

# 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 E507.03B

## 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 $a$ ，萃取液再以分光光度計測得吸光值，計算水樣中葉綠素 $a$ 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。

## 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) 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、設備及材料

- (一) 量筒：100、500 mL或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  $\mu\text{m}$  ( 使用Whatman GF/F或同等級產品 )。
- (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  $\text{kg}/\text{cm}^2$  ( 20 kPa ) 者為佳。
- (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：旅行冰桶、液態氮桶、乾冰桶、冷凍保存盒或冰箱之冷凍櫃。
- (九) 冷凍櫃：可長期維持在  $-10$  以下。
- (十) 組織研磨器：具組織研磨效果者。
- (十一) 震盪器。
- (十二) 離心管：15 mL，具螺紋蓋。
- (十三) 離心機：懸臂式、可容納 15 mL 離心管、離心力可達  $675 \times g$  以上 ( $g$  為離心力，註1)。
- (十四) 移液管：5 mL A級玻璃移液管或同級品。
- (十五) 分光光度計：使用波長 664、647、630 及 750 nm，狹縫寬度 (band width) 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)。

## 五、試劑

- (一) 試劑水：電阻值須大於  $1 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ 。
- (二) 丙酮：層析級。
- (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。

## 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)，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，將濾紙置放於濾紙存放容器內包覆鋁箔避光，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) 過濾後之濾紙應保存低於 -10 冷凍櫃黑暗處，期限不可超過一個月。

## 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。
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 90% 丙酮溶液，研磨成泥狀（注意：研磨過程不可過熱，註3）。以 5 mL 90% 丙酮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，以離心力  $675 \times g$  離心 15 分鐘或以  $1,000 \times g$  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。

### (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，分別讀取其波長 750、664、647 及 630 nm 之吸光度值並記錄之。

## 八、結果處理

（一）萃取液中葉綠素 $a$ 之濃度( $C_a$ )(mg/L)

$$= 11.85(\text{Abs}_{664} - \text{Abs}_{750}) - 1.54(\text{Abs}_{647} - \text{Abs}_{750}) - 0.08(\text{Abs}_{630} - \text{Abs}_{750})$$

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

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

## 九、品質管制

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

## 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, 22nd ed., American Public Health Association, Washington D.C., 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. 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 : 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 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。