

# 乙醇替代丙酮测定水中叶绿素a的优化实验研究

朱攀, 冯如\*, 李金玥, 梁友福, 樊丽芳, 封瑛, 康群

湖北大学资源环境学院, 湖北 武汉

收稿日期: 2022年9月21日; 录用日期: 2022年10月20日; 发布日期: 2022年10月27日

## 摘要

叶绿素a是评价水体富营养化的重要指标, 多所高校的环境类专业开设了“丙酮-分光光度法测定水中叶绿素a含量”的本科教学实验。丙酮具有较强挥发性和一定毒性, 具有特殊气味, 在使用中可能对实验人员造成危害, 增加了实验成本和风险性。为了倡导绿色化学, 针对这一问题本文探讨了现有国内外测定方法, 并实验研究了乙醇法替代丙酮法的可行性, 优化了实验参数。实验结果表明: 乙醇和丙酮的提取时间对测定结果均有显著性影响, 酸化时间对乙醇-分光光度法的测定结果没有显著性影响; 乙醇-分光光度法在提取时间为15 h、酸化时间为5 min时, 与丙酮法结果最接近。乙醇法替代丙酮法作为大学本科教学实验《水中叶绿素a含量的测定》的教学方法是可行的。本文提供了可用于高校本科实验教学的减排优化实验方案, 也可为其它科研院所、工矿企业, 环保部门进行叶绿素a测定技能培训教学提供服务。

## 关键词

水中叶绿素a, 乙醇, 丙酮, 提取, 优化

# Experimental Optimization Study on the Determination of Chlorophyll a in Water by Substituting Acetone with Ethanol

Pan Zhu, Ru Feng\*, Jinyue Li, Youfu Liang, Lifang Fan, Ying Feng, Qun Kang

School of Resources and Environment, Hubei University, Wuhan Hubei

Received: Sep. 21<sup>st</sup>, 2022; accepted: Oct. 20<sup>th</sup>, 2022; published: Oct. 27<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 朱攀, 冯如, 李金玥, 梁友福, 樊丽芳, 封瑛, 康群. 乙醇替代丙酮测定水中叶绿素 a 的优化实验研究[J]. 环境保护前沿, 2022, 12(5): 1084-1095. DOI: 10.12677/aep.2022.125134

## Abstract

Chlorophyll a is an important indicator to evaluate the eutrophication of water bodies, and the undergraduate teaching experiment of “acetone-spectrophotometric determination of chlorophyll a content in water” has been introduced in the environmental majors of many universities. Acetone has strong volatility and toxicity, and has a special odor, which may cause harm to the experimenters and increase the cost and risk of the experiment. In order to advocate green chemistry, this paper discusses the existing domestic and international determination methods, and experimentally investigates the feasibility of the ethanol method instead of acetone method, and optimizes the experimental parameters. The experimental results showed that the extraction time of both ethanol and acetone had a significant effect on the determination results, and the acidification time had no significant effect on the determination results of the ethanol-spectrophotometric method; the results of the ethanol-spectrophotometric method were closest to those of the acetone method when the extraction time was 15 h and the acidification time was 5 min. The ethanol method is feasible to replace the acetone method as a teaching method for the undergraduate teaching experiment “Determination of chlorophyll a content in water”. This paper provides an optimized experimental scheme for emission reduction that can be used for undergraduate experimental teaching in universities, and can also be used for training and teaching of chlorophyll a determination skills in other research institutes, industrial and mining enterprises, and environmental protection departments.

## Keywords

Chlorophyll a in Water, Ethanol, Acetone, Extraction, Optimization

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

叶绿素 a (chlorophyll a) 作为光合色素叶绿素的其中一类，存在于所有的浮游植物中。它能够反映浮游植物的生物量乃至初级生产力水平，因此常作为评价水体富营养化的重要参数之一，通过测定叶绿素 a 含量，可以确定水体中藻类及浮游植物等的分布和数量，从而进一步了解该区域的水质状况及生态状况等信息[1]。因此叶绿素 a 的测定在环境监测以及水质评价中起着重要的实用意义。

