

分光光度法测定叶绿素 a 的比较

童桂凤 陈志芳 范莹

(扬州市环境监测中心站 江苏 扬州 225007)

摘要: 比较了《水和废水监测分析方法》(第四版)和 ISO 10260: 1992(E) 中测定叶绿素 a 的典型方法, 结果表明两种方法的测定结果之间既存在显著性差异, 又有一定的相关性, 从提取方法、提取溶剂和计算公式等方面讨论了原因, 指出 ISO 方法提取效率更高, 操作更简便。

关键词: 叶绿素 a; 分光光度法; 水质

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2012)01-0053-03

Determination Comparison for Chlorophyll-a Concentration by Spectrophotometry

TONG Gui-feng, CHEN Zhi-fang, FAN Ying

(Yangzhou Environmental Monitoring Center, Yangzhou, Jiangsu 225007, China)

Abstract: The typical methods for chlorophyll test were compared between water and wastewater monitoring method (the fourth edition) and ISO 10260: 1992(E). The experiments showed that the test results both had a certain correlation and significant differences. ISO standard had high extraction efficiency and easy operation in the ways of extraction method, extraction solvent and calculation formula.

Key words: Chlorophyll-a; Spectrophotometry; Water quality

叶绿素是植物光合作用中的重要光合色素, 通过测定浮游植物叶绿素, 可以掌握水体的初级生产力状况^[1]。叶绿素 a 是估算藻类生物量及水体初级生产力的一个重要指标^[2], 在环境监测中通常将从浮游植物提取的叶绿素 a^[3-4] 作为湖泊富营养化的指标之一。

叶绿素 a 的测定主要采用分光光度法和荧光法。荧光法具有较高的灵敏度^[5], 但需要荧光光度计等精密仪器, 因而目前国内外一般采用分光光度法测定叶绿素 a。国内叶绿素 a 的测定方法主要有《叶绿素的测定(分光光度法)》(SL 88-1994)^[6], 以及《水和废水监测分析方法》(第四版)^[1] 和《湖泊富营养化调查规范》(第二版)^[2] 中推荐的方法; 国外叶绿素 a 测定的标准方法有 ISO 10260: 1992(E)^[7] 和法国 NF T90-117-1999^[8] 等。

国内外测定叶绿素 a 的典型方法分别为《水和废水监测分析方法》(第四版)中“叶绿素 a 的测定

(B)”(以下简称《四版》方法)和 ISO 10260: 1992(E)(以下简称 ISO 方法), 两种方法在细胞破碎、提取溶剂和提取方法等方面有所不同。今通过对两种方法测定结果和相关性的比较, 讨论其各自的适用性和优缺点, 以及方法之间的差异。

1 试验

1.1 试验原理

浓缩样品, 用有机溶剂提取样品中的叶绿素, 测量其吸光值。根据叶绿素 a 在特定波长处的吸收, 计算其质量浓度。

1.2 主要仪器与试剂

分光光度计; 组织研磨器; 台式离心机(最大转速 4 000 r/min); 水浴锅; 过滤装置: 过滤器、醋酸纤维滤膜、玻璃纤维滤膜、真空泵。

收稿日期: 2011-03-04; 修订日期: 2011-12-26

作者简介: 童桂凤(1971—), 女, 江苏泰州人, 高级工程师, 学士, 从事环境监测工作。

90% 丙酮溶液; 90% 乙醇溶液; 3.0 mol/L 盐酸溶液。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集与保存

用棕色玻璃瓶采集样品 样品采集后应立即处理。如不能立即处理 则在每升水样中添加 1 mL 10 g/L 碳酸镁溶液 于低温(2 °C ~ 5 °C) 保存在暗

$$\text{叶绿素 a (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11.64 \times (D_{663} - D_{750}) - 2.16 \times (D_{645} - D_{750}) + 0.10 \times (D_{630} - D_{750})] \times V_1}{V \times \delta}$$

式中, V 为水样体积(L); D 为吸光值; V_1 为提取液定容后的体积(mL); δ 为比色皿光程(cm)。

1.3.3 ISO 方法

(1) 过滤: 取一定体积混匀的水样, 用 1 μm 玻璃纤维滤膜过滤, 真空干燥滤膜。将干燥过的滤膜剪碎, 放入带聚四氟乙烯塞子的玻璃管中。

(2) ISO 方法 1 (研磨提取): 将预先加热到 75 °C 的 90% 乙醇溶液转移至装有滤膜的玻璃管中, 冷却后充分研磨, 静置提取 3 min 或更长时间。将过滤研磨后的混合液转移至 25 mL 容量瓶中, 定容待测。

