



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ□□□-201□

水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法

Water quality-Determination of chlorophyll a-Spectrophotometric method

(征求意见稿)

201□-□□-□□发布

201□-□□-□□实施

环 境 保 护 部 发布

希科检测
www.cirs-ck.com
咨询热线：4006-721-723
邮箱：test@cirs-group.com

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.....	1
6 样品	2
7 分析步骤.....	3
8 结果计算与表示.....	3
9 精密度和准确度.....	3
10 质量保证和质量控制.....	4
11 废物处理.....	4
12 注意事项.....	4

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。

本标准为首次发布。

本标准由环境保护部科技标准司组织制订。

本标准主要起草单位：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、辽宁北方环境检测技术有限公司。

本标准环境保护部 201□年□□月□□日批准。

本标准自 201□年□□月□□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，样品操作尽量在通风柜内进行，应做好个人防护措施，废液妥善安全处理。

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。

当水样体积为 200ml，使用 10mm 比色皿时，本方法的检出限为 1.5 μ g/L，测定下限为 6.0 μ g/L。

2 规范性引用文件

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

GB/T14581 水质湖泊和水库采样技术指导

HJ493 水质样品的保存和管理技术规定

HJ494 水质采样技术指导

HJ/T91 地表水和污水监测技术规范

3 方法原理

将一定量水样用玻璃纤维滤膜过滤，以 90%丙酮为提取液研磨提取水中的叶绿素，离心后测定其 750nm、664nm、647nm、630nm 波长下的吸光度值，计算叶绿素 a 的含量。

4 试剂和材料

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

4.1 丙酮：分析纯或色谱纯。

4.2 丙酮溶液： φ (CH₃COCH₃) =90%

在 900ml 丙酮（4.1）中加入 100ml 去离子水。

4.3 碳酸镁：粉末状

4.4 碳酸镁悬浊液： ω (MgCO₃) =1%

称取 1.0g 碳酸镁（4.3），加入 100ml 去离子水，搅拌成悬浊液（使用前充分摇匀）。

4.5 滤膜：玻璃纤维滤膜(孔径为 0.7 μ m)。

5 仪器和设备

5.1 采样瓶：1L 或 2L 具磨口塞的棕色玻璃细口瓶或深色聚乙烯瓶。

5.2 分光光度计。

5.3 离心机：转速 4000r/min。

5.4 玻璃抽滤器。

- 5.5 真空泵。
- 5.6 比色皿：10mm。
- 5.7 具塞玻璃离心管：体积为 15ml，旋盖以不与丙酮反应为宜。
- 5.8 玻璃组织研磨器、玻璃研钵或其他组织细胞破碎器。
- 5.9 符合国家标准的 A 级玻璃量器：量筒（100ml、250ml、500ml）、棕色容量瓶（10ml）。
- 5.10 针式滤器：0.45 μ m 聚四氟乙烯有机相针式滤器。
- 5.11 培养皿。
- 5.12 铝箔。

6 样品

6.1 样品的采集

按照 HJ/T 91 和 HJ 494 要求采集水样。采样时，可根据需要进行分层采样或混合采样。采样体积通常为 1L 或 2L，贫营养型水体可适当增加采样量。如果水样中含沉降性固体如泥沙等，应将水样摇匀后倒入筒形玻璃容器如 2L 量筒，铝箔避光，静置 30min。将上层水样转移至棕色硬质玻璃瓶。

6.2 样品的保存

按照 HJ 493 要求保存水样。水样采集后在每升水样中加入 1ml 碳酸镁悬浊液（4.4），以防止酸化引起色素溶解。水样应避免日光直射（铝箔避光），0~4℃暗处可保存 24h。如果有条件可现场过滤。样品滤膜于 -18℃暗处可保存 14 天。

6.3 试样的制备

6.3.1 过滤

将滤膜放置在连接有真空泵的玻璃抽滤器上，根据水体营养状态，准确量取定量体积的混匀水样进行抽滤（参考过滤水样体积见表 1），抽滤时负压不超过 50KPa，逐渐减压，在水样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。

表 1 参考过滤水样体积

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

6.3.2 研磨

将抽滤后的样品滤膜放置于玻璃研钵（其他组织研磨器）中，加入 0.01g~0.02g 碳酸镁（4.3）及 3~4ml 丙酮溶液（4.2），充分研磨至糊状。补加 3~4ml 丙酮溶液（4.2）继续研磨，并重复 1~2 次，保证研磨时间 5~10min。将完全破碎后的细胞提取液转移至容量瓶中，用丙酮溶液（4.2）冲洗研磨器及研磨杵，一并转入容量瓶中，定容至 10ml。