目前，国内多所高校的环境工程专业及环境科学专业在本科阶段就开设了“水中叶绿素 a 含量的测定”这一实验项目。在高校开设的实验课程中，用以提取叶绿素 a 的试剂通常为丙酮。然而丙酮溶液具有极易挥发性、易燃且有一定急性毒性。使用丙酮作为提取试剂进行高校实验教学，在通风设施条件不佳的情况下，丙酮极易挥发到实验室内，对师生的健康及人身安全造成潜在威胁。此外，掺有丙酮的实验室废液属于危险废物，不能直接倾倒入下水道内，须要收集到废液桶中，由学校组织有危废处理资质的公司统一回收处理，上述处理方式无疑增加了各高校开设该实验项目的环境污染风险、师生健康威胁和经济成本。以某大学环境工程专业为例，参与该实验项目的学生人数为 100 人/年，实验中划分为每组 3 人共 33 组，则每组实验需要消耗丙酮约 100 mL，一次教学实验需要消耗丙酮约 3300 mL，产生含有丙酮的危险废液约 40 kg，按照每公斤危废处理费用 30 元计算，则一年需要支付 1200 元左右的丙酮废液处

理费用,增加了高校实验开设的成本和风险。因此,寻找该实验项目的更为环保的代替实验方法具有十分重要的现实意义。

## 2. 国内外水中叶绿素 a 测定方法研究进展

### 2.1. 国内外现有的叶绿素 a 的标准测定方法

叶绿素 a 含量的测定方法主要在以下几种公开发布的规范文本中进行说明,表 1、表 2 分别分析比较了国内和国外公开的主要标准测定方法。

**Table 1.** Analysis and comparison of the main methods for the determination of chlorophyll a in China

**表 1.** 国内叶绿素 a 的主要测定方法分析比较

标准名称	国标法[2]	海洋监测规范 [3]	湖泊富营养化 调查规范 (第二版) [4]	水和废水监测分 析方法 (第四版) [5]	水利行业标 准[6]	常温乙醇法 [7]
方法标准号	HJ 897-2017	GB 17378-2007	——	——	SL88-2012	——
提取试剂	90%丙酮	90%丙酮	90%丙酮	90%丙酮	90%丙酮	90%乙醇
滤膜	玻璃纤维 滤膜	玻璃纤维滤膜 或微孔滤膜	玻璃纤维 滤膜	乙酸纤维 滤膜	玻璃纤维 滤膜	玻璃纤维 滤膜
提取方法	研磨浸泡 提取	直接浸泡 提取	研磨浸泡 提取	研磨浸泡 提取	反复冻融 提取	研磨浸泡 提取
测定方法	分光光度法					

**Table 2.** Analysis and comparison of the main foreign methods for the determination of chlorophyll a

**表 2.** 国外叶绿素 a 的主要测定方法分析比较

标准来源	美国材料与试验协会		美国环保局		日本	英国标准协会
方法标准号	ASTMD3731-87 (2012) [8]	Method 445.0 [9]	Method 446.0 [10]	Method 447.0 [11]	JIS K0400-80-10- 2000 [12]	BS ISO 10260-1992 [13]
提取试剂	90%丙酮	90%丙酮	90%丙酮	90%丙酮	75℃ 90%乙醇	75℃ 90%乙醇
滤膜	玻璃纤维滤膜					
提取方法	研磨浸泡离心法					
测定方法	分光光度法	荧光法	分光光度法	高效液相色 谱法	分光光度法	分光光度法

### 2.2. 叶绿素 a 测定仪器的研究进展

当前测定水中叶绿素 a 含量的方法主要有荧光法、高效液相色谱(HPLC)法和分光光度法三种。其中,荧光法的检测结果易受到水中悬浮物的干扰,且影响程度随时间延长迅速升高,根据黄倩[14]等人研究得出,水样采集超过 30 分钟后运用荧光法测定的叶绿素 a 含量结果出现明显变化,仅 1 小时后叶绿素 a 含量就下降 40%左右,因此荧光法多用于实地科考过程中大批量样品的现场测定;康琦[15]研究表明 HPLC 法测定结果准确但仪器设备昂贵且操作复杂,测定步骤繁琐,对实验人员要求较高,且测量结果与分光光度法的结果差异不大。对比分析如下表 3 所示。

**Table 3.** Comparison of the advantages and disadvantages of the instruments required for common methods of determining chlorophyll a in water**表 3.** 水中叶绿素 a 常见测定方法所需仪器的优劣对比

测定方法	荧光法	高效液相色谱法	分光光度法
测定仪器	荧光测定仪	高效液相色谱仪	分光光度仪
优点	适合大批量样品测定	测定结果准确	检测效率较高、操作简单易行
缺点	检测结果易受干扰不稳定, 仅适用于现场测定	设备昂贵、操作步骤复杂繁琐	测定结果准确度不如 HPLC 法

从上文及上表 3 可得, 鉴于高效液相色谱法及荧光法所需仪器设备昂贵, 操作复杂, 对场地要求严格, 并不适用于本科实验教学环境, 而分光光度法相较而言更加简单易操作, 实验器材易得, 检测效率较高, 在教学实验操作中更占优势。因此, 在本科实验教学中首选分光光度法进行测定最为合理。

