы протона альдегидной группы и сигнал протонов ароматического кольца в *орто*-положении по отношению к нитрогруппе, Рисунок 3).

Метод внутреннего стандарта применительно к определению массовой доли хлорофилла *a* в биомассе спирулины реализован исходя из следующих выкладок. Массовая доля хлорофилла в спирулине ( $\omega(chl)$ ):

$$\omega(chl) = \frac{m(chl)}{m(sp)}$$

$$m(chl) = n(chl)M(chl) = n(ph)M(chl),$$

где  $\omega(chl)$  – массовая доля хлорофилла *a* в биомассе спирулины;  $m(chl)$  – масса хлорофилла *a*;  $M(chl)$  – молярная масса хлорофилла *a*;  $m(sp)$  – масса образца спирулины;  $n(chl)$  – количество молей хлорофилла *a*;  $n(ph)$  – количество молей феофитина *a* в экстракте.

Зная массу 4-нитробензальдегида, использованного в качестве внутреннего стандарта, по соотношению интегральных интенсивностей сигналов протонов 4-нитробензальдегида и феофитина *a* можно вычислить количество молей феофитина *a*:

$$n(ph) = \frac{I(ph)}{I(nb)} n(nb) = \frac{I(ph)m(nb)}{I(nb)M(nb)},$$

где  $I(ph)$  – интегральная интенсивность сигнала феофитина *a*, приходящаяся на 1 протон;  $I(nb)$  – интегральная интенсивность сигнала 4-нитробензальдегида, приходящаяся на 1 протон;  $n(nb)$  – количество молей 4-нитробензальдегида;  $m(nb)$  – масса 4-нитробензальдегида;  $M(nb)$  – молярная масса 4-нитробензальдегида.

Отсюда:

$$\omega(chl) = \frac{I(ph)m(nb)M(chl)}{I(nb)M(nb)m(sp)} = \frac{M(chl)}{M(nb)} \cdot \frac{I(ph)m(nb)}{I(nb)m(sp)},$$

где  $M(nb)$  – молярная масса 4-нитробензальдегида (в мг/ммоль);  $M(chl)$  – молярная масса хлорофилла *a* (в мг/ммоль);  $m(nb)$  – масса 4-нитробензальдегида (в мг);  $m(sp)$  – масса образца спирулины (в мг);  $I(ph)$  – интегральная интенсивность сигнала протона феофитина *a*, приходящаяся на 1 протон, безразмерная величина;  $I(nb)$  – интегральная интенсивность сигнала протона 4-нитробензальдегида, безразмерная величина.

Пример вычисления содержания хлорофилла *a* в биомассе спирулины представлен на Рисунке 3. Для определения  $I(ph)/I(nb)$  были использованы интегральные интенсивности сигналов мезо-протонов феофитина *a*, сигналы протона альдегидной группы и сигнал протонов ароматического кольца в орто-положении по отношению к нитрогруппе 4-нитробензальдегида. Попарное вычисление соотношений интенсивностей этих сигналов, приходящихся на один протон, позволяет из одного спектра получить шесть значений массовой доли хлорофилла *a*  $\omega(chl)$ , что повышает достоверность определения.

Таким образом, итоговый алгоритм определения массовой доли хлорофилла *a* в биомассе спирулины

состоит из следующих этапов.

1) Предварительная экстракция части липидных компонентов гексаном.

2) Экстракция хлорофилла *a* смесью хлороформа с этиловым спиртом (5 к 1 по объему).

