

分光光度法测定水中叶绿素 a 的实验方法改进

陈沁*

(武汉既济检测技术有限公司, 武汉 430030)

摘要:目的 改进水中叶绿素 a 检测过程中存在的丙酮易挥发、叶绿素 a 易降解、750 nm 处吸光值偏高等操作问题, 降低实验误差, 提升测定结果的准确度和精确度。方法 根据环境保护部发布的《水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》(HJ 897—2017) 标准方法, 优化改进实验操作中存在的叶绿素 a 易降解、丙酮易挥发和待测液的浊度影响吸光值等导致分析误差的操作条件。结果 优化改进后, 降低了操作危险性, 实验结果提升 26.3%, 加标回收率在 10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 加标浓度下分别提升 10.8%、2.9%。结论 本文研究了用分光光度法检测水质叶绿素 a 的实验操作条件, 通过对操作条件的改变, 证明减少了叶绿素 a 的降解和丙酮的挥发, 降低了待测液的浊度, 提升了叶绿素 a 浓度, 为提高测定结果的准确性提供参考。

关键词: 叶绿素 a; 分光光度法; 水质检测

0 引言

日趋严重的水体富营养化现象给许多自来水厂造成了严重的威胁和负担^[1]。如何控制浮游植物的过量繁殖生长已成为环境科学领域一个值得探讨的难题。其中浮游植物生物量测定方法有测干重法、叶绿素法、浊度法、最大比生长速率法等^[2-3], 应用最多的是测叶绿素法。叶绿素是浮游植物的主要光合色素, 常见的是叶绿素 a^[4-5], 叶绿素 a 的测定有效反映了浮游植物生物量乃至初级生产力水平。

目前国内在环境领域内采用的叶绿素 a 测定方法为《水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》(HJ 897—2017)^[6]。原理是将一定量样品用滤膜过滤截留藻类, 研磨破碎藻类细胞, 用丙酮溶液提取叶绿素, 离心分离后分别测定不同波长处提取液的吸光度, 计算叶绿素 a 的浓度。该方法灵敏度高、仪器设备简单、操作简便, 只需要过滤器、研钵、分光光度计等。但是该方法需要用丙酮反复研磨, 在实验操作过程中存在叶绿素 a 易发生光解、丙酮极易挥发而污染环境^[7]、具体操作的约束条件不够严格统一等问题, 从而容易引起较大误差, 影响测定结果的准确性。

根据此方法要求, 对较易存在误差的实验操作进行多次重复性实验, 发现本实验室加标回收率整体偏低, 实际检测中, 常出现 750 nm 波长处的吸光度大于 0.005 的现象。基于以上问题, 本研究进一步探索实验操作条件的优

化, 为提高测定结果的准确性提供现实意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

紫外可见分光光度计(岛津仪器有限公司); 台式低速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司); EZ-StreamTM 真空过滤泵(默克密理博); 6 联不锈钢过滤器(北京国环高科自动化技术研究所); 玻璃研钵; 玻璃纤维滤膜(孔径 0.45 μm); 15 mL 离心管(玻璃); 针式滤器(孔径 0.45 μm); 1 L 棕色试剂瓶; 丙酮(优级纯); 碳酸镁固体(分析纯); 叶绿素 a 溶液标准物质, 含量(10 \pm 0.8) $\mu\text{g/mL}$, 产品编号 BWQ0316-2016(北方伟业计量集团有限公司)。

1.2 样品采集

样品选用同批次采集的某固定点位汉江原水, 按照 GB/T 14581、HJ/T 91 和 HJ 494 中的相关规定, 采集水面下 0.5 m 样品, 储存于棕色玻璃瓶或聚乙烯瓶中, 每升样品中加入 1 mL 碳酸镁悬浊液。

1.3 优化方法

1.3.1 调整滤膜冻存时间

过往实验发现, 含叶绿素 a 的滤膜在经过抽滤后, 仍含有少量的水分, 而浮游植物细胞的水分往往能加重细胞膜脂的过氧化程度和膜通透性, 促使叶绿素酶催化叶绿素及其衍生物侧链酯键进行水解, 从而降低叶绿素 a 的浓度^[8]。当样品长时间低温干燥时, 随冻存时间的延长, 冻

* 通信作者: 陈沁, 研究方向为生物类水质检测分析。E-mail: 470962762@qq.com

存中浮游植物的组织细胞结构受酶解反应影响, 变得越来越不稳定^[8], 其所含的叶绿素 a 损失量也越来越多, 故叶绿素 a 的提取量受冻存时间的影响。标准方法中建议是水样采集后 14 d 内分析完成, 并没有具体说明滤膜的冻存时间, 因此设计在不同冻存时间对照下, 叶绿素 a 的测定值是否随冻存时间发生变化, 从而探究最优冻存时间, 减少叶绿素 a 的降解流失。