(3) ISO 方法 2 (水浴提取): 准确移取一定体积的 90% 乙醇溶液, 置于装有滤膜的玻璃管中(乙醇溶液的体积以刚淹没滤膜为宜), 加塞后轻轻摇动。将玻璃管放入水浴中, 于 75 °C 加热 5 min 后取出, 冷却至室温, 过滤或离心, 转移至 25 mL 容量瓶中, 定容待测。

(4) 测定: 以 90% 乙醇溶液为空白, 分别于 665 nm 和 750 nm 波长处测量吸光值。移取

处, 避免日光直接照射, 最长可保存 8 h。

1.3.2 《四版》方法

测定步骤为: 用 0.45 μm 乙酸纤维滤膜过滤水样→低温干燥滤膜→用 90% 丙酮溶液充分研磨→离心→分别于 750 nm、663 nm、645 nm 和 630 nm 波长处测量吸光值, 具体操作参见文献[1]。

叶绿素 a (mg/m³) 的计算公式为:

0.01 mL 3.0 mol/L 盐酸溶液, 加入 10 mL 提取液中, 放置 5 min (最长不超过 30 min), 分别于 665 nm 和 750 nm 波长处测量吸光值。

(5) 计算公式:

$$\rho_c = \frac{(A - A_a)}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{10^3 V_e}{V_s d}$$

式中 ρ_c 为叶绿素 a 的质量浓度($\mu\text{g/L}$); $A = A_{665} - A_{750}$, 为酸化前的吸光值; $A_a = A_{665} - A_{750}$, 为酸化后的吸光值; V_e 为提取液体积(mL); V_s 为过滤样品体积(L); K_c 为叶绿素 a 的光谱吸收系数[82 L/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}$)] ; R 为被酸化后脱镁叶绿素转移的纯叶绿素 a 中 A/A_a 比率(1.7); d 为比色皿光学路径长度(cm)。

2 结果与讨论

2.1 测定结果比较

取湖泊水样, 分别用《四版》方法和 ISO 方法 2 平行测定 8 次, 叶绿素 a 的测定结果见表 1。

表 1 两种方法测定结果比较

Table 1 Comparison results of the two methods

方法	测定值 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{m}^{-3})$								平均值 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{m}^{-3})$	标准偏差 $\rho/(\text{mg} \cdot \text{m}^{-3})$	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5	6	7	8			
《四版》方法	55.6	56.9	55.1	56.8	57.2	55.9	55.8	57.2	56.3	0.81	1.4
ISO 方法 2	62.1	64.7	67.0	69.3	68.2	68.3	67.3	69.5	67.0	2.51	3.7

ISO 方法 1 采用研磨提取, 标准偏差高于采用水浴提取的 ISO 方法 2。因此, 该试验将《四版》方法与 ISO 方法 2 比较。由表 1 可见, 《四版》方法的标准偏差低于 ISO 方法 2, 说明《四版》方法精密度高, 数据离散程度低; 而《四版》方法的测定平均值比 ISO 方法 2 低 10.7 mg/m^3 , 平均值的相对偏差接近 8.7%。用 t 检验法作检验, 给定置信度

95%, 计算 t 值为 4.677, 远大于 $t_{0.05(7)}$ 值 2.365, 说明两种方法的测定结果之间存在显著性差异。

2.2 方法的相关性

取不同质量浓度的样品, 分别用《四版》方法和 ISO 方法 2 测定, 两种方法测定结果的相对偏差在 3.2% ~ 8.0% 之间, 有较好的线性相关性, 相关系数高达 0.999, 回归方程为 $y = 1.07x + 3.64$ 。将

表 1 中《四版》方法的测定值乘以 1.19, 所得结果与 ISO 方法 2 比较接近, 说明两种方法的测定结果之间存在一定的相关性。两种方法对叶绿素 a 测定结果的相关性见图 1。