### 2.3. 分光光度法测定叶绿素 a 的预处理研究进展

目前, 测定叶绿素 a 含量中研究较多的强化预处理提取方法有直接浸泡提取法、浸泡研磨提取法、超声波提取法及反复冻融提取法。表 4 为水中叶绿素 a 常见提取方法的对比。

**Table 4.** Comparison of the advantages and disadvantages of common extraction methods of chlorophyll a in water**表 4.** 水中叶绿素 a 常见提取方法的优劣对比

提取方法	直接浸泡提取法	浸泡研磨提取法	超声波提取法	反复冻融提取法
优点	操作简单、实验成本低	操作简便易行	提取效率高	实验结果
缺点	提取时间长、提取效率低	研磨不充分时容易产生损失	仪器设备复杂、不易控制	实验条件苛刻、操作复杂、测定结果易受干扰

结合表 4 分析, 浸泡研磨提取法操作简便可行, 且提取效率较高, 适宜作为高校实验教学及小型实验中的叶绿素 a 提取方法, 因此可以选用浸泡研磨提取法进行本文实验研究过程中叶绿素 a 的提取。

除了标准方法中用到的丙酮, 可提取水中叶绿素 a 的提取试剂还有乙醇, 甲醇及二甲基亚砜(DMSO)等。

甲醇一般不作为单独的提取试剂使用, 而是在某些特定情况下与其他的提取试剂按比例混合使用, 这样可以达到比单独使用甲醇试剂更好的提取效果。例如在针对某些藻类如蓝藻、绿藻等的提取上, 90% 甲醇溶液或者纯甲醇提取的检测结果不如 90% 丙酮溶液或者丙酮甲醇混合溶液提取的检测结果快速、准确, 因此在本次实验研究中不考虑选用[16]。

用作提取试剂的还有二甲基亚砜, 它的提取效果与丙酮相差无几, 但是由于该溶剂本身气味难闻, 在温度小于 18.5℃时容易结晶, 使用度不高[17]。N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 能够使叶绿素 a 具有更长时间的稳定性, 针对叶绿素 a 含量较低的水样的检测效果较好, 但是 DMF 在与很多种试剂共存时都具有潜在的危险, 未知的安全风险大, 因而不适用于实验教学。

乙醇作为已知最安全环保的光合色素提取试剂, 主要用以提取检测淡水水样的叶绿素 a 含量, 不适用于对海洋水样的检测。根据李鹏飞[18]等人研究, 无水乙醇-90%丙酮混合溶液在比例为 1:2 时的提取效果最好, 无水乙醇单独用作提取试剂的效果次之。此外, 还有按照一定比例混合的有机溶剂混合溶液如 DMSO-丙酮、乙醇-丙酮等。

**Table 5.** Comparison of reagents for the extraction of chlorophyll a in water  
**表 5.** 水中叶绿素 a 的提取试剂的比较

提取试剂	丙酮	乙醇	甲醇	二甲基亚砷	N,N-二甲基甲酰胺
优点	对光合色素的综合提取效果好	安全、环保、无污染	与其他提取试剂混合可提高提取效率	提取效果较好, 与丙酮相差无几	针对叶绿素 a 含量较低的水样的检测效果较好
缺点	污染环境、提高处理成本、危害师生身体健康	不适用于海洋水样的检测; 缺乏与国标法的比对数据	针对某些藻类提取效果较差	气味难闻、温度低于 18.5°C 易结晶	与多种试剂共存时都具有潜在的安全风险

由上文及表 5 可得, 无水乙醇是以上五种提取试剂中最安全环保无污染的试剂。乙醇是否能代替丙酮应用于叶绿素 a 测定方法的教学, 以及如何优化达到最佳条件, 需要做详细的实验研究。

目前, 绿色化学在多个国家都已经成为化学进展的主要方向之一, 其核心内容为倡导用化学的技术和方法减少或停止那些对人类健康、社区安全、生态环境有害的原料、催化剂、溶剂和试剂、产物、副产物等的使用与产生[19]。因此, 寻找一种无毒或者毒性较小的试剂或方法, 来代替丙酮溶剂法进行叶绿素 a 含量的测定方法进行实验教学, 不仅是对绿色化学的强烈认同与响应, 也与高校环境类专业培养方案的目标一致。

### 3. 实验方法

#### 3.1. 实验材料

在实验室人工养殖小球藻, 取一定量的含有小球藻的水样用蒸馏水稀释到“丙酮萃取-分光光度法”检测范围内, 作为实验水样备用。

#### 3.2. 实验方法及步骤

对同一水样, 在实验室内分别采用乙醇和丙酮进行提取, 然后用分光光度法进行测量。具体方法如下:

