J. Fd Hyg. Safety 20(3), 141–146 (2005)

클로렐라 및 스피루리나제품에 함유된 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 동시분석법에 관한 연구

이영자 · 김소희 · 김진숙† · 한정아 · 서해점 · 임효정 · 최수영
서울지방식품의약품안전청

Studies on Simultaneous Determination of Chlorophyll a and b, Pheophorbide a, and β-Carotene in Chlorella and Spirulina Products

Young Ja Lee, So Hee Kim, Jin-Sook Kim†, Jeong A Han, Hae Jeom Seo, Hyo Jeong Lim, and Soo Young Choi
Seoul Regional Food and Drug Administration
(Received March 9, 2005; Accepted September 5, 2005)

ABSTRACT – A simple and sensitive analysis method based on reverse phase (RP) HPLC with UV detector was developed for simultaneous determination of chlorophyll a and b, pheophorbide a and β-carotene in Chlorella and Spirulina products. For added concentration (50 μg/ml) of chlorophyll a and b, pheophorbide a and β-carotene, recoveries of those were 70.3, 71.6, 60.1 and 90.5%, respectively, with relative standard deviations of 2.8, 6.0, 10.6 and 10.4%. Limit of detection and quantification had ranges of 0.1~1.0 μg/ml and 0.2~2.0 μg/ml, respectively. Calibration curve was linear with correlation coefficient of 0.995 for chlorophyll a and b, pheophorbide a and β-carotene. Results of simultaneous determination in Chlorella and Spirulina products were showed ranges of 121.9~543.0 μg/ml for chlorophyll a, 0.6~160.0 μg/ml for chlorophyll b, 19.2~60.3 μg/ml for pheophorbide a and 383.6~1713.7 μg/ml for β-carotene, respectively. Chlorophyll b contents in Chlorella products were detected above 30 times level to those in Spirulina products. β-Carotene contents in Spirulina products were detected 2.7 times level to those in Chlorella products.

Key words: chlorophyll a and b, pheophorbide a, β-carotene, Chlorella, Spirulina

근래 건강기능식품에 대한 소비자들의 견해를 묻는 설문조사에서, 조사대상자 중 90% 이상이 식습관은 건강을 유지하기 위한 가장 중요한 요인이며, 질병은 육체적인 운동과 식습관 조절로써 치료될 수 있다고 믿는 것으로 나타났다[1]. 그리고 응답자중 절반이 건강기능식품을 사용한 경험이 있으며, 이들 중 68%가 건강기능 식품의 효과를 믿는다는 생각을 가지고 있는 것이 확인되었다[2]. 기능성 식품이라는 용어는 1980년대 일본에서 식품의 생리적인 기능성을 강조하기 위해 사용하기 시작되었으며. 일본에서는 1991년에 Food for Specific Health Use(FOSHU) Act가, 미국에서는 1994년에 Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)가 각각 제정되었다[3]. 우리나라에서는 1989년 보건사회부의 식품공전 내에 건강보조식품을 추가하였고, 2002년 건강기능식품관련법률[4]이 제정되었으며, 동 법 제2조 규정에 의하면 "건강기능식품"이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가지는 원료의 성분을 사용하여 정제 · 캡슐 · 분말 · 과립 · 액상 · 환 등의 형태로 제조 · 가공한 식품으로 정의하고 있다. 또한, 현행 건강기능식품공전에는 기능성식품의 유형별에 따라 32개 품목에 대한 기준·규격이 각각 수재되어 있으나 이들의 안전성확보를 위해서는 현행 기준 · 규격 및 시험방법에 대한 합리적이고 보편 · 타당성 있는 보완 · 개선이 선행되어야 한다고 본다.

