

## 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨\*

陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

**摘要:** 详细介绍了一种国际上通用的浮游植物叶绿素 a 测定方法—热乙醇萃取法, 并根据文献记载和作者多年的实践经验, 对这种测定方法可能产生的误差进行全面的探讨, 为国内水环境研究人员尽快掌握这种方法提供了科学的参考。

**关键词:** 浮游植物; 叶绿素 a; 热乙醇萃取法; 误差

### Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using hot-ethanol extraction method

CHEN Yuwei, CHEN Kaining & HU Yaohui

(Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)

**Abstract:** Hot-ethanol extraction method is a widely used method in the world to determine phytoplankton chlorophyll-a concentration. This paper aims to introduce the hot-ethanol extraction method in detail to all the scientists dealing with aquatic environment research in China. By experience from the authors, possible error during the operation of the analysis was discussed.

**Keywords:** phytoplankton; chlorophyll-a; hot-ethanol extraction method; error

浮游植物的种群生物量(Phytoplankton biomass)是水生生态系统研究的一个重要指标, 而浮游植物叶绿素 a 含量通常可以用来快速估算种群生物量, 因此浮游植物叶绿素 a 含量的测定成为浮游植物生物量的重要指标而被广泛应用<sup>[1]</sup>。

浮游植物叶绿素 a 的测定方法有许多种, 根据所使用的仪器可以分为高效液相色谱法(HPLC法)、荧光光度计法和分光光度计法等<sup>[2]</sup>。高效液相色谱法<sup>[3]</sup>能够很精确地测定各种光合色素的含量, 但由于仪器昂贵, 分析操作步骤繁琐, 一般不能用于野外大量样品的快速分析。荧光光度计也能够精确地测定叶绿素 a 的含量, 特别是能够测定叶绿素含量较低的样品, 但由于分析过程中容易受其他色素或色素衍生物的干扰, 也不利于快速分析各种不同的野外样品<sup>[4,5]</sup>。因此, 分光光度计法成为最常用的浮游植物叶绿素 a 的测定方法。在所有分光光度计法中, 根据所用的色素萃取液分为了丙酮法、甲醇法和乙醇法等, 再根据比色所用的波长, 又分为单色法和多色法(例如单色丙酮法和四色丙酮法)等<sup>[6]</sup>。

自从 Strickland 和 Parsons<sup>[7]</sup> 首先用 90% 丙酮作为萃取剂分析浮游植物叶绿素 a 含量以来, 有大量的研究进行针对性的方法改进。尽管丙酮现在仍广泛用于实际分析中, 但由于丙酮的萃取效率比较差, 特别是对蓝藻的叶绿素 a 的萃取效率比较低, 使得甲醇和乙醇成为替代丙酮的色素萃取剂。不过, 甲醇对人体毒害性大, 且在酸化过程中容易产生误差<sup>[8]</sup>, 于是, 乙醇成为现在广泛应用的叶绿素 a 萃取剂。Jespersen 和 Christoffersen<sup>[1]</sup> 较系统地比较了乙醇, 甲醇和丙酮作为叶绿素萃取液的优缺点, 特别是比较了用乙醇作为萃取剂在不同浓度梯度(96% - 83.5%), 不同的萃取时间(6 - 24 h)以及不同的萃取温度(20℃和70℃)下的萃取效率, 为热乙醇萃取法的推广应用提供了较好的理论基础。

近 30 年来, 由于中国水环境的恶化, 特别是水体富营养化的问题, 使得浮游植物叶绿素 a 的测定被广

\* 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目, 2002CB412305)和国家自然科学基金(30200037)联合资助。2005 - 07 - 12 收稿; 2006 - 04 - 02 收修改稿。陈宇炜, 男, 1969 年生, 博士, 副研究员; E-mail: ywchen@niglas.ac.cn.