##### 3.2.1. 乙醇-分光光度法

###### 1) 测定步骤

###### a) 抽滤

据预实验确定的稀释浓度, 取稀释后的水样 500 mL, 通过装好玻璃纤维滤膜的抽滤装置进行过滤, 抽滤时负压应不大于 50 kPa。抽滤完后, 对折滤膜并用普通滤纸吸压以尽可能除去滤纸上的水分。

###### b) 提取

用玻璃研钵研磨提取。将滤膜放入研钵后加入 90%乙醇溶液 7~8 mL, 研磨 3~5 min 直至变为匀浆。将匀浆移入 10 mL 的离心管中并冲洗研钵移入离心管中, 终容积略小于 10 mL。盖上关塞, 摇动后置于黑暗低温处进行提取, 提取时间分别设置为 6、15 和 24 h。

###### c) 离心

将提取后的离心管放入离心机中, 转速 1000 rpm, 离心 10 min。离心后得到的上层叶绿素提取液移入定量试管中, 然后用针式滤器过滤上清液得到叶绿素 a 的提取液, 将提取液定容至 10 mL。

###### d) 测定

将 90%乙醇溶液作为参照液调分光光度计零点, 调零后测定定容后的提取液在 665 nm 和 750 nm 处

的吸光度, 并计算两个吸光度的差, 记为  $A_1$ ; 然后向比色皿中加入 1 滴 1 mol/L 的盐酸酸化, 酸化时间分别设为 5、6、7、8、9、10 min, 再次测定酸化后的提取液在 665 nm 和 750 nm 处的吸光度, 并且把酸化后的两个吸光度的差记为  $A_2$ 。空白样品与试样测定相同的步骤进行。

## 2) 计算公式[20]

提取液中的叶绿素 a 的浓度为:

$$\text{Chla} = \frac{27.9 \times (A_1 - A_2) \times V_{\text{提取液}}}{V} \quad (1)$$

其中 Chla 为水样中的叶绿素 a 浓度( $\mu\text{g/L}$ );  $A_1$  为  $V_{\text{提取液}}$  为提取液的最终定容体积(mL);  $V$  为抽滤水样的体积(L)。

### 3.2.2. 丙酮 - 分光光度法

丙酮 - 分光光度法测定叶绿素 a 含量的测定步骤和计算公式参照国家环境保护局颁布的标准方法《水质叶绿素 a 的测定分光光度法》(HJ 897-2017) [2]。

#### 1) 测定步骤

根据预实验确定的稀释浓度, 取稀释后的水样 500 mL, 运用玻璃砂芯过滤器与玻璃纤维滤膜进行抽滤。抽滤后有样品的一面向内将滤膜对折, 用滤纸吸干水分。将滤纸放入玻璃研钵中, 少量多次加入提取试剂并充分研磨五分钟以上。将研磨后的样品转移至离心管中定容至 10 毫升, 然后避光低温浸泡提取, 提取时间分别设置为 6 h、15 h、24 h。

浸泡完成后将之离心 10 min, 转速 1000 r/min。离心完成后用针式过滤器过滤上清液得到提取液。将提取试剂作为参照液(提取试剂放在参照比色皿中, 并用其调分光光度计零点)。测定提取液在不同波长处的吸光度, 并计算得到叶绿素 a 含量测量值。

在上述实验步骤中, 使用丙酮作为提取试剂时, 需要注意的主要有两点: 一是在使用玻璃砂芯过滤器抽滤时, 当滤液剩余 10 毫升左右时加入 0.2 mL 的碳酸镁悬浊液摇匀再一同过滤; 二是需要在 750 nm、664 nm、647 nm 和 630 nm 波长处测定吸光度, 需要注意的是, 在 750 nm 处测定的吸光度应当小于 0.005, 否则需要再次用针式过滤器过滤后再次测定, 这是因为吸光度大于 0.05 说明提取液中仍然含有较多的沉淀物, 因此需要重复过滤[21]。

#### 2) 计算公式

提取液中叶绿素 a 的浓度计算公式如下:

$$\rho_1 = 11.85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1.54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0.08 \times (A_{630} - A_{750}) \quad (2)$$

式中:  $\rho_1$  为提取液中叶绿素 a 的质量浓度(mg/L);  $A_n$  为提取液在波长为  $n$  时的吸光度值。

水样的叶绿素 a 质量浓度计算公式如下:

$$\text{Chla} = \frac{\rho_1 \times V_1}{V} \quad (3)$$

式中: Chla 为水样中叶绿素 a 的质量浓度( $\mu\text{g/L}$ );  $V_1$  为提取液的定容体积(mL);  $V$  为所取水样的体积(L) [22]。