특히, 기능성식품 중 조류식품인 클로렐라 및 스피루리나 제품은 고단백질 함량과 지질의 축적능력으로 인해 미래의 식량자원으로 평가되어 왔다.[5,6] 이들 제품에는 헤모글로빈과 유사한 구조를 가지며 구조식 내에 있는 마그네슘의 금속치환 성질에 의한 중금속 배출능력과 자외선에 대한 생체막 보호 및 항상성 유지에 도움을 주는 엽록소관련 화합물 및 지용성 항산화제로 널리 알려진 카로틴이 풍부하게 함유되어 있어 이들 화합물에 대한 관심이 증가하고 있다[7]. 최근에는 가공된 완두콩[8], 키위류[9] 그리고 차류[10] 등으로부터 유래한 엽록소관련 화합물과 카로틴에 대한 각각의 HPLC

†Author to whom correspondence should be addressed.

분석법이 보고되고 있으나, 현행 클로렐라 및 스피루리나제품의 성분·규격 중 엽록소 a, b 및 페오포르바이드에 대한 확인시험 및 함량시험방법은 흡광도법 및 TLC 법 등으로 규정되어 있어 각각의 전처리가 매우 복잡하고 분석소요시간이 장시간 소요되는 단점이 있어 HPLC 등 기기분석법을 이용한 동시분석방법 확립이 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 건강기능식품 중 클로렐라 및 스피루리나제품의 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 정량을 위한 HPLC 동시분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 시료는 2004년 1월부터 2004년 10월까지 서울시내 백화점 및 인터넷 쇼핑몰에서 유통되는 클로렐라 및 스피루리나제품을 각각 4종씩 구매하여 사용하였다. 분석에 이용한 클로렐라제품은 모두 원말 97~100% 함유한 제품이었으며, 스피루리나제품은 3종의 90~100% 원말이 함유된 제품과 1종의 원말 51% 함유된 제품을 이용하였다.

분석에 사용한 시약은 Wako사의 특급시약을 사용하였고, HPLC분석을 위한 이동상제조에 사용한 용매는 Fisher사의 HPLC용을 사용하였다. 표준품으로 사용한 엽록소 a(97%), 엽록소 b(95%), 페오포르바이드 a(93%)는 Wako사 제품을, β-carotene(95%)은 Sigma사 제품을 사용하였다.

표준용액 제조

엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴 표준품들을 정확히 칭량하고 아세톤을 가하여 각각 500 μg/ml이 되도록 조제한 후, 이를 실험에 알맞은 농도로 희석하여 사용하였다.

검출·정량한계 및 회수율 검토

검량 곡선은 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 개별 표준용액을 엽록소 a는 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400 μg/ml로, 엽록소 b는 0.08, 0.15, 0.75, 1.5, 7.5, 15, 75, 150 μg/ml로, 페오포르바이드 a는 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100 μg/ml, 그리고 β-카로틴의 경우 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml의 농도로 각각 제조하여 검량곡선을 작성하였다. 이 농도범위는 클로렐라 및 스피루리나제품에 함유된 각 화합물의 농도를 고려하여 결정하였다.

검출한계와 정량한계는 각 화합물의 5.0~7.5 μg/ml 농도의 표준용액으로 분석하여 얻은 크로마토그램을 기초로 Morrison[11]의 방법에 따라 산출하였다.

회수율은 조제한 50 μg/ml 농도의 혼합 표준용액 1 ml을 엽록소와 카로틴을 함유하지 않은 제품 100 mg에 첨가하였으며, 최종 10 ml이 되도록 아세톤을 첨가하여 시료와 같은 추출과정을 거쳐 표준용액의 첨가된 농도와 분석된 농도를 비교하여 측정하였다.

엽록소 및 카로틴 추출방법 검토

클로렐라 및 스피루리나제품은 유발을 이용하여 마쇄하고, 마쇄된 시료 100 mg을 각각 취하여 10 ml의 아세톤을 첨가한 다음 20분간 초음파세척기로 추출하고 저온(4°C)에서 하룻밤 방치하였다. 방치하여 추출한 시료액을 원심분리(3,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 상층액을 취한 후 침전물에 10 ml의 아세톤을 넣고 잘 혼합한 다음 동일한 조건으로 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액은 모두 합하여 질소가스를 이용해 아세톤을 제거하였다. 잔류물에 1 ml의 아세톤을 가한 다음 0.45 μm Nylon filter(Technochroma, India)로 여과하여 HPLC 분석용 시험용액으로 하였다.