6.3.3 浸泡提取

将研磨提取液转移至具塞玻璃离心管中，盖紧塞帽，充分震荡混匀后，放置于 4℃暗处浸泡提取。浸泡时间 2h 以上，不超过 24h。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中，以 4000r/min 的速度离心 10min。将上清液过 0.45 μ m 有机相针

式滤器，待测。

6.4 空白试样的制备

每次实验应做实验室空白。用实验用蒸馏水代替水样，按照样品分析全过程进行测定，步骤参照 6.3.1~6.3.4。

7 分析步骤

7.1 样品测定

将上清液转移至 10mm 比色皿中，以 90%丙酮溶液作参比溶液，测定 750nm、664nm、647nm、630nm 波长处的吸光度值。750nm 波长处的吸光度值应小于 0.005，否则需要用针式滤器过滤或重新离心。

7.2 空白测定

按照与样品测定（7.1）相同步骤测定空白试样的吸光度。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

按公式（1）计算提取液中叶绿素 a 的质量浓度：

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

按公式（2）计算水样中叶绿素 a 的质量浓度：

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

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

ρ_1 ——提取液中叶绿素 a 的质量浓度， mg/L ；

A_{664} ——提取液在 664nm 波长下的吸光度值；

A_{647} ——提取液在 647nm 波长下的吸光度值；

A_{630} ——提取液在 630nm 波长下的吸光度值；

A_{750} ——提取液在 750nm 波长下的吸光度值；

V_1 ——提取液的定容体积， ml ；

δ ——比色皿光程， cm ；

V ——水样体积， L ；

8.2 结果表示

测定结果小于 $10.0\mu\text{g/L}$ 时，结果保留小数点后一位；测定结果大于等于 $10.0\mu\text{g/L}$ 时，结果保留三位有效数字。

9 精密度和准确度

9.1 精密度

6 个实验室对含叶绿素 a 浓度为 $5.3\mu\text{g/L}$ 、 $11.2\mu\text{g/L}$ 、 $25.4\mu\text{g/L}$ 的统一地表水样品进行了测定：实验室内相对标准偏差分别为： $5.6\%\sim 11.1\%$ ， $3.1\%\sim 6.0\%$ ， $1.8\%\sim 5.0\%$ ；实验室间相对

标准偏差分别为：4.4%，8.9%，5.9%；重复性限为：1.3μg/L，1.4μg/L，2.5μg/L。再现性限为：1.5μg/L，3.1μg/L，4.8μg/L。

9.2 准确度

6个实验室对含叶绿素a浓度为11.2μg/L、25.4μg/L的统一地表水样品进行加标分析测定，加标量为9.2μg/L、27.7μg/L，加标回收率为83.6%~95.9%和79.9%~92.0%，加标回收率最终值为89.2±10.8%；86.3±8.8%。

10 质量保证和质量控制

10.1 空白实验

每批次样品（不超过20个样品）至少应做一个实验室空白，测定结果应低于方法检出限。当实验室空白高于方法检出限时，应仔细查找干扰源，及时消除，至实验室空白分析合格后，才能继续进行样品分析。

10.2 平行样品

每批样品应至少测定10%的平行双样。样品数量少于10，应至少测定一个平行双样，测定结果相对偏差应小于20%。

11 废物处理

实验室应由专人负责废物的收集、处理和管理工作，应按废弃物类别备有相应的收集容器，收集容器上应有明显标识，定期交给有资质的单位进行处理。

12 注意事项

12.1 丙酮对人体健康有一定危害，废液应妥善安全处理。

12.2 使用的玻璃器皿和比色皿均应清洁、干燥，不应用酸浸泡或洗涤。

12.3 由于叶绿素对光敏感，应严格控制水样的保存时间及方法。样品应尽快分析，且所有操作应在低温、弱光条件下进行，实验室最好配有遮光帘。

12.4 比色皿应用90%的丙酮溶液进行校正后再进行测试。

12.5 离心上清液在750nm波长处的吸光度值应小于0.005，否则需要重新离心或用有机针式滤器过滤。

12.6 为保证叶绿素的提取效率，应充分研磨样品滤膜。

12.7 实验室试剂、玻璃器具等会对分析产生影响，可以通过实验室空白进行检验。