

水中葉綠素 *a* 檢測方法－乙醇萃取法

中華民國 91 年 4 月 17 日 環署檢字第 0910024279 號公告
自中華民國 91 年 7 月 17 日起實施
NIEA E508.00B

一、方法概要

水樣經過濾於玻璃纖維濾片後，以乙醇萃取其中之葉綠素 *a*，再以分光光度儀測得萃取液在酸化前和酸化後之吸光值，最後依吸光值計算水樣中葉綠素 *a* 含量。

二、適用範圍

本方法適用於池塘、河川、湖泊、水庫及海域等水中所含葉綠素 *a* 之檢測。

三、干擾

- (一) 葉綠素 *a* 之分解產物，如脫鎂葉綠素 (Phaeophytins) 及脫鎂葉綠甲酯一酸 (Phaeophorbide *a*)，因其吸收波長與葉綠素 *a* 相近，會產生干擾，可利用加酸後扣除吸光值予以校正之。
- (二) 浮游植物內之其他色素，如葉綠素 *b*、*c* 含量高時會產生干擾。
- (三) 樣品具濁度時會產生干擾。

四、設備及材料

- (一) 恆溫箱或水浴槽 (可維持在 60 ± 1 °C)。
- (二) 離心機：轉速可達 3000 g 以上。
- (三) 離心管：10 mL，具螺紋蓋為佳。
- (四) 分光光度儀：解析度 0.001。
- (五) 過濾裝置。
- (六) 真空抽氣裝置，壓差不得超過 $0.2 \text{ kg} / \text{cm}^2$ (= 20 k Pa)。
- (七) 玻璃纖維濾片：Whatman GF / F，GF / C 或同級品，直徑為 47 mm 或其他尺寸，平均孔徑 (nominal pore size) $0.7 \mu\text{m}$ 。

- (八) 定量瓶：100 mL。
- (九) 微量吸管。
- (十) 測光管：光徑長 1.0、5.0 或 10.0 cm。
- (十一) 採樣瓶：500 mL 或 1000 mL 塑膠瓶。
- (十二) 鑷子。
- (十三) 酸鹼度計。
- (十四) 冰箱：可維持在 4 °C。
- (十五) 冰桶：可維持在 0 - 4 °C。
- (十六) 冷凍櫃：可維持在 - 20 °C 或 - 70 °C。

五、試劑

- (一) 試劑水。
- (二) 乙醇，90 % (v / v)，分析級。
- (三) 1 M HCl：量取 82.9 mL HCl (37 %，比重 1.19)，添加於 1 L 試劑水中。

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 500 至 2000 mL，並記錄採樣體積、酸鹼度值、採樣時間、地點及天氣等。
- (二) 採樣後將水樣混合均勻，量取適量水樣 (視水樣而調整)，立即進行過濾濃縮，水樣濾至接近抽乾時，關閉真空抽氣部分，以避免過度抽乾。濾片呈綠色或褐色者為佳。將過濾後之濾片，暗冷藏於冰桶 (0 - 4 °C) 中。無法立即過濾濃縮時，暫將水樣貯存於冰桶或冰箱 (4 °C) 中，但是 24 小時內須完成過濾程序。
- (三) 過濾後之濾片應儘速完成葉綠素 *a* 之萃取和測定。無法立即萃取和測定時，可將濾片置於 - 20 °C 暗冷藏，最長可保存 14 天；若置於 - 70 °C 暗冷藏，最長可保存三個月。

七、步驟

(一) 葉綠素 *a* 之萃取和測定

1. 取 10 mL 乙醇，加入內含前項濾片之離心管中，置於 60 °C 恆溫箱或水浴槽中，在黑暗下萃取 30 分鐘，萃取期間須每 10 分鐘搖混一次，使萃取完全。
2. 取出離心管，用冷水迅速冷卻至室溫後，置入離心機中，以 3000 – 5000 g 離心 10 – 15 分鐘。
3. 小心取出離心管，避免震動，用微量吸管自上清液取 3 mL 移置於 1 cm 光徑之測光管中（如用 5 cm 光徑之測光管則約取 8 mL），用分光光度儀測其在波長 665 及 750 nm 之吸光值，分別為 E_{665a} 和 E_{750a} 。
4. 添加 0.03 mL 1 M HCl 溶液於 1 cm 光徑之測光管中（如用 5 cm 光徑之測光管則加 0.08 mL），搖混 1 分鐘後靜置，5 – 30 分鐘內重新測量其在 665 及 750 nm 之吸光值，此分別為 E_{665b} 和 E_{750b} 。

(二) 空白分析值

每一批樣品須以一片不含葉綠素 *a* 之玻璃纖維濾片，依步驟七、（一）與樣品同時做空白分析，並在波長 665 及 750 nm 測定其吸光值；樣品在波長 665 及 750 nm 之吸光值均須分別扣除此空白分析值才是實際之吸光值。

八、結果處理

(一) 濁度校正：

樣品在 665 nm 之吸光值扣除在 750 nm 之吸光值即為校正後的吸光值：

$$\text{校正後的吸光值 } C_{665a} = E_{665a} - E_{750a}$$

$$\text{校正後的吸光值 } C_{665b} = E_{665b} - E_{750b}$$

(二) 水樣之葉綠素 *a* 濃度：

經濁度校正後，用下列公式計算水樣之葉綠素 *a* 濃度 (C_a , $\mu\text{g/L}$)。

使用 1 cm 光徑之測光管時：

$$C_a = 29.62 (C_{665a} - C_{665b}) \times V_e / V_s$$

使用 5 cm 光徑之測光管時：

$$C_a = 29.62 (C_{665a} - C_{665b}) \times V_e / 5 V_s$$

使用 10 cm 光徑之測光管時：

$$C_a = 29.62 (C_{665a} - C_{665b}) \times V_e / 10 V_s$$

式中 V_e 為所用乙醇體積 (mL), V_s 為水樣體積 (L)

九、品質管制

- (一) 萃取液在波長 665 nm 之吸光值應介於 0.01 - 0.8 之間，否則須調整水樣過濾體積或改用較長光徑之測光管。
- (二) 若水樣呈酸性，則必須立刻過濾，以避免葉綠素 *a* 在酸性條件下分解。
- (三) 萃取和測定過程必須在弱光下進行，並使用不透明容器以避免葉綠素 *a* 分解。

十、精密度及準確度

略。

十一、參考資料

- (一) 水中葉綠素 *a* 檢測方法-丙酮萃取法，NIEA E507.01B，行政院環境保護署公報，中華民國八十五年十月二十三日。

- (二) ISO 1992. Water quality - Measurement of biochemical parameters - Spectrometric determination of the chlorophyll - *a* concentration. ISO 10260:1920 (E).
- (三) APHA, AWWA, and WPCF. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th ed., American Public Health Association, Washington D.C.