HPLC 분석방법 검토

본 연구에서는 HPLC로서 HP1100(Agilent, USA)을 사용하였고, HPLC로 분석 시 측정 파장은 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴을 동시에 측정할 수 있는 440 nm에서 측정하였으며 분석조건은 Table 1과 같다[12].

Table 1. HPLC analytical condition of chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a, and β-carotene

Column	Capcellpak C_{18} 120Å, 5 μm 4.6 mm I.D. × 250 mm		
Flow rate	0.8 ml/min		
Detector	UV 440 nm		
Injection vol.	20 μl		
Mobile phase	A-Methanol : 0.5 M Ammonium acetate (80:20) B-Methanol : Acetone (70:30)		
Gradient program	Time(min)	A(%)	B(%)
	Initial	100	0
	5	75	25
	10	50	50
	15	25	75
	35	0	100
	45	0	100
	50	100	0
	60	100	0

결과 및 고찰

검량곡선 검토 결과

일정 농도로 제조한 표준용액은 RP-HPLC로 분리하여 분광검출기로 분석하였으며 혼합 표준용액의 동시분석을 위한 최적조건을 확립하였다(Fig. 1). 확립된 분석조건에 따라 엽

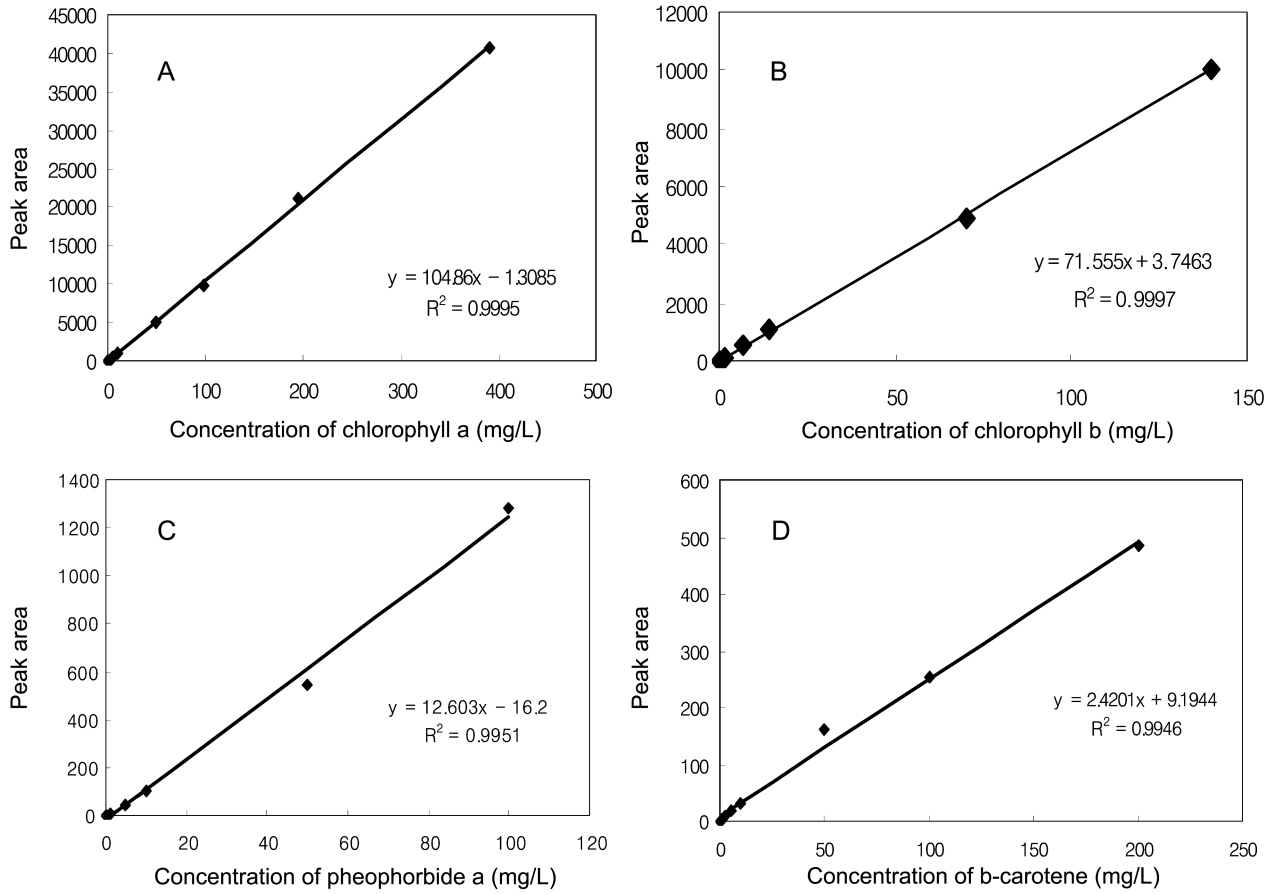

Fig. 1. Calibration curves of chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), pheophorbide a (C) and β-carotene (D).

록소 a, b, 페오포르바이드 a, 그리고 β-카로틴의 농도에 따른 검량곡선은 Fig. 2에 나타내었다. 검량곡선에서 볼 수 있는 바와 같이 각 화합물의 농도비와 면적비는 검량농도 범위 내에서 일직선 관계가 있음을 알 수 있으며, 상관계수는 모든 화합물이 0.995보다 큰 값을 나타내므로 분석에 적합함을 알 수 있었다.

검출 · 정량한계 및 회수율 검토 결과

동일농도에서 본 연구의 검출조건에 대한 감도는 엽록소 a가 네 가지 화합물 중 가장 높은 것으로 나타났다. 그 외에는 엽록소 b와 β-카로틴 그리고 페오포르바이드 a 순이었다.