1.3.2 改变浸提方式

研磨的目的是破碎细胞壁, 通过研磨使叶绿素 a 更容易析出, 但研磨器的特性决定了其表面附着的残留浮游植物极难清洗, 从而造成损失^[9]。此外, 由于丙酮的挥发性造成的损失同样很难避免; 即使采取封闭研磨, 封闭设施内壁附着物也很难全部收集后转入上清液。通过研究, 浮游植物大都体积小且结构简单, 提取剂较容易渗入其细胞, 无需研磨也能对细胞中的叶绿素成分进行提取。而通过超声波振荡的方式, 将丙酮密封在离心管内, 能降低丙酮的挥发, 也可在超声波的作用下将提取剂渗入细胞内。由此可见不同的研磨方式对叶绿素的提取会产生较大影响, 实验设计玻璃研钵研磨和超声振荡两种研磨方式, 对比探究二者之间对叶绿素 a 的影响, 从而确定最佳提取方式。

1.3.3 调整过滤离心次数

长期实验发现, 按照标准方法中经过离心和过滤处理的水样, 有时仍达不到 750 nm 波长处吸光值低于 0.005 的要求, 从而对其它吸收波长处的吸光值产生影响, 使得测定结果产生较大误差^[10]。这主要是因为处理后的水样浊度依然过大^[9,11], 导致存在 750 nm 波长处吸光值高于 0.005 的情况, 此结果影响在 630、647、664 nm 波长处吸光值与 750 nm 波长处吸光值的差值, 间接影响计算结果, 标准方法中解决方式是将不达标的试样重新用针式滤器过滤, 再用分光光度计测定吸光度。实际检测中发现部分经再次过滤后的样品吸光度依旧达不到预期值, 实验决定将不达标的试样经针式滤器过滤后二次离心, 测定吸光度, 观察是否达标。

2 结果与分析

2.1 优化方法的影响分析

2.1.1 冻存时间的影响

实验测定不同的冻存时间下, 叶绿素 a 的检出效果。将样品随机分为 6 组, 分别在 -20 °C 冻存 0、6、12、24、48、72 h, 测得叶绿素 a 的结果见表 1。由表 1 可见, 冻存 12 h 叶绿素 a 的测定结果最大, 相对标准偏差最小。这是因为冻存 12 h, 滤膜中剩余的水分已大部分升华, 而

浮游植物细胞的酶解反应尚未明显增强, 故而对叶绿素 a 提取量的影响较小。因此, 确定冻存时间为 12 h。

2.1.2 浸提方式的影响

实验测得在相同作用时间内, 玻璃研钵研磨和超声振荡两种方式下叶绿素 a 的检出结果见表 2。由表 2 可见, 超声振荡提取叶绿素 a 时, 测定结果最大, 标准偏差最小。因此建议采用超声波振荡 10 min 破碎滤膜, 提取样品。

表 1 不同冻存时间的叶绿素 a 测定值

冻存时间 /h	测定值 /($\mu\text{g/L}$)					平均值 / ($\mu\text{g/L}$)	相对标准偏差 /%
	1	2	3	4	5		
0	11	16	12	15	11	13	18.0
6	17	24	16	21	17	19	17.8
12	31	22	25	28	24	26	13.6
24	18	18	23	21	20	20	10.6
48	15	20	19	16	20	18	13.0
72	22	27	23	26	22	24	9.8

表 2 不同研磨方式的叶绿素 a 测定值

细胞破碎方式	测定值 /($\mu\text{g/L}$)					平均值 / ($\mu\text{g/L}$)	相对标准偏差 /%
	1	2	3	4	5		
研钵研磨 10 min	22	27	26	23	27	25	9.4
超声振荡 10 min	30	32	25	28	30	29	9.1

2.1.3 调整过滤离心的影响

实验将在 750 nm 波长处的吸光度大于或等于 0.005 的试样, 经针式滤器过滤后再进行二次离心, 测定吸光度。经过滤和再次离心后的试样, 750 nm 处的吸光度小于 0.005, 达到方法要求, 可用于后续实验测定。

2.2 加标回收

选取浓度为 $(10 \pm 0.8) \mu\text{g/mL}$ 的叶绿素 a 标准溶液, 配制成 $10 \mu\text{g/L}$ 和 $20 \mu\text{g/L}$ 的试样溶液, 验证其精密度和准确度, 得到如下结果: 在改进优化方法前, 加标浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ 的样品回收率平均值是 76.7%, 标准偏差 12.1, 相对标准偏差 15.8%; 改进方法后, 样品回收率平均值是 85.0%, 标准偏差 5.5, 相对标准偏差 6.4%, 回收率平均提升 10.8%。加标浓度为 $20 \mu\text{g/L}$ 的样品回收率平均值在改进优化方法前为 85.8%, 标准偏差 7.4, 相对标准偏差 8.6%; 改进后为 88.3%, 标准偏差 2.6, 相对标准偏差 2.9%, 回收率平均提升 2.9%。两个加标浓度均高于之前检测的回收率。

2.3 优化验证

为再次验证此次调整方案, 将同一批水样以优化实验

条件前后的两种不同方式测定叶绿素 a 的浓度，方式一：冻存 12 h 后用超声振荡浸提。测定结果如表 3 所示，实验过滤后将滤膜立刻进行研磨浸提。方式二：过滤后将滤膜发现，样品浓度在实验条件改进后提升 26.3%。

