

# 水中葉綠素 *a* 檢測方法—丙酮萃取/螢光分析法

中華民國 99 年 2 月 5 日環署檢字第 0990012749D 號公告  
自中華民國 99 年 5 月 15 日起實施

NIEA E509.01C

## 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葉綠素 *a*，萃取液再以藍光光源的螢光儀測得螢光值，最後依製備之螢光值檢量線求得葉綠素 *a* 濃度。

因使用之標準溶液葉綠素 *a* 濃度，會受各種因子影響而衰減，每批次檢測時應以分光光度計再確認標準溶液之濃度。

## 二、適用範圍

本方法適用於地面水體、飲用水水源水質及海域地面水體之檢測。單一實驗室之方法偵測極限估值為 0.11 µg/L。

## 三、干擾

- (一)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)萃取物如產生紅色光區的螢光，會干擾葉綠素 *a* 的量測。
- (三)樣品中，其他種類葉綠素或胡蘿蔔素濃度過高會有螢光熄滅效應，可將萃取液稀釋以克服之。

## 四、設備及材料

- (一)量筒:100、500 mL 或 1L 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 或同等級產品)。
- (三)過濾裝置: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<sup>2</sup> (20 kPa)者。

(五) 鑷子。

(六) 鋁箔紙。

(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。

(八) 運送儲存器:運送過程在 4 小時以內可使用如旅行冰桶, 內放冰塊 可維持在 0 ~ 4°C;若超過 4 小時, 需存放在低於 20°C 的儲存器內, 如液態氮桶、乾冰桶或冰箱之冷凍櫃。

(九) 冷凍櫃:可長期維持在 20°C 以下。

(十) 組織研磨器:具組織研磨效果者。

(十一) 離心管:錐形底、15 mL, 具螺紋蓋。

(十二) 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)。

(十三) 定量瓶:10、25、50 或 100 mL 褐色定量瓶。

(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。

(十五) 恆溫水浴槽:循環式。

(十六) 分析天平:可精秤至 0.1 mg。

(十七) 分光光度計:使用波長 664.3 及 750 nm, 狹縫寬度 (band width) 小於 2.0 nm, 吸光值靈敏度達 0.001。

(十八) 螢光儀:使用激發光波長 436 nm, 放射光波長 680 nm, 光源為藍光者 (Turner Designs Model 10 AU 激發濾鏡 436FS10 及放射濾鏡 680FS10 或同等級產品)。

## 五、試劑

(一) 試劑水:電阻值須大於 1 M -cm, 二氧化矽含量低於 0.1 mg/L。

(二) 丙酮:層析級。

(三) 90% 丙酮水溶液:混合 100 mL 試劑水與 900 mL 丙酮於儲存瓶中,

混勻後標誌清楚。

(四)葉綠素 *a* 儲備溶液:在暗處,取不含葉綠素 *b* 之固體葉綠素 *a* 標準品(註 2),輕敲玻璃瓶身,使固體葉綠素集中在瓶底,再小心打開瓶子,使瓶中所有的固體物倒至 50 mL 量瓶中,以少量 90%丙酮水溶液沖洗併入量瓶內,再以丙酮水溶液定容稀釋之,分裝至數個適當體積儲存瓶,包覆鋁箔,保存於 20°C 黑暗處,可保存 6 個月。使用時,取出一瓶回溫後進行配置標準容液。

(五)葉綠素 *a* 標準溶液:於 100 mL 定量瓶內,以 90%丙酮水溶液稀釋 1 mL 葉綠素 *a* 儲備溶液至刻度。每次檢量線製備前配製,並依步驟(一)執行濃度確認。

## 六、採樣及保存

(一)視水中浮游藻類密度而定,採取代表性水樣約 100 mL 至 4 L,記錄採樣體積、採樣時間及地點等。

(二)採樣後將水樣混合均勻,量取適量水樣(視水樣而調整),立即以玻璃纖維濾紙進行過濾(壓力不得超過 0.2 kg/cm<sup>2</sup> 或 20 kPa)。當水樣接近抽濾至乾時,關閉抽氣裝置避免過度抽乾,過濾時間不得超過 10 分鐘,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。若無法立即萃取,應將濾紙置放於濾紙存放容器內,包覆鋁箔避光,保存於 20°C 冷凍櫃黑暗處。短暫 4 小時以內之運送可存放在冰桶(0 ~ 4°C)或液態氮桶中。