Morrison의 방법에 따라 산출한 바에 의하면 엽록소관련 화합물과 β-카로틴의 검출한계(limits of detection; LOD)는 0.1~1.0 μg/ml이었으며, 정량한계(limits of quantitation; LOQ)는 0.2~2.0 μg/ml인 것으로 나타났다. 네 가지 표준물질의 정량범위(calibration range)는 Table 2와 같았다.

엽록소와 카로틴을 함유하고 있지 않은 시료에 일정 농도의 혼합 표준용액을 첨가한 다음 이들 물질에 대한 회수율을 측정하였을 때 평균 73%의 회수율을 나타내었으며, β-카로틴이 90.5%로 가장 높았고, 페오포르바이드 a가 가장 낮은 60.1%인 것이 확인되었다. 상대표준편차(relative standard deviation; RSD)는 2.8~10.6%였으며, 분석한 화합물 중 엽록소 a가 가장 낮은 상대표준편차를 보였다(Table 3).

Table 2. Calibration range, detection limit, quantification limit of chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a, and β-carotene

Substance	Calibration range (μg/ml)	Detection limit (μg/ml)	Quantification limit (μg/ml)
Chlorophyll a	0.2-400	0.1	0.2
Chlorophyll b	0.2-150	0.1	0.2
Pheophorbide a	1.0-100	0.5	1.0
β-carotene	2.0-200	1.0	2.0

클로렐라 및 스피루리나제품의 아세톤 추출

건강기능성식품으로 국내 유통되고 있는 클로렐라 및 스

Table 3. Recovery of chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a and β-carotene in known concentration

	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Pheophorbide a	β-carotene
Mean±SD	70.3±1.94	71.6±4.32	60.1±6.36	90.5±9.47
RSD(%)	2.76	6.03	10.59	10.46

