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102年6月18日環署檢字第1020051037號公告
自中華民國102年9月15日生效
NIEA E507.0~~2~~3B

一、方法概要

水樣經玻璃纖維濾紙過濾後，濾紙以組織研磨器於 90% 丙酮溶液中研磨萃取~~其中之~~葉綠素 *a*，萃取液再以分光光度計測得~~萃取液之~~吸光值，~~最後依吸光值~~計算水樣中葉綠素 *a* ~~含量~~濃度。

二、適用範圍

本方法適用於~~池、河、湖泊、水庫等~~地面水體之檢測。

三、干擾

（一）~~葉綠素*a*之分解產物，如脫鎂葉綠素（pheophytins）及脫鎂葉綠甲酯－酸（pheophorbides），因其吸收波長與葉綠素*a*相同會產生之干擾。~~萃取後的萃取液與標準溶液易受溫度、光、酸及濁度所影響，應避免強光照射或接觸酸性物質。萃取液及標準溶液上機測試時，均須回溫至室溫。

（二）浮游植物內之其他色素，如葉綠素*b*、*c*、葉黃素（xanthophyll）、藻膽色素（phycobilins）及類胡蘿蔔素（carotenoids）等會產生干擾。

~~（三）樣品具濁度時會產生干擾。~~

四、設備

（一）量筒：100、 500 mL 或 1 L 之量筒。

（~~七~~二）玻璃纖維濾紙：直徑~~為~~ 47 mm 或 25 mm，平均孔徑約 0.7 µm (使用 Whatman GF/F 或同等級產品)。

（~~五~~三）過濾裝置：薄膜過濾裝置。

（~~六~~四）真空抽氣裝置~~幫浦~~：水壓式、吸氣式或手動式，壓力差低於 0.2 kg/cm2（20 kPa）者為佳。

（~~十一~~五）鑷子。

（~~十一~~六）鋁箔紙。

（~~十一~~七）濾紙存放容器：能遮光，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。

（~~十一~~八）運送儲存器：旅行冰桶、液態氮桶、乾冰桶、冷凍保存盒或冰箱之冷凍櫃。

（~~十一~~九）冷凍櫃：可長期維持在-10℃以下。

（~~一~~十）組織研磨器：具組織研磨效果者。

~~（十）採樣瓶：500 mL 或 1 L 塑膠瓶。~~

(十一)震盪器。

（~~三~~十二）離心管：錐形底、1~~0~~5 mL，具螺紋蓋。

~~（十二）酸鹼度計。~~

（十三）離心機：懸臂式、可容納 15 mL 錐底離心管、離心力可達 675 ×g 以上（g 為離心力，註 1）。

（~~九~~十四）移液管：0.5、1、2、3、4、5 或 10 mL A 級玻璃移液管或同級品。

（~~四~~十五）分光光度計：使用波長 664、647、630 及 750 nm，狹縫寬度（band width）小於 2.0 nm，吸光值靈敏度達 0.001，樣品槽光徑可為 1、2、5 或 10 cm(註 2)。~~頻寬（band width）2.0 nm 以下。~~

（~~八~~十三）定量瓶：10、25、50 或 100 mL 褐色定量瓶。

五、試劑

（一）試劑水：電阻值須大於 1 MΩ-cm ~~導電度 25℃10 μmho / cm 以下，二氧化矽含量低於< 0.1 mg / L~~。

（二）丙酮：層析級。

（~~二~~三）90% 丙酮溶液：試劑水與丙酮以體積比 1:9 配製，混勻後標誌清楚~~將試藥級之丙酮與試劑水以 90：10 之體積比混合。~~

~~（三）葉綠素 *a* 標準品(註 3)~~

六、採樣及保存

（一）視水中浮游植物密度而定，採取代表性水樣約 100 mL ~~0.1~~ 至 4 L，~~並~~記錄~~使用水~~採樣體積~~及 pH~~、採樣時間及地點等。

（二）採樣後立即放置暗處密封，以 4℃ 冷藏方式保存，期限不得超過 24 小時。採樣後將水樣混合均勻，量取適量水樣（視水樣而調整），當日內儘速以玻璃纖維濾紙進行過濾完畢。當水樣

接近抽濾至乾時，關閉抽氣裝置避免過度抽乾，過濾時間盡量在 10 分鐘內完成，過濾之水樣量以使濾紙呈微帶綠色或褐色者為佳。以鑷子移去濾紙，將含顆粒物面朝內摺，並用吸水紙將多餘水分吸乾，待進行萃取步驟。

1. 運送時間 4 小時內，濾紙可存放在冰桶(0～4℃)或其他低於 0℃之儲存器內如液態氮桶、乾冰桶或冰箱冷凍櫃。
2. 運送時間超過 4 小時，濾紙需存放在低於 0℃儲存器內如液態氮桶、乾冰桶、冷凍保存盒或冰箱冷凍櫃。