表 3 汉江原水叶绿素 a 测定

样品取值	750 nm 吸光度		664 nm 吸光度		647 nm 吸光度		630 nm 吸光度		样品浓度 /($\mu\text{g/L}$)	平均值/ ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 /%	提升率 /%
	取值	校正	取值	校正	取值	校正	取值	校正				
1	0.003		0.037	0.034	0.016	0.013	0.016	0.013	19			
2 改进前	0.005		0.038	0.033	0.016	0.011	0.015	0.010	19	19	3.22	
3	0.004		0.036	0.032	0.017	0.013	0.016	0.012	18			
4	0.002		0.043	0.041	0.020	0.018	0.020	0.018	23			26.3
5 改进后	0.001		0.044	0.043	0.022	0.021	0.020	0.019	24	23	2.26	
6	0.001		0.044	0.043	0.023	0.022	0.019	0.018	24			

3 讨论与结论

文章聚焦《水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》(HJ 897—2017)检测方法，通过实验室检测数据分析发现，该方法存在实验过程中叶绿素 a 降解、丙酮挥发、水样浊度高等干扰误差。为降低误差提高检测结果的准确度和精确度，通过采集同一点位的同批水样进行反复多次实验，确定调整过滤后滤膜的冻存时间与改变滤膜的研磨方式两种条件，能有效减少实验过程中叶绿素 a 降解与丙酮挥发，用二次离心的方式降低 750 nm 波长的吸光值，能有效降低待测液的浊度，提升叶绿素 a 浓度。

在冻存 0、6、12、24、48、72 h 六组实验对照下发现，冻存 12 h 后测定该水样，叶绿素 a 有最高测定值，因此确定最佳冻存时间为 12 h。通过研磨方式提取滤膜中叶绿素 a，在实验过程中存在丙酮易挥发、研钵表面附着残留物难清洗转移等干扰因素，导致了测定结果偏低。实验用玻璃研钵研磨和超声振荡两种方式提取丙酮中的叶绿素 a，发现超声振荡同样能比较完全地提取细胞中的叶绿素 a，且测定结果优于对照组。对于某些浊度较高的水样，一次离心和过滤达不到 750 nm 波长处吸光值低于 0.005 的要求，再次过滤后仍有部分水样在 750 nm 波长的吸光值大于或等于 0.005，此时发现二次过滤对降低吸光值的影响不大，而将水样再次离心后能有效降低浊度，使水样达标。

为了证实实验结果，按照优化改进前后的实验条件对同批水样进行再次测定和加标回收率验证，发现在操作条件改进后，样品检测浓度全面提升 26.34%，加标浓度为 10、20 $\mu\text{g/L}$ 的样品回收率提高 10.8%、2.9%，说明本次优化改进实验条件能进一步提高叶绿素 a 的检测准确度和精确度，减少叶绿素 a 降解与丙酮的挥发度，降低实验危

险程度。

未来，为进一步提高实验的精准度，结合丙酮对温度的敏感性与叶绿素 a 对光照的敏感性，将对实验环境的温度和光照条件进行严格控制，并降低人员在实验过程中的操作误差，提高测定结果的准确性与科学性。

参考文献

- [1] 赵荣龙, 梁欣欣, 吴玉萍, 等. 分光光度法测定湖泊水中叶绿素 a 含量的研究 [J]. 中国标准化, 2024, (7): 247-250.
- [2] 朱志诚, 何苗, 汤峰, 等. 原水监测中叶绿素 a 与藻类相关性 [J]. 净水技术, 2021, 40(S2): 11-14+70.
- [3] 冷维亮, 毕钦祥, 刘英昊, 等. 水库水中叶绿素 a 测定方法比较 [J]. 治淮, 2013, (12): 57-58.
- [4] 陈宇炜, 高锡云. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定 [J]. 湖泊科学, 2000, (2): 185-188.
- [5] 郑晓艳. 浮游植物叶绿素 a 含量的测定及误差分析 [J]. 能源环境保护, 2016, 30(2): 55-57+34.
- [6] 生态环境部. 水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法: HJ 897—2017 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2018.
- [7] 徐志飞. 水体中藻类叶绿素 a 测定方法的优化 [J]. 江苏预防医学, 2019, 30(5): 580-581.
- [8] 李旭冉, 梅鹏蔚, 王琳, 等. 丙酮萃取分光光度法测定水中叶绿素 a 实验条件的优化 [J]. 环境监控与预警, 2016, 8(3): 25-27+42.
- [9] 唐曙暇. 改进淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨 [J]. 江淮水利科技, 2006, (5): 40-41.
- [10] 韩桂春, 谷丰, 张忠臣. 淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨 [J]. 中国环境监测, 2005, (1): 55-57.
- [11] 赵萱. 消除淡水叶绿素 a 在 750 nm 波长浊度的方法 [J]. 江西农业, 2020, (10): 118.