피루리나제품에 대한 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 HPLC 분석용 시료량은 동시분석하는 네 가지 화합물 중 가장 낮은 농도로 함유되어 있는 페오포르바이드 a를 기준으로 하여 시료 100 mg으로 하였다. 분석하고자 하는 엽록소 및 카로틴 화합물들은 소수성기를 포함한 화합물로서, 광합성을 하는 생물체에 존재하는 색소들이다. 그러므로 한 가지 혹은 혼합된 유기용매를 이용하여 추출하는 것으로 보고되어 있으며, 이때 주로 사용되는 용매로는 아세톤, 메탄올, 에탄올을 들 수 있다. 아세톤을 단일추출용매로 이용할 경우 식물성 세포막을 파괴하기 어려운 점을 들어 최적의 효과를 얻기 어렵다는 보고가 있다[13]. 그러나 건강기능성 식품으로 이용되는 클로렐라제품의 경우 세포막 투과성 향상을 위한 공정이 포함되어 아세톤만으로 용이하게 추출할 수 있으므로[14], 본 실험에서는 클로렐라 및 스피루리나제품의 추출용매로서 아세톤을 선택하여 이용하였다. 8 종류의

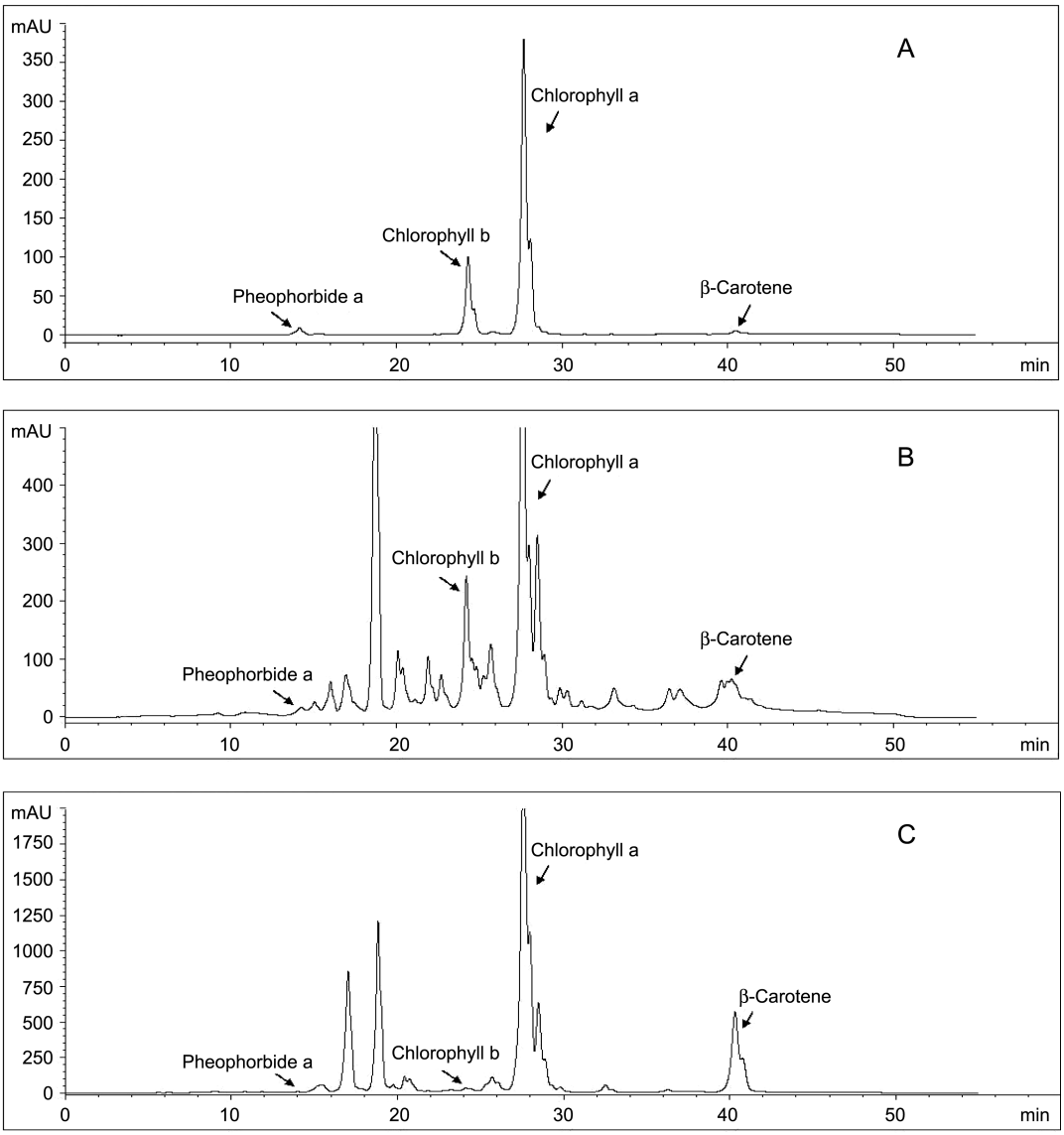

Fig. 2. HPLC profile of acetone extract from standard mixture (chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a and β-carotene) (A), Chlorella (B) and Spirulina (C) products. Detection was carried out at 440 nm. Chromatographic conditions are described in Table 1.