(三)過濾的濾紙應保存於 20°C 冷凍櫃中,期限不可超過一個月。

## 七、步驟

### (一)葉綠素 *a* 標準溶液濃度確認

1、檢測每批次樣品應重新製作檢量線,製作檢量線前,需進行葉綠素 *a* 標準溶液濃度確認。

2、先以 90%丙酮水溶液,分別對分光光度計在波長 664.3 與 750 nm 下歸零。

3、在波長 664.3 與 750 nm 下測定葉綠素 *a* 標準溶液之吸光值,分

$$\frac{\text{Abs}_{664.3} \text{ Abs}_{750} \times 1,000,000}{\text{葉綠素} a \text{ 標準溶液濃度 } g/L \times 87.67 \text{ 樣品槽的光徑 } cm}$$

別得 Abs<sub>664.3</sub> 和 Abs<sub>750</sub>, 依下式計算標準溶液濃度:

(二)檢量線製備:

- 1、檢測每批次樣品應重新製作檢量線。
- 2、將(一)濃度確認之標準溶液, 稀釋成 4 種不同之濃度, 連同原確認之濃度, 共 5 種不同之葉綠素 a 濃度。(例如, 葉綠素 a 標準液濃度確認值為 200 µg/L, 以丙酮水溶液稀釋得 0.2、2.0、5.0 及 20 µg/L 計 4 種, 加原有的 200 µg/L 共計 5 種濃度。)
- 3、待螢光儀暖機 15 分鐘以上後, 分別量測上述 5 種不同濃度之螢光值。製備葉綠素 a 濃度-螢光值之檢量線。

(三)葉綠素 a 之萃取和測定

- 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。
- 2、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), 移入前可將濾紙剪成小片狀, 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°C 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°C 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、浸泡後, 取出再震盪混合之, 以 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, 進行螢光儀測定。
- 4、以螢光儀量測樣品之螢光值, 依檢量線求得葉綠素 a 濃度。當螢光值超過檢量線最高濃度時, 須加以稀釋。

八、結果處理

依下式計算水樣中葉綠素 a 之濃度:

$$\text{水樣中葉綠素} a \text{ 濃度 } g/L = \frac{A \times 10}{V}$$

A: 由檢量線求得之葉綠素 *a* 濃度(μg/L)。

10:90%丙酮水溶液用量(mL)。

V: 使用之原水樣體積(mL)。

#### 九、品質管制

- (一) 所有的標準品、品管樣品及樣品過濾後的濾紙, 必須保存在 20°C 以下黑暗環境中, 以避免降解。
- (二) 所有的檢測過程—萃取和測定必須在避光下進行, 並使用不透明容器以避免葉綠素 *a* 分解。
- (三) 檢量線製作: 每批次樣品應重新確認標準溶液之濃度及製作檢量線, 螢光值檢量線其線性相關係數(r 值)應大於或等於 0.99。
- (四) 空白分析值: 每批次樣品須以同批號玻璃纖維濾紙, 依步驟(三) 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。

#### 十、精密度及準確度

單一實驗室對不同樣品, 進行 2 小時與 24 小時萃取時間的精密度測試結果如表一; 對二種不同藻種, 過濾不同體積量的準確度測試結果如表二。

#### 十一、參考資料

- (一) US EPA Method 445.0. In vitro determination of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in marine and freshwater algae by fluorescence. 1997.
- (二) Welschmeyer, Nicholas, A., Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. Limnol. Oceanogr. 39(8), 1985-1992, 1994.
- (三) 行政院環境保護署, 水中葉綠素 *a* 檢驗方法—丙酮萃取法 NIEA E507.01T, 1994。

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。

$$\text{離心力}(g)=1.119X(\text{rpm})^2 / R \times 10^5$$

註 2: 固體葉綠素 a 標準品, 以不含葉綠素 b 者, 如使用市售 Sigma EC No 207-536-6 或同等級產品, 每瓶淨重約 1 mg, 須存放在 20°C 以下黑暗中。

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: 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。

表一 單一實驗室對不同浸泡時間的精密度

樣品	濾紙研磨後 浸泡時間	平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	標準偏差 ( $\mu\text{g/L}$ )	相對標準偏差 (%)	分析次數
甲	2 小時	49.6	4.89	9.9	6
	24 小時	52.9	2.64	5.0	6
乙	2 小時	78.6	6.21	7.9	9
	24 小時	78.8	2.77	3.5	9

表二 單一實驗室對不同藻種及過濾體積的精確度

藻種	過濾體積 (mL)	平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	標準偏差 ( $\mu\text{g/L}$ )	相對標準偏差 (%)	分析次數
杜奈藻 <i>Dunaliella</i> <i>tertiolecti</i>	5	0.163	0.037	22.8	7
	10	0.298	0.080	26.7	7
	50	1.684	0.385	22.9	7
	100	3.311	0.656	19.8	7
前溝藻 <i>Amphidinium</i> <i>carteraei</i>	5	0.066	0.010	14.6	7
	10	0.142	0.045	31.5	7
	50	0.757	0.208	27.5	7
	100	1.381	0.347	25.1	7