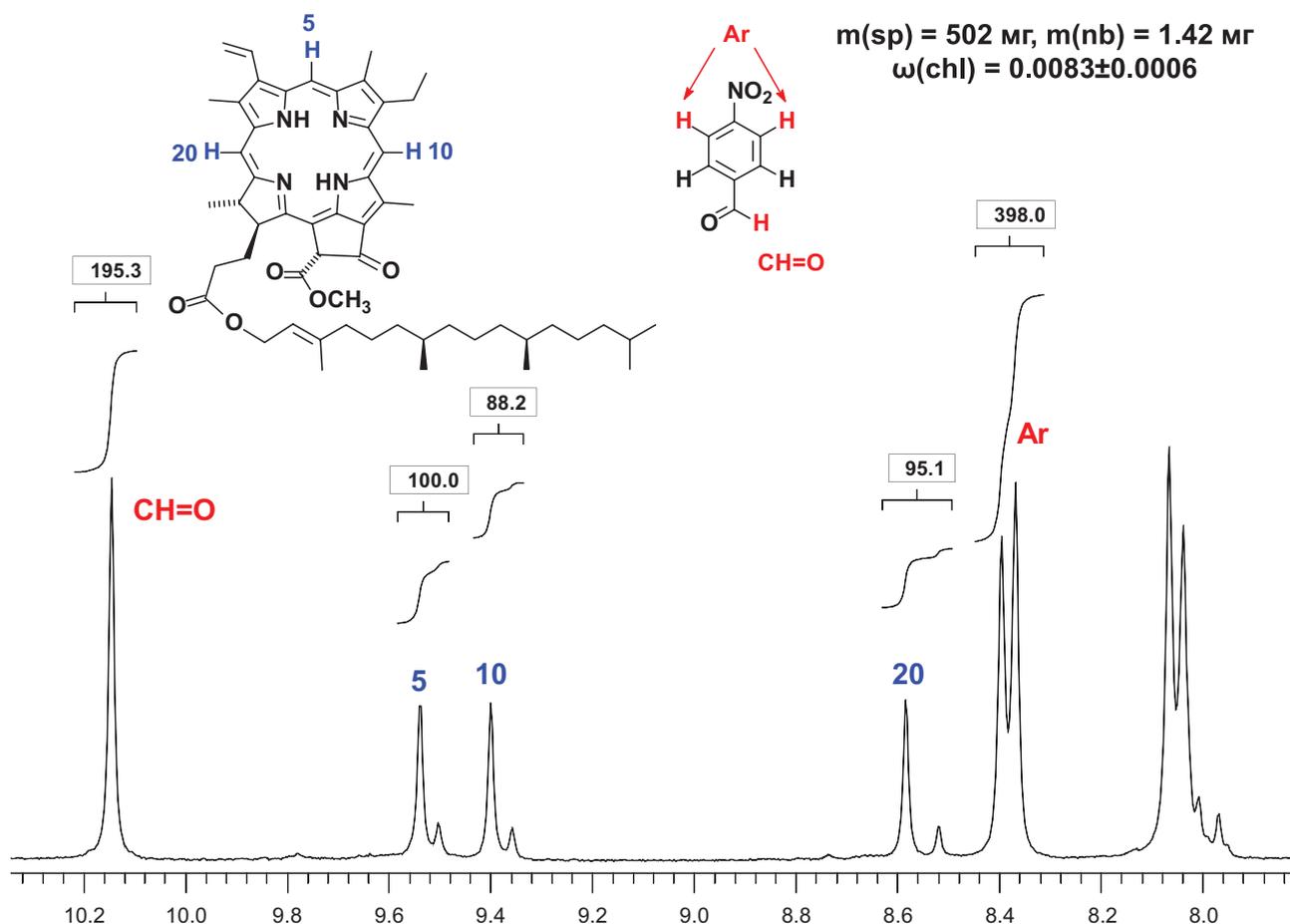
3) Деметаллирование хлорофилла *a* действием соляной кислоты.

4) Удаление соляной кислоты и этилового спирта промыванием водой, сушка полученного хлороформенного раствора экстрактивных веществ, удаление хлороформа упариванием при пониженном давлении.

5) Добавление к остатку после упаривания навески 4-нитробензальдегида, растворение полученной смеси в дейтерированном хлороформе.

6) Получение спектра ЯМР  $^1\text{H}$ , интегрирование сигналов (см. Рисунок 3), вычисление массовой доли хлорофилла *a*. Определение массовой доли хлорофилла *a* в исследованном образце биомассы спирулины, выполненное согласно описанному выше алгоритму дает,  $\omega(chl) = 0.0081 \pm 0.0005$  (или  $\omega(chl) = 0.81 \pm 0.05\%$ ) (результаты анализа 5 проб).

Как было отмечено выше, нижний предел содержания хлорофилла *a* в биомассе спирулины можно оценить по выходам различных соединений, таких как феофитин *a*, хлорин  $e_6$ , метилфеофорбид *a* и др., при препаративном получении из спирулины.<sup>[32–36]</sup> Исследованная в настоящей работе спирулина была использована нами



**Рисунок 3.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактивных веществ биомассы спирулины (502 мг), полученных согласно итоговой схеме пробоподготовки, с навеской 4-нитробензальдегида (1.42 мг) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 МГц, область 7.8–10.2 м.д.).