찻잎을 대상으로 실험한 연구에서도 아세톤과 물로 추출 후 HPLC/PDA로 분석한 결과 엽록소관련 화합물과 카로틴의 함유량이 물을 사용한 추출물보다 아세톤으로 추출한 경우 추출물 함량이 실험한 모든 시료에서 높다는 것을 확인할 수 있었으며, 일부 차종의 경우 물로 추출한 추출물에서는 확인되지 않았던 화합물도 아세톤으로 추출한 경우 검출된 것으로 보고되어 있다[10].

클로렐라 및 스피루리나제품의 RP-HPLC 분석결과

클로렐라 및 스피루리나제품의 아세톤 추출물을 분석한 결과 역상 HPLC 크로마토그램 상에서 두 제품의 크로마토그램은 거의 유사한 것으로 확인되었으나, 엽록소 b와 β-카로틴의 함유량 차이가 큰 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 역상 HPLC 크로마토그램으로부터 네 가지 화합물을 확인할 수 있었으나, 정제과정을 거치지 않은 추출물에서의 분석 결과인 점을 고려하여 제품으로부터 분석된 각 피크를 HPLC/PDA를 이용하여 표준용액에서 나온 크로마토그램과 비교하였으며, 각각 동일한 피크인 것을 확인할 수 있었다(not shown). 엽록소와 카로틴의 화합물을 HPLC로 분석하는 방법은 1980년대 후반부터 진행이 되었으나[15], 이들 두 화합물을 동시에 분석하는 실험은 최근 들어 채소와 과일류 [8,10,16] 등에서 보고되고 있다.

HPLC 동시분석결과 클로렐라제품에서 엽록소 a는 232.1~543.0, 엽록소 b는 75.8~160.0, 페오포르바이드 a는 37.2~60.3, 그리고 β-카로틴의 경우 383.6~709.4 mg/100g으로 나타났다. 그리고 원말 90~100%인 스피루리나제품들의 경우 엽록소 a는 121.9~503.6, 엽록소 b는 0.6~15.5, 페오포르바이드 a는 19.2~30.3 그리고 β-카로틴에서는 865.2~1713.7 mg/100 g으로 나타났다.

