

水中葉綠素 *a* 檢測方法－丙酮萃取／螢光分析法

中華民國110年1月8日環署授檢字第1091007337號公告
自中華民國110年4月15日生效
NIEA E509.02C

一、方法概要

樣品經玻璃纖維濾紙過濾後，濾紙以研磨器於 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，最後依製備之檢量線求得樣品中葉綠素 *a* 濃度。

二、適用範圍

本方法適用於地面水體之葉綠素 *a* 檢測。

三、干擾

- (一) 萃取後的萃取液與標準溶液易受溫度、光、酸及濁度影響，應避免強光照射或接觸酸性物質。
- (二) 萃取物如含有會產生紅色光區的螢光物質，會干擾葉綠素 *a* 的量測結果。
- (三) 樣品中，其他種類葉綠素或類胡蘿蔔素濃度過高會有螢光清光效應(Quenching effects)。

四、設備與材料

- (一) 量筒：100 mL 至 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 或同級品）。
- (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 kg/cm^2 (20 kPa) 者為佳。
- (五) 鑷子。
- (六) 鋁箔紙。
- (七) 濾紙存放容器：能避光，在運送過程及儲存時，可以存放含過濾樣品之濾紙，不受環境污染者。
- (八) 運送儲存器：能保持溫度在 10°C 以下之儲存器。
- (九) 冷凍櫃：可長期維持在 -10°C 以下。
- (十) 研磨器：含研磨棒，具研磨效果，且能耐丙酮者。
- (十一) 離心管：15 mL，具螺紋蓋，能耐丙酮者。

- (十二) 離心機：可容納 15 mL 離心管、離心力可達 675 g 以上^註，具冷卻系統為佳。
- (十三) 定量瓶：10 mL 至 100 mL 褐色定量瓶。
- (十四) 移液管：0.5 mL 至 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：可精稱至 0.1 mg。
- (十七) 分光光度計：波長能設定在 664.3 nm 及 750 nm，其透光率讀值需至小數點下 3 位。
- (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 或同級品）。
- (十九) 攜帶式 pH 計。
- (二十) 震盪器。

五、試劑

- (一) 試劑水：電阻率須大於 1 M Ω -cm。
- (二) 丙酮：HPLC 級(或同級品)。
- (三) 90%丙酮溶液：試劑水與丙酮以體積比 1:9 配製。
- (四) 葉綠素 *a* 粉末：不含葉綠素 *b*，Sigma EC No 207-536-6 或同級品，須存放在冷凍櫃中。
- (五) 葉綠素 *a* 儲備溶液：避光操作，輕敲存放葉綠素 *a* 粉末之玻璃瓶身，使粉末集中在瓶底，打開瓶子，將瓶中所有的粉末倒至玻璃儲存瓶，以 90%丙酮溶液溶解混和均勻，可分裝至數個褐色或包覆鋁箔等避光處理之玻璃儲存瓶，保存於冷凍櫃，可保存 6 個月。
- (六) 葉綠素 *a* 標準溶液：避光操作，將葉綠素 *a* 儲備溶液回溫後，依步驟（一）執行濃度測定。續以 90%丙酮溶液稀釋葉綠素 *a* 儲備溶液，配製一系列標準溶液。

六、採樣與保存

- (一) 視水中浮游藻類密度而定，採取約 100 mL 至 1 L，採完後避光，記錄採樣體積、採樣時間及地點等，並量測樣品之 pH 值。
- (二) 採樣後將樣品混合均勻，隨即量取適量樣品進行過濾，若無法立即進行過濾時，應將樣品以小於 10°C 且不得凍結方式保存，但須在採樣後 24 小時內進行過濾。

- (三) 過濾時須避免強光直射，以減壓過濾方式進行，將浮游藻類過濾於玻璃纖維濾紙上。當樣品抽濾近乾時，關閉抽氣裝置避免過度抽乾。以鑷子夾取濾紙，應避免夾到內含物，並將濾紙面朝內摺，將濾紙置於濾紙存放容器內避光，待進行萃取步驟。
- (四) 樣品或過濾後之濾紙運送時，溫度應維持在小於 10°C 且不得凍結。
- (五) 若樣品 pH ≥ 7 ，過濾後之濾紙未能即刻進行葉綠素 *a* 之萃取時，應將濾紙保存於低於 -10°C 之冷凍櫃，保存期限不可超過四週。樣品 pH < 7，過濾後之濾紙須即刻進行葉綠素 *a* 之萃取和分析，以避免葉綠素 *a* 在酸性環境下分解而造成誤差。