для получения феофитина *a* (**1**) (согласно<sup>[35]</sup>) и метилфеофорбида *a* (**2**) (согласно<sup>[32]</sup>). Феофитин *a* получен при подкислении сконцентрированного этанольного экстракта. Согласно данным ТСХ в нем содержатся различные примеси, как окрашенные, так и неокрашенные, однако оценка массовой доли основного вещества показывает, что этих примесей немного. Определение массовой доли феофитина *a* в осадке, выпадающем при подкислении этанольного экстракта, проведено методом внутреннего стандарта аналогично определению массовой доли хлорофилла *a* в спирулине:

$$\omega(ph) = \frac{I(ph)m(nb)M(ph)}{I(nb)M(nb)m(ph)} = \frac{M(ph)}{M(nb)} \cdot \frac{I(ph)m(nb)}{I(nb)m(ph)}$$

где  $I(ph)$  – интегральная интенсивность сигнала феофитина *a*, приходящаяся на 1 протон;  $I(nb)$  – интегральная интенсивность сигнала 4-нитробензальдегида, приходящаяся на 1 протон;  $n(nb)$  – количество молей 4-нитробензальдегида;  $m(nb)$  – масса 4-нитробензальдегида;  $M(nb)$  – молярная масса 4-нитробензальдегида;  $M(ph)$  – молярная масса феофитина *a*;  $m(ph)$  – масса навески исследованного феофитина.

Массовая доля основного вещества, характеризующая чистоту феофитина *a*, составила  $\omega(ph) = 0.96 \pm 0.02$  (или  $\omega(ph) = 96 \pm 2$  %) (для 3 проб). Аналогичные измерения для метилфеофорбида *a* (**2**) (получен при действии на феофитин *a* метанола в присутствии серной кислоты, Схема 1) дают содержание основного вещества, близкое к 100 % в пределах погрешности ( $99 \pm 2$  %). Из 100 г исследованной в настоящей работе спирулины удается получить 760–790 мг феофитина *a* и 520–540 мг метилфеофорбида *a*, что соответствует массовой доле хлорофилла *a* 0.75–0.79 %. Учитывая неполноту извлечения хлорофилла при препаративном получении феофитина *a* и метилфеофорбида *a*, эти данные хорошо согласуются с результатами анализа.

## Заклучение

Таким образом, в настоящей работе разработана методика количественного определения содержания хлорофилла *a* в биомассе спирулины с использованием спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H. Предложенная методика может быть адаптирована для других видов сырья, содержащих хлорофилл *a* или его производные.

**Благодарности.** Спектры ЯМР <sup>1</sup>H были получены на оборудовании ЦКП «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар).

## Список литературы

### References

1. Imran M., Muhammad M., Kaleem Qureshi A.K., Khan M.A., Tariq M. *Biosensors* **2018**, *8*, 95.
2. Abrahamse H., Hamblin M.R. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347–364.

3. Van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. *Cancers* **2017**, *9*, 19.
4. Ormond A.B., Freeman H.S. *Materials* **2013**, *6*, 817–840.
5. Hamblin M.R. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 67–73.
6. Kustov A.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. *Dyes Pigm.* **2020**, *173*, 107948.
7. Osati S., Ali H., Guérin B., van Lier J.E. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2017**, *21*, 701–730.
8. Glowacka-Sobotta A., Wrotyński M., Kryjewski M., Sobotta L., Mielcarek J. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1–10.
9. Aggarwal A., Samaroo D., Jovanovic I.R., Singh S., Tuz M.P., Mackiewicz M.R. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 741–765.
10. Singh S., Aggarwal A., Bhupathiraju N.V.S.D.K., Arianna G., Tiwari K., Drain C.M. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10261–10306.
11. Lovell J.F., Liu T.W.B., Chen J., Zheng G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2839–2857.
12. Tkachenko N.V., Tauber A.Y., Grandell D., Hynninen P.H., Lemmetyinen H. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3646–3656.
13. Boxer S.G., Closs G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5406–5408.
14. Wasielewski M.R., Svec W.A., Cope B.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1961–1962.
15. Boxer S.G., Bucks R.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1883–1885.
16. Liddell P.A., Barrett D., Makings L.R., Pessiki P.J., Gust D., Moore T.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5350–5352.
17. Wiederrecht G.P., Niemczyk M.P., Svec W.A., Wasielewski M.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 81–88.
18. Kelley R.F., Tauber M.J., Wasielewski M.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4779–4791.
19. Panda M.K., Ladomenou K., Coutsolelos A.G. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2601–2627.
20. Amao Y., Komori T. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 843–847.
21. Amao Y., Yamada Y. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1561–1565.
22. Alekseev A.S., Tkachenko N.V., Tauber A.Y., Hynninen P.H., Osterbacka R., Stubb H., Lemmetyinen H. *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 243–251.
23. Gryglik D., Miller J.S., Ledakowicz S. *Solar Energy* **2004**, *77*, 615–623.
24. Taniguchi M., Lindsey J.S. *Chem. Rev.* **2017**, *117*(2), 344–355.
25. Lindsey J.S. *Chem. Rev.* **2015**, *115*(13), 6534–6620.
26. Montforts F.-P., Gerlach B., Höper F. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 327–347.
27. Ma L., Dolphin D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2501–2510.
28. Gerlach B., Brantley S.E., Smith K.M. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2314–2320.
29. Ma L., Dolphin D. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 195–202.
30. Ma L., Dolphin D. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 313–316.
31. Tamiaki H., Kouraba M., Takeda K., Kondo Sh., Tanikaga R. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 2101–2111.
32. *Porphyrins: Structure, Properties and Synthesis* (Enikolopyan N.S., Ed.) Moscow: Nauka, **1985**. 334 p. (in Russ.). [*Порфирины: структура, свойства, синтез* (Ениколопян Н.С., ред.) М.: Наука, **1985**. 334 с.]
33. Gurinovich G.P., Sevchenko A.N., Solov'ev K.N. *Spectroscopy of Chlorophyll and Its Related Compounds*. Minsk, **1968**. 518 p. (in Russ.) [Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. *Спектроскопия хлорофилла и родственных ему соединений*. Минск: Наука и техника, **1968**. 518 с.]
34. Belykh D.V. *Synthesis of Polyfunctional Chlorins Based on Methylpheophorbide a*. Syktyvkar, **2012**. 164 p. (in Russ.) [Белых Д.В. *Синтез полифункциональных хлоринов на основе метилфеофорбида a*. Сыктывкар: КомиНЦ УрО РАН, **2012**. 164 с.]
35. Khudyaeva I.S., Shevchenko O.G., Belykh D.V. *Russ. Chem. Bull.* **2020**, *69*, 742–750.