4종의 클로렐라제품(A~D)에 대해 4항목을 분석한 결과 제품간에 1.6~2.3배 차이가 나타나는 것을 볼 수 있었으나, 스피루리나제품(E~H)의 경우는 2~25배 차이를 보여 스피루리나제품에 비해 클로렐라제품의 제품 간 차이가 적은 것으로 나타났다. 또한 녹조류인 클로렐라제품에서는 엽록소 a, b의 비가 3:1인 것으로 나타나 녹색식물의 평균 엽록소 함량비와 동일한 것을 알 수 있었다. 엽록소 b의 함유량에서 클로렐라제품은 평균 374.0 mg/100 g으로서, 스피루리나제품의 10.5 mg/100 g보다 30배 이상 함유하고 있는 것으로 나타났지만, β-카로틴의 함유량에서는 스피루리나제품이 평균 1335.4 mg/100 g으로 클로렐라제품의 평균 495.0 mg/100 g보다 평균 함유량에서 2.7배 높은 것을 알 수 있었다. 두 제품군에서 엽록소 a 와 페오포르바이드 a 의 함유량은 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 그리고 스피루리나의 원말 51%만을 함유한 H시료는 원말 100% 함유한 제품과의 각 성분 평균 함유량을 비교할 때 그 절반 정도의 함유량을 가지는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Comparison of the quantity of chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a and β-carotene contained in acetone extracts of Chlorella and Spirulina products.

Products		Chlorophyll a (mg/100g)	Chlorophyll b (mg/100g)	Pheophorbide a (mg/100g)	β-Carotene (mg/100g)
Chlorella	A	232.1	75.8	37.2	709.4
	B	543.0	143.4	60.3	454.8
	C	304.7	104.6	40.7	383.6
	D	416.1	160.	57.0	432.0
Spirulina	E	503.6	15.5	30.3	1427.4
	F	121.9	0.6	19.6	1713.7
	G	449.8	15.5	19.2	865.2
	H	281.1	10.5	0.8	707.4

클로렐라 및 스피루리나제품 동시분석법의 기대효과

본 연구에서 동시분석 하고자 한 엽록소 a, b 및 총페오포르바이드는 현재 건강기능식품공전에 기재되어 있는 클로렐라 및 스피루리나 제품의 기준·규격 중 일부이며 β-카로틴 은 향후 스피루리나 기준·규격에 추가가 고려되는 항목이다. 기준 · 규격 중 엽록소 a의 검사법은 알칼리성피리딘 용액을 이용하여 시험용액을 만든 뒤 흡광도를 측정하여 엽록소함유량을 구하는 방법이다. 검사시간이 비교적 짧은 장점은 있으나 유해한 피리딘을 사용해야하는 단점이 있다. 엽록소 b의 확인시험은 85% 아세톤을 이용하여 추출 후 셀룰로스박층판에 도포하여 전개시킨 후 확인하여야 한다. 총페오포르바이드 시험법은 전처리 시 diethyl ether, 염산 등 다양한 시약이 다량 요구되고 시험방법이 복잡하여 분석시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 동시분석 결과 엽록소 a 항목은 동시분석법으로 분석가능하고 회수율이 평균 70.3% 수준으로 나타났으나 기준·규격 시험방법인 흡광도법과 정량결과 차이가 있어 현재의 기준·규격 검사에 직접 적용하기에 어려움이 있었다. 엽록소 b 규격은 별도의 확인시험이 요구되었으나 본 연구에서는 별도의 시험을 거치지 않고 동시분석으로 확인가능 하였다. 페오포르바이드 a의 회수율은 60.1%로 나타났으나 기존의 방법보다 2~4배의 개선된 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 동시분석법은 기준 · 규격의 확인시험 및 흡광도법에 비해 각 성분 함량의 정량, 분석시간의 단축 및 비용절감 등 시험방법을 크게 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