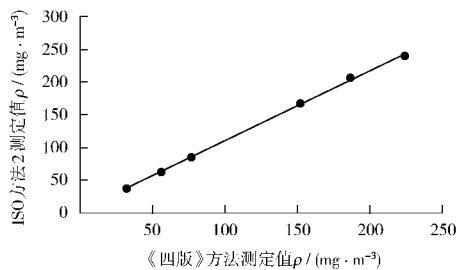


图 1 两种方法对叶绿素 a 测定结果的相关性

Fig. 1 Result correlation of the two methods for Chlorophyll-a tests

2.3 讨论

《四版》方法和 ISO 方法 2 的测定结果之间存在显著性差异, 同时又存在一定的相关性, 这与提取方法、提取步骤及计算公式有一定关系。

叶绿素 a 的分子式为 $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$, 分子结构由 4 个吡咯环通过 4 个甲烯基(=CH-)连接, 形成环状结构, 卟啉环中央结合着 1 个镁原子。叶绿素色素所处的环境具微碱性, 在酸性条件下, 叶绿素分子很容易失去卟啉环中的镁而成为脱镁叶绿素。《四版》方法在提取叶绿素的过程中反复研磨, 易使细胞结构遭到破坏, 细胞液(具微酸性)流出。如果分析过程中加入的碳酸镁不能完全、均匀地中和酸性细胞液, 则会导致部分叶绿素的分子结构遭到破坏, 使叶绿素失镁, 造成测定值偏低。同时, 在样品研磨过程中, 若不能完全将细胞磨碎, 影响叶绿素 a 的提取效率, 则会使测定值偏低。另外, 《四版》方法反复研磨、离心及转移, 操作繁琐且时间较长, 提取液易损失, 也易造成结果偏低。

叶绿体色素在不同溶剂中的吸收光谱有差异, 使用不同溶剂提取, 计算公式不同, 会导致测定值在有差异的同时又存在一定的相关性。《四版》方法以 90% 丙酮溶液提取, 叶绿素于 645 nm、663 nm 和 630 nm 处均有吸收。叶绿素 a 在 645 nm 处的吸光系数较小, 为 16.75, 在 663 nm 处的吸光系数较大, 为 82.04; 叶绿素 b 在 645 nm 和 663 nm 处均有吸收, 在 645 nm 处的吸光系数较大, 为 45.60, 在 663 nm 处的吸光系数较小, 为 9.27。根

据朗伯 - 比尔定律, 扣除悬浮物质的干扰(750 nm), 即可得到《四版》方法中叶绿素 a 的计算公式。ISO 方法 2 以 90% 乙醇溶液提取叶绿素, 叶绿素 a 主要在 665 nm 处有最大吸收峰。根据叶绿素分子在酸性条件下很容易失去卟啉环中的镁而成为脱镁叶绿素的性质, 在测定叶绿素 a 时加盐酸酸化, 测定结果即为酸化前测定值减去酸化后测定值, 同时根据叶绿素 a 光谱吸收系数及被酸化后脱镁叶绿素转移的纯叶绿素 a 中 A/A_a 的比率, 即可得到 ISO 方法 2 中叶绿素 a 的计算公式。

3 结语

《四版》方法采用低温冻结后慢慢融化、破碎细胞, 再用丙酮研磨提取叶绿素。在研磨过程中, 叶绿素 a 易在酸性细胞液中脱镁, 或因研磨不完全而导致测定结果偏低。样品前处理时需要反复研磨、提取和离心, 比色时需要测量较多波段, 操作过程比较繁琐, 费时耗力。采用的提取溶剂丙酮极易挥发, 低毒, 对人体神经系统有麻醉作用, 对黏膜有刺激作用。ISO 方法 2 采用 75 °C 水浴、90% 乙醇溶液直接提取, 从统计意义上来说, 用乙醇提取浮游植物中的叶绿素 a 较丙酮提取更完全。与《四版》方法相比, ISO 方法 2 的试验条件容易控制, 操作过程简便, 低毒害, 提取效率较高。

[参考文献]

- [1] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 670 - 671.
- [2] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 2 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [3] 张如美, 孙晓斌. 对叶绿素 a 测定方法的改进[J]. 环境监测管理与技术, 2002, 14(2): 31.
- [4] 李胜生, 董元华, 刘云, 等. 微囊藻中叶绿素 a 提取方法的优化[J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20(4): 43 - 45.
- [5] 孙力. 荧光法与分光光度法测定叶绿素 a 的对比试验[J]. 安徽化工, 2003, 125(5): 46 - 47.
- [6] 中华人民共和国水利部. SL 88 - 1994 叶绿素的测定(分光光度法)[S]. 北京: 中国水利水电出版社, 1995.
- [7] ISO 10260: 1992(E), Water quality—Measurement of biochemical parameters—Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration[S].
- [8] NF T90 - 117 - 1999, Water quality—Determination of chlorophyll-a and pheopigments index—Molecular absorption spectrometric method[S].

本栏目责任编辑 姚朝英