

中華民國國家標準	深層海水檢驗法－葉綠素 <i>a</i> 之測定	總號	15091-30
CNS		類號	N7001-30

Method of test for deep sea water – Determination of chlorophyll *a*

1. 適用範圍：本標準規定深層海水及天然海水葉綠素 *a* 濃度之檢驗。
2. 分析原理簡介：葉綠素 *a* 樣本的分析方法是依 Welschmeyer (1994)建議改良之不加酸螢光法進行，將適量之海水樣本過濾於玻璃纖維濾紙後，以 100%丙酮進行萃取，萃取液再以具有藍光光源之螢光光度計進行測量。
3. 器材及儀器
 - 3.1 過濾器材：真空過濾系統、過濾杯組、濾紙(玻璃纖維材質，平均孔徑約 0.7 μm ；Whatman GF/F 或同等級產品)、量筒、鏝子、包埋盒、錫箔紙。
 - 3.2 定容瓶：25 mL，6 支；50 mL，2 支。
 - 3.3 玻璃吸管：0.5、1、2、3、4 mL 各 1 支。
 - 3.4 離心試管：15 mL 錐形底，具螺紋蓋。
 - 3.5 高速離心機。
 - 3.6 恆溫振盪培養箱：具有可維持 4°C 的恆溫功能。
 - 3.7 分光光度計：可解析至 0.001 A 之分光光度計 1 台。
 - 3.8 吸光槽：光徑長 5 cm 或以上(石英或玻璃材質均可)。
 - 3.9 螢光光度計：激發光波長 436 nm，放射光波長 680 nm，光源為藍光(Turner Design 10-AU Fluorometer 或同等級品)。
 - 3.10 玻璃吸光試管：經特別篩選之玻璃試管(直徑 13 mm、體積 10 mL；Turner Design Company 或同等級品)。
4. 試劑及標準品
 - 4.1 丙酮(Acetone)：100%，層析級。
 - 4.2 葉綠素 *a* 標準品：不含葉綠素 *b* (Sigma Chemical Inc., #C6144 或同等級品)。
5. 樣品過濾及保存
 - 5.1 將適量體積之樣水(1000 mL 以上)過濾至濾紙上，真空壓力需小於 100mmHg，過濾後之濾紙樣本如未隨即進行萃取，則需將濾紙以錫箔紙包覆於包埋盒後，存放在溫度 -20°C 以下的冰箱或是液態氮桶中。
 - 5.2 濾紙樣本的保存不得超過 1 個月。
6. 標準儲備溶液的配製
 - 6.1 葉綠素 *a* 標準儲備溶液(S)：將葉綠素 *a* 標準品(約 1 mg)，以 100%丙酮溶解並定容至 50 mL，濃度(S)約為 20000 mg m^{-3} ($\mu\text{g/L}$)。此儲備溶液可保存於溫度 -20°C 以下之冰箱約 6 個月。
 - 6.2 葉綠素 *a* 工作溶液(W)：取葉綠素 *a* 標準儲備溶液(S) 10 mL，以 100%丙酮溶解並定

(共 3 頁)

公布日期
97 年 3 月 28 日

經濟部標準檢驗局印行

修訂公布日期
年 月 日

容至 50 mL，濃度約為 4000 mg m⁻³(μg/L)。此工作溶液於製作檢量線時配製。

7. 檢量線溶液的配製：以玻璃吸管吸取工作溶液(W)各 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL，並以 100%丙酮分別定容至 25 mL，濃度分別約為 80、160、320、480、640 mg m⁻³(μg/L)(WS_{1~5})。此檢量線溶液之真實濃度應依第 8 節標定結果修正。檢量線溶液也需於使用前才配製，濃度範圍可視樣本葉綠素 *a* 濃度及螢光光度計靈敏度的範圍調整。

8. 檢量線濃度之標定及計算

8.1 基線校正：將 100%丙酮倒入乾淨石英槽中，在分光光度計中進行 Baseline 歸零校正。

8.2 分別第 7 節所配製之檢量線溶液倒入吸光槽中，測量其在 662.7 nm 及 750 nm 波長下之吸光值(A_{662.7 nm}、A_{750 nm})，使用以下列公式即可計算出檢量線標準溶液葉綠素 *a* 之真實濃度(WS_i)。

$$WS_{i(i=1\sim5)} \text{ (mg m}^{-3}\text{) (}\mu\text{g/L)} = \frac{(A_{662.7\text{nm}} - A_{750\text{nm}})}{\varepsilon \times b} \times 10^6$$

ε : specific extinction coefficient, 88.15 L g⁻¹ cm⁻¹ (Jeffrey-Humphrey, 1975)。

b : 石英吸光槽長度(cm)。

9. 標準曲線的製作：將空白液(100%丙酮溶液)及檢量線溶液倒入玻璃吸光試管中，並將試管置入螢光光度計中，分別量測出空白螢光值(F_{bk})及各檢量線溶液之螢光值(F)。利用下列無截距之一元二次方程式進行統計迴歸，即可獲得葉綠素 *a* 濃度(Chl *a*)與螢光值(F)之相關式。

$$Y = a \times X + b \times X^2$$

Y : 經第 8 節標定後之檢量線溶液葉綠素 *a* 之濃度。

X : 利用螢光光度計量測到之各檢量線溶液扣除丙酮螢光空白值後之螢光值(F-F_{bk})。

a, b : 是統計迴歸得到之係數。

10. 樣本之萃取及分析

10.1 在暗室中，將濾紙樣本放入 15 mL 的離心試管中，加入 100%丙酮 5 mL，以研磨棒攪碎成泥狀後，再以 5 mL 100%丙酮將殘存在研磨棒上的濾紙泥潤洗至離心試管內，旋緊螺旋蓋，再將樣本放入 4 °C 的恆溫震盪培養箱萃取約 8 小時。(在處理下一個濾紙樣本前，研磨棒需用丙酮潤洗拭淨)。

10.2 萃取後之樣本先回溫至室溫，以高速離心機(4000 r.p.m 或 1000×g)離心約 2 分鐘後，取 5 mL 上澄液倒入玻璃吸光試管中，用螢光光度計量得樣本之螢光值。

11. 樣本濃度計算方式：經萃取後之樣本於螢光光度計下量測到螢光值(F)後，可依下列公式計算出原來海水樣本所含之葉綠素 *a* 濃度(Chl *a*)。

$$\text{Chl } a \text{ (mg m}^{-3}\text{) (}\mu\text{g/L)} = [a \times (F - F_{\text{bk}}) + b \times (F - F_{\text{bk}})^2] / D$$

F-F_{bk} : 實測萃取樣本螢光值扣除丙酮螢光空白值。

a, b : 檢量線與螢光值相關曲線之迴歸係數。

D：濃縮倍率=過濾樣本體積(mL)/10。

12. 本方法偵測極限：0.01 mg m⁻³(μg/L)。

備考：深層海水泛指位於海平面 200 公尺以下之海水，圖 1 為台灣東部深水海域使用本方法實測之海水葉綠素 a 隨深度之變化情形。

圖 1 台灣東岸台東知本深層海水葉綠素 a 濃度(Chl a)隨深度變化之檢驗實例(現場採樣日期、位置與海底深度：2006 年 10 月 12 日、121.0510°E；22.6275°N、670 m)。