（三）~~以幫浦過濾水樣於玻璃纖維濾紙上~~過濾的濾紙應保存於−10℃冷凍櫃中，期限不可超過一個月。

~~（四）過濾後之樣品亦可用冷凍方式保存，期限不得超過三星期。~~

七、步驟

（一）萃取葉綠素 *a*

1、將組織研磨器、離心機架設妥當，調整工作台的照明至能操作之最低光度。

~~1、將過濾後之濾膜放入組織研磨器中，並加入 2 至 3 mL 90% 丙酮溶液，再以 500 rpm 研磨 1 分鐘。~~

2、~~將研磨後之液體倒入有螺紋蓋之離心管中，以 90% 丙酮溶液淋洗研磨器，再將淋洗液倒入離心管中，並以 90% 丙酮溶液調整離心管內液體體積至 10 mL。~~將濾紙移入研磨器內（如濾紙存放在冷凍櫃中，應先在暗處回溫），移入前將濾紙剪成小片狀，以研磨棒將濾紙推到研磨器底部。加入 5 mL 丙酮水溶液，研磨成泥狀（注意：研磨過程不可過熱，註 3）。以 5 mL 丙酮水溶液潤洗研磨器及研磨棒後，將潤洗液與泥狀物混合置於離心管內，旋緊螺紋蓋震盪充分混合後，置於 4℃暗處浸泡至少 2 小時，但不得超過 24 小時，在此過程中至少應從 4℃暗處取出震盪混合一次。處理另一濾紙前，研磨管及棒需用丙酮水溶液清洗，除任何殘留之物質，最後再以丙酮潤洗，才得進行下一個樣品濾紙研磨。

~~3、將離心管置於 4℃ 及黑暗下靜置 2 小時以上。~~浸泡後，取出再震盪混合之，以離心力 675 ×g 離心 15 分鐘或以 1,000 ×g 離心 10 分鐘。於暗處回溫至室溫後，取其上清液，進行分光光度計測定。

~~4、將離心管放入離心機以 675 g 離心 15 分鐘。~~

~~5、離心後之上清液移入乾淨之離心管中並記錄體積（L）。~~

（二）分光光度計定量

1、將分光光度計暖機 30 分鐘以上，所有選定波長(750、664、647 及 630 nm)，以 90%丙酮水溶液進行儀器歸零。

~~1~~2、將七、步驟（一）~~5~~ 2 萃取液放入~~1 cm 光徑之~~樣品槽中，分別讀取其在波長 750、664、647 及 630 nm 之吸光度值並記錄之~~；各吸光度值分別代表濁度、葉綠素 *a*、*b* 及 *c* 等之相對濃度~~。

~~2、每一批樣品須以一片不含葉綠素 *a* 之濾膜依七、步驟(一)同時做空白分析；樣品之吸光度值須扣除空白分析值。~~

八、結果處理

（一）萃取液中葉綠素 *a* 之濃度（C_a）（mg/L）

$$= 11.85(Abs_{664} - Abs_{750}) - 1.54(Abs_{647} - Abs_{750}) - 0.08(Abs_{630} - Abs_{750})$$

（二）水樣中葉綠素*a*之濃度(μg/L或mg/m^3)

$$= \frac{C_a \times \text{萃取液體積(mL)}}{\text{水樣體積(L)} \times \text{樣品槽光徑(cm)}/1\text{(cm)}}$$

九、品質管制

（一）萃取液在波長 664 nm 之吸光度須介於 0.1 至 1.0 之間，否則調整水樣過濾體積(註 4)或改用較長光徑之樣品槽。

（二）~~操作萃取~~所有的檢測過程~~一萃取和測定中~~必須在~~弱~~避光下進行，並使用不透明不含酸容器以避免葉綠素 *a* 分解。

（三）空白分析值：每批次樣品須以同批號玻璃纖維濾紙，依七、步驟(一) 與樣品相同處理。空白分析須在最後一個作萃取，以了解是否被污染。

~~（三）必要時可由配製標準葉綠素 *a*，校正計算結果。~~

十、精密度及準確度

略

十一、參考資料

（一）APHA,AWWA and WPCF, Standard methods for the examination of water and Wastewater, ~~18th~~22nd ed., American Public Health

Association,washington D.C., ~~1992~~2012.

（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. Derermination 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：guidelings to modern mentdos. UNESCO Press, 1995.

（五）U.S.EPA, In vitro determination of chlorophylls a, b, c_1 + c_2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Method 446.0, 1997.

註 1：g 離心力與離心機轉速之關係，如下列公式。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。

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

註 2：本方法應每季執行分光光度計功能測試，以確保波長之精準。使用5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，以減少操作人員吸入太多量之丙酮。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：水樣已調整至可過濾之最大量，但是分光光度計波長 664 nm吸光度仍無法達到0.1時，建議該水樣改用NIEA E509~~.00C~~方法進行檢測。

註 5：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 6：檢測產生之廢液依丙酮廢液處理原則處理。