36. Karimov D.R., Makarov V.V., Kruchin S.O., Berezin D.B., Cmirnova N.L., Berezin M.B., Zheltova E.I., Strel'nikov A.I., Kustov A.V. *Chemistry of Plant Raw Materials [Khim. Rast. Syr'ya]* **2014**, 189–196 (in Russ.).
37. Valverde J., This H. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 314–320.
38. Mannina L., Segre A. *Grasas y Aceites* **2002**, 53(1), 22–33.
39. Jafari T., Durian G., Rahikainen M., Kortensniemi M., Kangasjärvi S., Sinkkonen J. *Phytochem. Lett.* **2017**, 22, 13–20.
40. Fujii R., Kita M., Doe M., Iinuma Y., Oka N., Takaesu Y., Taira T., Iha M., Mizoguchi T., Cogdell R.J., Hashimoto H. *Photosynth. Res.* **2012**, 111, 165–172.
41. Guadagno C.R., Della Greca M., De Santo A.V., D'Ambrosio N. *Photosynth. Res.* **2013**, 115, 115–122.
42. Sobolev A.P., Brosio E., Gianferri R., Segre A.L. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, 625–638.
43. Pollesello P., Toffanin R., Erikson O., Kilpeläinen I., Hynninen P.H., Paoletti S., Saris N.-E.L. *Anal. Biochem.* **1993**, 214, 238–244.
44. Schoefs B. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 217–226.
45. Mal'shakova M.V., Pylina Y.I., Belykh D.V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 2064–2069.
46. Belykh D.V., Kozlov A.S., Pylina Y.I., Khudyaeva I.S., Benditkis A.S., Krasnovsky A.A. *Macroheterocycles* **2019**, 12, 68–74.
47. Pylina Y.I., Startseva O.M., Rasova E.E., Belykh D.V. *Macroheterocycles* **2019**, 12, 165–170.
48. Belykh D.V., Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Rocheva T.K., Khudyaeva I.S., Buravlev E.V., Shchukina O.V., Chukicheva I.Yu. *Molecules* **2018**, 23, 1718.
49. Kustov A.V., Belykh D.V., Smirnova N.L., Venediktov E.A., Kudayarova T.V., Kruchin S.O., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. *Dyes Pigm.* **2018**, 149, 553–559.
50. Otvagin V.F., Nyuchev A.V., Kuzmina N.S., Grishin I.D., Gavryushin A.E., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Belykh D.V., Peskova N.N., Shilyagina N.Yu., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 144, 740–750.
51. Nyuchev A.V., Otvagin V.F., Gavryushin A.E., Romanenko Y.I., Koifman O.I., Belykh D.V., Schmalz H.-G., Fedorov A.Yu. *Synthesis* **2015**, 47, 3717–3726.
52. Santosh K.Bh., Raja R. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 35, 5–26.
53. Holzgrabe U. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, 57, 229–240.

Received 10.06.2020

Accepted 17.07.2020