

水中葉綠素 *a* 檢測方法—丙酮萃取法／分光光度計分析法

中華民國 108 年 6 月 10 日環署授檢字第 1080003307 號公告
自中華民國 108 年 9 月 15 日生效
NIEA E507.04B

一、方法概要

樣品經玻璃纖維濾紙過濾後，濾紙以研磨器於 90% 丙酮溶液中研磨萃取葉綠素 *a*，萃取液再以分光光度計測得吸光值，計算樣品中葉綠素 *a* 濃度。

二、適用範圍

本方法適用於地面水體。

三、干擾

- (一) 樣品具濁度時會產生干擾。
- (二) 浮游藻類之其他色素，如葉綠素 *b*、葉綠素 *c*、葉綠素之分解物如葉綠素酸酯(Chlorophyllides)、脫鎂葉綠甲酯酸(Pheophorbides)和脫鎂葉綠素(Pheophytins)等、葉黃素(Xanthophyll)、藻膽色素(Phycobilins)及類胡蘿蔔素(Carotenoids)等會產生干擾。
- (三) 萃取後的萃取液易受溫度、光、酸及濁度影響，應避免強光照射或接觸酸性物質，上機分析時，均須回溫至室溫。

四、設備與材料

- (一) 量筒：100 mL 至 1 L 之量筒。
- (二) 玻璃纖維濾紙：直徑 47 mm 或 25 mm，平均孔徑約 0.7 μm (使用 Whatman GF/F 或同級品)。
- (三) 薄膜過濾裝置。
- (四) 真空抽氣裝置：水壓式、吸氣式或手動式，壓力差低於 0.2 kg/cm^2 (20 kPa) 者為佳。
- (五) 鑷子。
- (六) 濾紙存放容器：能避光，在運送過程及儲存時，可以存放含過濾樣本之濾紙，不受環境污染者。
- (七) 運送儲存器：能保持溫度在 10°C 以下之儲存器。

- (八) 冷凍櫃：可長期維持在 -10°C 以下。
- (九) 研磨器：具研磨效果，且能耐丙酮者。
- (十) 震盪器。
- (十一) 攜帶式 pH 計或 pH、石蕊試紙。
- (十二) 離心管：15 mL，具螺紋蓋，能耐丙酮者。
- (十三) 離心機：懸臂式、可容納 15 mL 離心管、離心力可達 675 g 以上 (g 為離心力，註 1)，具冷卻系統為佳。
- (十四) 分注器或移液管。
- (十五) 分光光度計：波長能設定在 750 nm、664 nm、647 nm 及 630 nm，其透光率讀值需至小數點下 3 位。樣品槽光徑可為 1 cm、2 cm、5 cm 或 10 cm(註 2)。

五、試劑

- (一) 試劑水：電阻值須大於 $1\text{ M}\Omega\text{-cm}$ 。
- (二) 丙酮：HPLC 級(或同級品)。
- (三) 90% 丙酮溶液：試劑水與丙酮以體積比 1:9 配製。

六、採樣與保存

- (一) 視水中浮游藻類密度而定，採取適量樣品，記錄採樣體積、採樣時間及地點等，並測試樣品之 pH 是否 ≥ 7 。
- (二) 採樣後將樣品混合均勻，隨即量取適量樣品進行過濾，若無法立即進行過濾時，應將樣品以小於 10°C 且不得凍結方式保存，但須在採樣後 24 小時內進行過濾。
- (三) 過濾時須避免強光直射，以減壓過濾方式進行，將浮游藻類過濾於玻璃纖維濾紙上。當樣品抽濾近乾時，關閉抽氣裝置避免過度抽乾。樣品之過濾體積以使濾紙呈現微綠色或褐色者為佳。以鑷子夾取濾紙，應避免夾到內含物，並將濾紙面朝內摺，將濾紙置放於濾紙存放容器內避光，待進行萃取步驟。
- (四) 樣品或過濾後之濾紙運送時，溫度應維持在小於 10°C 且不得凍結。
- (五) 若樣品 $\text{pH} \geq 7$ ，過濾後之濾紙未能即刻進行葉綠素 *a* 之萃取時，應將濾紙保存於低於 -10°C 之冷凍櫃，保存期限不可超過四週。樣品 $\text{pH} < 7$ ，過濾後之濾紙須即刻進行葉綠素 *a* 之萃取和分析，以避免葉綠素 *a* 在酸性環境下分解而造成誤差。

