

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。單一檢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 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/cm²（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 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ；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 $1\ \text{M}\Omega\text{-cm}$ ，二氧化矽含量低於 $0.1\ \text{mg/L}$ 。
- (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/cm² 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

$$\text{葉綠素 } a \text{ 標準溶液濃度 } (\mu\text{g} / \text{L}) = \frac{\text{第 3 頁, 共 7 頁} (Abs_{664.3} - Abs_{750}) \times 1,000,000}{87.67 \times \text{樣品槽的光徑}(cm)}$$

別得 $Abs_{664.3}$ 和 Abs_{750} ，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 $\mu\text{g/L}$ ，以丙酮水溶液稀釋得 0.2、2.0、5.0 及 20 $\mu\text{g/L}$ 計 4 種，加原有的 200 $\mu\text{g/L}$ 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：

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

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。

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

- 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