泛地应用. 但各研究单位所用的测定方法不尽相同, 使数据的精确性和可比性受到影响. 王建和王骥<sup>[9]</sup>最先向国内介绍了丙酮分光光度法测定浮游植物叶绿素 a, 使丙酮法成为国内应用最广泛的叶绿素 a 测定方法. 陈宇炜和高锡云<sup>[10]</sup>比较了丙酮法和乙醇法的差异, 初次介绍了热乙醇萃取法. 本文就是在此基础上, 详细介绍了浮游植物叶绿素 a 测定的热乙醇萃取分光光度法的操作步骤, 并根据多年的实践和文献的记载, 提出一些常见实验误差的种类并探讨了避免误差的办法. 期望热乙醇萃取法能够尽快为国内进行水环境研究的同行所采用, 以便提高浮游植物叶绿素 a 测定的精确性和数据的可比性.

## 1 材料和方法

### 1.1 样品准备

过滤一定体积( $V_{\text{样品}}$ )的水样(根据样品中叶绿素含量决定, 一般富营养化水体需要 250 ml, 贫营养水体需要 1000 - 2000 ml), 将滤膜向内对折, 放入 5 ml 的离心管, 保存在零下 20℃ 的冰柜(或冰箱的冷冻室)中. 为保证样品完全冷冻, 至少一昼夜后才能萃取测定. 此冷冻样品最长保存 3 个月.

### 1.2 主要材料

抽滤设备(低压真空泵)、抽滤器(47 mm 不锈钢或有机玻璃抽滤器)、滤膜(直径 47 mm Whatman GF/C 或 GF/F 47 mm 玻璃纤维滤膜(最佳), 或国产 0.45 微米孔径混合纤维滤膜; 直径 25 mm Whatman GF/F 玻璃纤维滤膜)、可调节控温水浴锅、90% 乙醇、721 型分光光度计(或同类产品).

### 1.3 萃取

取 250 ml 玻璃三角瓶装适量 90% 乙醇在控温水浴锅中预热, 水浴温度 80 - 85℃ (每个样品需要约 12 ml 乙醇); 取出样品, 立即加入 4 ml 左右热乙醇, 水浴 2 min. 再将萃取的样品放到室温下避光处, 样品萃取 4 - 6 h, 最长不超过 12 h. 萃取结束后, 用 25 mm 玻璃纤维滤膜过滤萃取液并定容至 10 ml.

### 1.4 比色

上述 10 ml 叶绿素样品萃取液在分光光度计上用 90% 乙醇作为参比液进行比色. 先在 665 nm 波长测消光率  $E_{665}$ , 再在 750 nm 波长测消光率  $E_{750}$ . 然后在样品比色皿中加 1 滴 1 mol/L 盐酸进行酸化, 加盖摇匀, 1 min 后重新在 665 nm 波长测消光率  $A_{665}$ , 再在 750 nm 波长测消光率  $A_{750}$ .

### 1.5 叶绿素计算公式<sup>[11]</sup>

$$Chla = 27.9 V_{\text{乙醇}} [(E_{665} - E_{750}) - (A_{665} - A_{750})] / V_{\text{样品}}$$

其中,  $Chla$  指叶绿素 a 浓度( $\text{mg}/\text{m}^3$ ).  $V_{\text{乙醇}}$  是萃取液定容的体积(ml);  $V_{\text{样品}}$  是过滤水样的体积(L).

## 2 结果和讨论

### 2.1 叶绿素 a 测定过程中的注意事项

水样过滤时, 要避免在阳光直射处、高温环境或接触酸性物质; 避免用过高的真空压力(最好低于 0.3 个大气压), 以免样品细胞被破坏或穿过滤膜流失. 过滤后要立即冷冻保存, 避免与酸性物质一起冷冻保存. 在热乙醇萃取时要防止过热液体暴沸冲出离心管(一般情况下乙醇的沸点在 81℃). 此外, 所有器具要避免酸污染. 热萃取后的 4 - 6 h 常温萃取一定要在黑暗中, 时间不能超过 12 h. 比色时, 酸化在比色皿中进行, 盐酸的量不能多(1 滴), 否则会因为冲稀萃取液而导致测定误差.

### 2.2 直接发现误差的若干方法

$E_{750}$  和  $A_{750}$  的读数大于 0.02, 表明萃取液 25 mm 过滤出问题, 滤液太浑浊, 需要重新过滤; 若读数小于 0.01, 表明萃取液中叶绿素浓度过低, 在样品过滤时要适当增加体积; 读数大于 0.50, 则表明叶绿素浓度过高, 过滤时要适当减少体积.  $(E_{665} - E_{750}) / (A_{665} - A_{750})$  的比值大于 1.7, 表明萃取液酸化不够, 可能盐酸失效, 需重新配制, 重新测定. 对于一般的富营养化水体, 叶绿素 a 浓度应该在 10 - 100  $\text{mg}/\text{m}^3$  范围内, 如果超出这个范围, 特别是数量级上的差异, 要检查各步骤, 是否有误操作或误计算.