七、步驟

(一) 萃取葉綠素 *a*

1. 將濾紙移入離心管內（如濾紙存放在冷凍櫃中，應先在暗處回溫），加入 A mL 90% 丙酮溶液，以研磨器將濾紙研磨成泥狀（注意：研磨過程不可過熱，註 3）。再加入 B mL 90% 丙酮溶液潤洗研磨器後(A+B 共 10 mL)，將潤洗液與泥狀物混合，旋緊離心管蓋震盪充分混合後，置於 4°C ± 2°C 暗處浸泡至少 2 小時，最好隔夜，但不得超過 24 小時，在此過程中至少應從 4°C ± 2°C 暗處取出震盪混合一次。處理另一濾紙前，研磨器須用丙酮溶液清洗，以清除殘留之物質最後再以丙酮潤洗，才得進行下一個樣品濾紙研磨。
2. 浸泡後，取出再震盪混合之，再以離心力 675 g 離心 15 分鐘或以 1,000 g 離心 10 分鐘，如離心機具冷卻系統，離心溫度控制低於室溫可延長離心時間。於暗處回溫至室溫後，取其上清液，進行分光光度計測定。

(二) 分光光度計分析

1. 將分光光度計選定波長（750 nm、664 nm、647 nm 及 630 nm），以 90% 丙酮溶液進行儀器歸零。
2. 將七、步驟（一）萃取液放入分光光度計之樣品槽中，分別讀取其在波長 750 nm、664 nm、647 nm 及 630 nm 之吸光值並記錄之。
3. 萃取液於波長 664 nm 之吸光值以介於 0.1~1.0 之間為原則，若萃取液於波長 664 nm 之吸光值小於 0.1，可適當增加樣品過濾體積或改用較長光徑之樣品槽，以提高吸光值。如樣品雜質過多無法增加過濾體積或樣品過濾體積達 4 L，使用分光光度計可用之最長樣品槽光徑下，吸光值仍小於 0.1 時，於分析結果加註說明。
4. 萃取和上機分析時必須在避光下進行，並使用不含酸容器以避免葉綠素 *a* 分解。

八、結果處理

(一) 萃取液中葉綠素 *a* 之濃度(C)(mg/L)=11.85 X - 1.54 Y - 0.08 Z

X：波長 664 nm 吸光值-波長 750 nm 吸光值

Y：波長 647 nm 吸光值-波長 750 nm 吸光值

Z：波長 630 nm 吸光值-波長 750 nm 吸光值

(二) 樣品中葉綠素 *a* 之濃度($\mu\text{g/L}$ 或 mg/m^3)

$$= \frac{\text{萃取液濃度 } C \times \text{萃取液體積}(\text{mL})}{\text{樣品過濾體積}(\text{L}) \times \text{樣品槽光徑}(\text{cm})/1(\text{cm})}$$

九、品質管制

(一) 空白分析：每批次或每 10 個樣品須以同批號玻璃纖維濾紙執行空白分析，空白分析過濾試劑水體積應與該批次樣品過濾體積最大量者相同，分析結果不得高於該批次任一樣品濃度的 10%(樣品雜質過多無法增加過濾量或樣品過濾量超過 4 L 者除外)。

十、精密度與準確度

略

十一、參考文獻

- (一) APHA, AWWA and WPCF, Standard methods for the examination of water and Wastewater, 23rd ed., American Public Health Association, Washington D.C., 2017.
- (二) ASTM, Standard practices for measurement of chlorophyll content of algae in surface waters, Designation:D3731-87, pp.15-18., 1987.
- (三) Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. Determination of chlorophylls and total carotenoids, Spectrophotometric method. In "A manual of chemical and biological methods for seawater analysis", Pergamon Press.N.Y. U.S.A. pp.101-104., 1984.
- (四) Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. and Wright, S.W. Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods. UNESCO Press, 1995.
- (五) U.S.EPA, In vitro determination of chlorophylls *a*, *b*, *c1* + *c2* and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Method 446.0, 1997.

註 1：離心力 *g* 與離心機轉速之關係，如下列公式。

$$\text{離心力}(g) = \frac{1.118 \times (\text{rpm})^2 \times R}{10^5}$$

式中 rpm 為離心機每分鐘之轉速、R 為離心機半徑以公分(cm)表示。

- 註 2：本方法應每季執行分光光度計功能測試。使用 5 cm 或 10 cm 樣品槽時，請確認萃取液液位高於偵測高度。
- 註 3：進行研磨萃取濾紙時，應在抽風櫃中操作。本方法所使用之各種試劑其毒性或致癌性並不明確，可能對人體健康有害，應儘量避免可能的曝露並減少或消除廢棄物的量。
- 註 4：檢驗室應有勞工主管機關對於各化合物之安全操作規定，並將有關資料分送實驗人員。
- 註 5：檢測產生之廢液依丙酮廢液處理原則處理。
- 註 6：本文引用之公告方法及編碼，以環保署最新公告者為準。