국문요약

역상 컬럼을 이용하여 건강기능식품 중 클로렐라 및 스피루리나제품에 함유되어 있는 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 HPLC 동시분석법을 확립하였으며, 첨가농도 50 μg/ml에서 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴에 대한 회수율시험결과, 각각 2.8, 6.0, 10.6 및 10.4%의 상대표준편차와 70.3, 71.6, 60.1 및 90.5%의 회수율을 각각 나타냈다. 이때 검출한계는 0.1~1.0 μg/ml, 정량한계는 0.2~2.0 μg/ml이었으며 검량선 상관계수도 0.995 이상의 직선성을 보여주었다. 국내유통 클로렐라 및 스피루리나제품에 대한 엽록소 a, b, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴의 함유량을 분석한 결과 엽록소 a 121.9~543.0, 엽록소 b 0.6~160.0, 페오포르바이드 a 및 β-카로틴 383.6~1713.7 mg/100 g 수준으로 나타났다. 엽록소 b의 함유량은 클로렐라제품에서 평균 374.0 mg/100 g으로 스피루리나제품의 평균 10.5 mg/100 g보다 30배 이상 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 β-카로틴의 함유량은 스피루리나제품이 평균 1335.4 mg/100 g로 클로렐라제품의 평균 495.0 mg/100 g보다 평균 함유량에서 2.7배 높은 것으로 나타났다. 국내 건강기능식품공전 중 클로렐라 및 스피루리나제품의 엽록소 a, b, 및 페오포르바이드 항목의 규격검사를 본 연구의 동시분석법으로 개정함으로써 각 성분 함량의 정량, 분석시간의 단축 및 비용절감 등 시험방법을 크게 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Lee, E. J., Ro, S. O. and Lee, C. H. : A survey of consumer attitude toward health food in Korea (1) Consumer perceptions of health and food habits. *Korean J. Diet Culture*, **11**, 475-485 (1996).
2. Lee, E. J., Ro, S. O. and Lee, C. H. : A survey of consumer attitude toward health food in Korea (2) Consumer perceptions of health food. *Korean J. Diet. Culture*, **11**, 487-495 (1996).
3. Lee, C. H. : Functional food of interest to ASEAN : from traditional experience to modern production and trading. *Food Sci. Biotechnol.*, **13**, 390-395 (2004).
4. 건강기능식품에 관한 법률 2002. 08. 27.
5. Piorreck, M., Baasch, K. H. and Pohl, P. : Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimers. *Phytochem*., **23**, 207-216 (1984).
6. Costa, J. A. V., Colla, L. M. and Filho, P. F. D. : Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technol.* 328-333 (2003).
7. 강민숙, 심상준, 채희정 : 기능성 생물 소재로서의 클로렐라. 한국생물공학회지, **19**, pp. 1-11 (2004).
8. Edelenbos, M., Christensen, L. P. and Grevsen, K. : HPLC determination of vhlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem*., **49**, 4768-4774 (2001).
9. McGhie, T. K. and Ainge, G. D. : Color in fruit of the genus *Actinidia* : carotenoid and chlorophyll compositions. *J. Agric. Food Chem*., **50**, 117-121 (2002).
10. Suzuki, Y. and Shioi, Y. : Identification of chlorophylls and carotenoids in major teas by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Agric. Food Chem*., **51**, 5307-5314 (2003).
11. Morrison, G. H. : Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem*., **52**, 2242-2249 (1980).
12. Furuya, K., Hayashi, M. and Yabushita, Y. : HPLC determination of phytoplankton pigments using N, N-dimethylformamide. *J. Oceanography,* **54**, 199-203 (1998).
13. Ergun, E., Demirata, B., Gumus, G. and Apak, R. : Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry. *Anal. Bioanal. Chem*., **379**, 803-811 (2004).
14. Atsushi, M. : Technology on quality control in Chlorella production. *Food J*., **9**, 82-97 (1999).
15. Garrido, J. L. and Zapata, M. : Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of algal chlorophylls. *J. Chromatography A*, **738**, 285-289 (1996).
16. Gandul-Rojas, B., Cepero, M. Roca-L. and Minguez-Mosquera, M. I. : Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* Cv. Arbequina. *J. Agric. Food Chem*., **47**, 2207-2212 (1999).