### 2.3 叶绿素 a 测定的误差探讨

由于浮游植物叶绿素 a 的测定步骤较多, 造成人为误差的机会就很大. 叶绿素 a 又是对光、酸性物质和温度比较敏感, 在操作过程中特别要避免这些因素的影响. 建议在正式测定前做预实验, 平行测定 5 - 10 个

相同的样品,看误差范围.采样过程中也要相应采平行样,避免因操作不熟练而导致无法重复测定.

表1列举了操作过程中可能产生的误差和防止误差产生的处理方法.部分问题已经用比较实验得到证明,有些只是经验,尚有待进一步实验证实,在此提出来供相关研究人员探讨.

表1 浮游植物叶绿素 a 分析操作过程中可能的误差及解决方法

Tab. 1 Possible error during the phytoplankton chlorophyll-a analysis and its resolvent

分析操作步骤	误差来源	误差偏向	解决方法
样品采集和运输	样品长途运输	叶绿素 a 结果偏低	现场抽滤,用冰瓶运送带样品的滤膜
样品抽滤	滤膜的选择	不定	同系列样品采用相同型号和厂家的滤膜
	样品体积选择	不定	根据样品来源选择合适水样体积
	抽滤时间过长或真空泵负压过大	叶绿素 a 结果偏低	
样品保存	滤膜含水量过高	叶绿素 a 结果偏低	水样抽滤完成后,用定性滤纸吸干滤膜后再保存
	滤膜没有冷冻保存	叶绿素 a 结果偏低	零下 20℃ 保存
	样品保存时间过长	叶绿素 a 结果偏低	
叶绿素萃取	时间超过 12h	叶绿素 a 结果偏低	时间控制在 4 - 6h
比色	萃取液浑浊	不定	重新过滤萃取液
	酸化不完全	叶绿素 a 结果偏高,脱镁 叶绿素偏低或为负值	重新配制盐酸,酸化测定
	盐酸过量	叶绿素 a 结果偏高	重新测定,控制盐酸量
	分光光度计误差	不定	校正分光光度计

致谢:本文的部分内容得到了高锡云高级工程师和钱荣树工程师的帮助,奥地利科学院湖沼研究所的 Martin Dokulil 教授提供了关键的参考文献,特此表示感谢.

### 3 参考文献

- [1] Jespersen A M and Christoffersen K. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Arch Hydrobiol*, 1987, **109**: 445 - 454.
- [2] Wetzel R G and Likens G E eds. *Limnological analyses*, 3rd edition. New York: Springer, 2000.
- [3] Jacobsen T R. Comparison of chlorophyll a measurements by fluorometric, spectrophotometric and high pressure liquid chromatographic methods in aquatic environments. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*, 1982, **16**: 35 - 45.
- [4] Yentsch C S and Menzel D W. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res*, 1963, **10**: 221 - 231.
- [5] Neveux J and Panouse M. Spectrofluorometric determination of chlorophylls and pheophytins. *Arch. Hydrobiol*, 1987, **109**: 567 - 581.
- [6] APHA, AWWA 和 WPCF 联合编辑委员会著. 水和废水标准检测法. 北京:中国建筑工业出版社,1985.
- [7] Strickland J D H and Parsons T R. A practical handbook of seawater analyses. *Bull Fish Res Bd Can*, 1968, **167**: 154 - 166.
- [8] Marker A F H and Jinks S. The spectrophotometric analysis of chlorophylla and phaeopigments in acetone, ethanol and methanol. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*, 1982, **16**: 3 - 17.
- [9] 王建,王骥. 浮游植物叶绿素与脱镁叶绿素的测定方法. 武汉植物学研究, 1984, **2**: 321 - 328.
- [10] 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. 湖泊科学,2000, **12**: 185 - 188.
- [11] Lorenzen C J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr*, 1967, **12**: 343 - 346.