



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 897-2017

水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法

Water quality—Determination of chlorophyll a

—Spectrophotometric method

(发布稿)

本电子版为发布稿。请以中国环境出版社出版的正式标准文本为准。

2017-12-21 发布

2018-02-01 实施

环 境 保 护 部 发 布

目 次

前 言.....	ii
1 适用范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 方法原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器和设备.....	2
6 样品.....	2
7 分析步骤.....	3
8 结果计算与表示.....	4
9 精密度和准确度.....	4
10 质量保证和质量控制.....	5
11 废物处理.....	5

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，规范水中叶绿素a的测定方法，制定本标准。

本标准规定了测定地表水中叶绿素a的分光光度法。

本标准首次发布。

本标准由环境保护部环境监测司和科技标准司组织制订。

本标准起草单位：辽宁省环境监测实验中心。

本标准验证单位：上海市环境监测中心、大连市环境监测中心、丹东市环境监测中心站、辽阳市环境监测站、朝阳市环境监测中心站和辽宁北方环境检测技术有限公司。

本标准环境保护部2017年12月21日批准。

本标准自2018年2月1日起实施。

本标准由环境保护部解释。

水质 叶绿素a的测定 分光光度法

警告：丙酮对人体健康有一定危害，操作时应在通风橱中进行，佩戴防护器具，避免接触皮肤和衣物。

1 适用范围

本标准规定了测定水中叶绿素 a 的分光光度法。

本标准适用于地表水中叶绿素 a 的测定。

本标准测定丙酮提取液中叶绿素 a 的检出限为 0.04 mg/L。当取样体积为 200 ml，丙酮提取液体积为 10 ml 时，本方法的检出限为 2 μg/L，测定下限为 8 μg/L。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是不注日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

GB/T 14581 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ 494 水质 采样技术指导

HJ/T 91 地表水和污水监测技术规范

3 方法原理

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，离心分离后分别于 750 nm、664 nm、647 nm 和 630 nm 波长处测定提取液吸光度，根据公式计算水中叶绿素 a 的浓度。

4 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准和分析纯试剂，实验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。

4.1 丙酮（ CH_3COCH_3 ）。

4.2 碳酸镁（ MgCO_3 ）。

4.3 丙酮溶液：9+1。

在 900 ml 丙酮（4.1）中加入 100 ml 实验用水。

4.4 碳酸镁悬浊液。

称取 1.0 g 碳酸镁（4.2），加入 100 ml 实验用水，搅拌成悬浊液（使用前充分摇匀）。

4.5 玻璃纤维滤膜：直径 47 mm，孔径为 0.45 μm~0.7 μm。

5 仪器和设备

- 5.1 采样瓶：1 L 或 500 ml 具磨口塞的棕色玻璃瓶。
- 5.2 过滤装置：配真空泵和玻璃砂芯过滤装置。
- 5.3 研磨装置：玻璃研钵或其他组织研磨器。
- 5.4 离心机：相对离心力可达到 $1000 \times g$ （转速 3000 r/min~4000 r/min）。
- 5.5 玻璃刻度离心管：15 ml，旋盖材质不与丙酮反应。
- 5.6 可见分光光度计：配 10 mm 石英比色皿。
- 5.7 针式滤器：0.45 μm 聚四氟乙烯有机相针式滤器。
- 5.8 一般实验室常用仪器和设备。

6 样品

6.1 样品采集

按照 GB/T 14581、HJ/T 91 和 HJ 494 中的相关规定进行样品的采集。样品的采集一般使用有机玻璃采水器或其他适当的采样器采集水面下 0.5 m 样品，湖泊、水库根据需要可进行分层采样或混合采样，采样体积为 1 L 或 500 ml。如果样品中含沉降性固体（如泥沙等），应将样品摇匀后倒入 2 L 量筒，避光静置 30 min，取水面下 5 cm 样品，转移至采样瓶（5.1）。在每升样品中加入 1 ml 碳酸镁悬浊液（4.4），以防止酸化引起色素溶解。

注：如果水深不足 0.5 m，在水深 1/2 处采集样品，但不得混入水面漂浮物。

6.2 样品保存

样品采集后应在 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存、运输，24 h 内运送至检测实验室过滤（若样品 24 h 内不能送达检测实验室，应现场过滤，滤膜避光冷冻运输），样品滤膜于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，14 d 内分析完毕。

注：样品采集后，如条件允许，宜尽快分析完毕。

6.3 试样的制备

6.3.1 过滤

在过滤装置（5.2）上装好玻璃纤维滤膜（4.5）。根据水体的营养状态确定取样体积，见表 1，用量筒量取一定体积的混匀样品，进行过滤，最后用少量蒸馏水冲洗滤器壁。过滤时负压不超过 50 kPa，在样品刚刚完全通过滤膜时结束抽滤，用镊子将滤膜取出，将有样品的一面对折，用滤纸吸干滤膜水分。