七、步驟

(一) 檢量線最高濃度標準溶液濃度測定

1. 分析當日製作檢量線前，需進行檢量線最高濃度標準溶液濃度測定。
2. 先以 90% 丙酮溶液，分別對分光光度計在波長 664.3 nm 與 750 nm 下歸零。
3. 在波長 664.3 nm 與 750 nm 下測定葉綠素 *a* 標準溶液之吸光值，分別得 Abs_{664.3} 和 Abs₇₅₀，依下式計算濃度：

$$\text{葉綠素 } a \text{ 溶液濃度 } (\mu\text{g/L}) = \frac{(\text{Abs}_{664.3} - \text{Abs}_{750}) \times 1,000,000}{87.67 \times \text{樣品槽光徑}(\text{cm})}$$

4. 如儲備溶液濃度 $\leq 250 \mu\text{g/L}$ ，即為檢量線最高濃度標準溶液，如儲備溶液濃度 $> 250 \mu\text{g/L}$ ，須以 90% 丙酮溶液稀釋至溶液濃度低於 250 $\mu\text{g/L}$ ，以上述步驟測定葉綠素 *a* 溶液濃度，始為檢量線最高濃度標準溶液濃度。

(二) 檢量線製備

1. 樣品上機分析當日應重新製作檢量線。
2. 以七、(一) 檢量線最高濃度標準溶液，稀釋配製其他 5 種不同濃度。
3. 待螢光儀暖機 15 分鐘以上後，分別量測上述 6 種不同濃度之螢光值。製備葉綠素 *a* 濃度-與其相對應螢光值之檢量線。

(三) 葉綠素 *a* 之萃取和測定

- 1.將濾紙移入離心管內（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。加入 A mL 90%丙酮溶液，以研磨器研磨成泥狀（注意：研磨過程不可過熱）。再加 B mL 90%丙酮溶液潤洗研磨器等接觸樣品之設備(A+B 共 10 mL)，將潤洗液與泥狀物混合，旋緊離心管蓋震盪充分混合後，置於 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 暗處浸泡至少 2 小時，最好隔夜，但不得超過 24 小時，在此過程中至少應從 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 暗處取出震盪混合一次。處理另一濾紙前，研磨器須用 90%丙酮溶液清洗，清除殘留之物質，才得進行下一個樣品濾紙研磨。
- 2.浸泡後，取出再震盪混合之，以 675 g 離心 15 分鐘或以 1000 g 離心 10 分鐘，如離心機具冷卻系統，控制離心溫度低於室溫時，可延長離心時間。於暗處回溫，取其上清液，進行螢光儀測定，測量時之室溫應與測量檢量線時之室溫差異 3°C 以內。
- 3.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 90%時，須加以稀釋。

八、結果處理

依下式計算樣品中葉綠素 a 之濃度：

$$\text{樣品中葉綠素 } a \text{ 濃度}(\mu\text{g/L}) = \frac{C \times D \times 10}{V}$$

C：由檢量線求得之葉綠素 a 濃度 ($\mu\text{g/L}$)。

D：稀釋倍率

10：90%丙酮溶液用量 (mL)。

V：過濾樣品體積 (mL)。

九、品質管制

- (一) 檢量線：線性相關係數 (r 值) 應 ≥ 0.99 。
- (二) 空白分析：每批次樣品或每 10 個樣品須以同批號玻璃纖維濾紙執行空白分析，空白分析過濾試劑水體積應與該批次樣品過濾體積最大量者相同，空白樣品萃取須於每批次最後一個進行，分析結果不得高於該批次任一樣品濃度的 10%。

十、精密度與準確度

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，過濾不同體積量的精密度測試結果如表二。

十一、參考資料

- (一) U.S. EPA. In Vitro Determination of Chlorophyll *a* and Pheophytin *a* in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence. Method 445.0, 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 E507.04B，中華民國 108 年。

註：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。

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

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	葉綠素 <i>a</i> 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培養液體積的精密度

藻種	過濾培養 液體積 (mL)	葉綠素 <i>a</i> 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>carterae</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