注：仅当富营养化水体的样品无法通过玻璃纤维滤膜时，可采用离心法浓缩样品，但转移过程中应保证提取效率，避免叶绿素 a 的损失及水分对丙酮溶液浓度的影响。

表 1 参考过滤样品体积

营养状态	富营养	中营养	贫营养
过滤体积 (ml)	100~200		500~1000

6.3.2 研磨

将样品滤膜放置于研磨装置（5.3）中，加入 3 ml~4 ml 丙酮溶液（4.3），研磨至糊状。补加 3 ml~4 ml 丙酮溶液（4.3），继续研磨，并重复 1~2 次，保证充分研磨 5 min 以上。将完全破碎后的细胞提取液转移至玻璃刻度离心管（5.5）中，用丙酮溶液（4.3）冲洗研钵及研磨杵，一并转入离心管中，定容至 10 ml。

注：叶绿素对光及酸性物质敏感，实验室光线应尽量微弱，能进行分析操作即可，所有器皿不能用酸浸泡或洗涤。

6.3.3 浸泡提取

将离心管中的研磨提取液充分振荡混匀后，用铝箔包好，放置于 4 °C 避光浸泡提取 2 h 以上，不超过 24 h。在浸泡过程中要颠倒摇匀 2~3 次。

6.3.4 离心

将离心管放入离心机（5.4），以相对离心力 $1000 \times g$ （转速 3000 r/min~4000 r/min）离心 10 min。然后用针式滤器（5.7）过滤上清液得到叶绿素 a 的丙酮提取液（试样）待测。

6.4 空白试样的制备

用实验用水按照与试样的制备（6.3）相同的步骤进行实验室空白试样的制备。

7 分析步骤

7.1 试样测定

将试样移至比色皿中，以丙酮溶液（4.3）为参比溶液，于波长 750 nm、664 nm、647 nm、630 nm 处测量吸光度。

750 nm 波长处的吸光度应小于 0.005，否则需重新用针式滤器（5.7）过滤后测定。

7.2 空白试验

按照与试样测定（7.1）相同的步骤进行实验室空白试样（6.4）的测定。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

试样中叶绿素 a 的质量浓度 (mg/L), 按照公式 (1) 进行计算:

$$\rho_1 = 11.85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1.54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0.08 \times (A_{630} - A_{750}) \quad (1)$$

式中: ρ_1 ——试样中叶绿素 a 的质量浓度, mg/L;

A_{664} ——试样在 664 nm 波长下的吸光度值;

A_{647} ——试样在 647 nm 波长下的吸光度值;

A_{630} ——试样在 630 nm 波长下的吸光度值;

A_{750} ——试样在 750 nm 波长下的吸光度值。

样品中叶绿素 a 的质量浓度 ($\mu\text{g/L}$), 按照公式 (2) 进行计算:

$$\rho = \frac{\rho_1 \cdot V_1}{V} \quad (2)$$

式中: ρ ——样品中叶绿素 a 的质量浓度, $\mu\text{g/L}$;

ρ_1 ——试样中叶绿素 a 的质量浓度, mg/L;

V_1 ——试样的定容体积, ml;

V ——取样体积, L。

8.2 结果表示

当测定结果小于 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 保留至整数位; 当测定结果大于等于 100 $\mu\text{g/L}$ 时, 保留三位有效数字。

9 精密度和准确度

9.1 精密度

六家实验室对叶绿素 a 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、11 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 的统一地表水样品进行了 6 次重复测定, 实验室内相对标准偏差分别为: 5.6%~11%, 3.1%~6.0%, 1.8%~5.0%; 实验室间相对标准偏差分别为: 5.2%, 8.9%, 5.9%; 重复性限为: 2 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$, 3 $\mu\text{g/L}$ 。再现性限为: 2 $\mu\text{g/L}$, 4 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$ 。

9.2 准确度

六家实验室对含叶绿素 a 浓度为 11 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 的统一地表水样品进行叶绿素 a 纯品溶液加标测定, 加标量为 9 $\mu\text{g/L}$ 、28 $\mu\text{g/L}$, 加标回收率范围为 83.6%~95.9%和 79.9%~92.0%, 加标回收率最终值为 89.2% \pm 10.8%; 86.3% \pm 8.8%。

10 质量保证和质量控制

10.1 空白试验

每批样品应至少做一个实验室空白试验，其测定结果应低于方法检出限。

10.2 平行样测定

每批样品应至少测定 10%的平行双样。样品数量少于 10 个时，应至少测定一个平行双样，测定结果的相对偏差应 $\leq 20\%$ 。

11 废物处理

实验室过程中产生的废液，应集中收集，并做好相应标识，委托有资质的单位处理。