将以上实验步骤和计算方法得到的原始数据用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行数据处理与图形绘制。

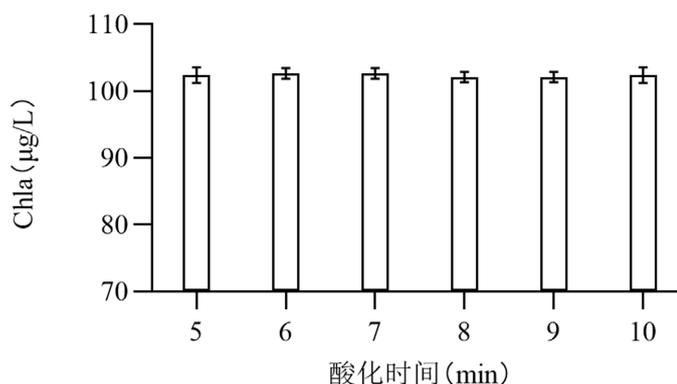
### 3.2.3. 实验数据处理方法

实验数据用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行处理, Graph Pad Prism8.0 软件进行图形绘制。

## 4. 实验结果分析

### 4.1. 乙醇 - 分光光度法测定水中叶绿素 a 的实验结果分析

#### 4.1.1. 乙醇提取 6 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果分析



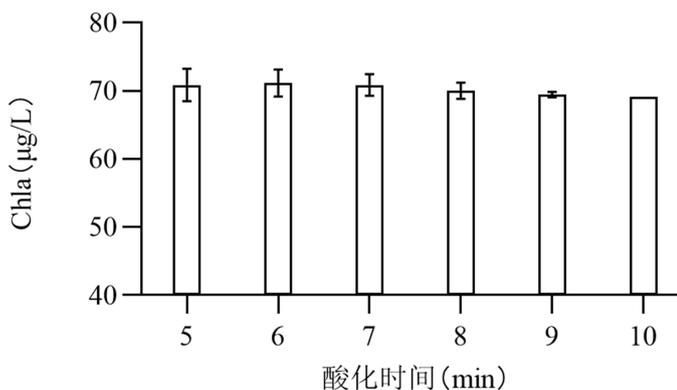
**Figure 1.** Effect of acidification time on chlorophyll a determination results at 6 h of ethanol extraction

**图 1.** 乙醇提取 6 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果的影响

经过 SPSS 软件进行数据分析得出, 当提取时间为 6 h 时, 酸化时间对叶绿素 a 测定结果没有显著性影响( $P = 0.710 > 0.05$ )。

由图 1 可知, 当提取时间为 6 h 时, 叶绿素 a 浓度在酸化时间为 6 min 时出现最大值, 随后检测值呈下降趋势, 在 10 min 时出现最小值。

#### 4.1.2. 乙醇提取 15 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果分析



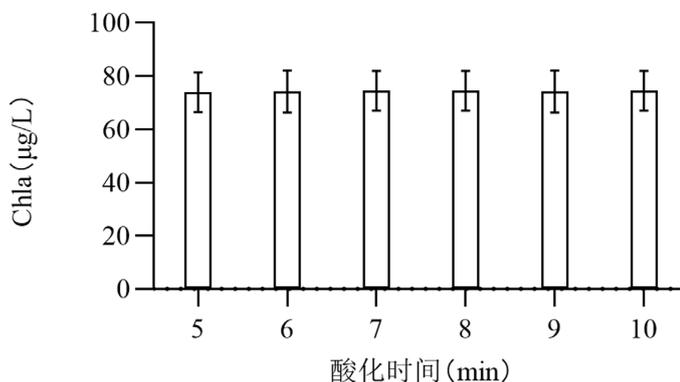
**Figure 2.** Effect of acidification time on chlorophyll a determination results at 15 h of ethanol extraction

**图 2.** 乙醇提取 15 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果的影响

经过 SPSS 软件进行数据分析得出, 当提取时间为 15 h 时, 酸化时间对叶绿素 a 测定结果没有显著性影响( $P = 0.976 > 0.05$ )。

由图 2 可知, 当提取时间为 15 h 时, 叶绿素 a 浓度在酸化时间为 6 min、7 min 时出现最大值, 随后检测值呈下降趋势, 到 10 min 时再次增大。

### 4.1.3. 乙醇提取 24 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果分析



**Figure 3.** Effect of acidification time on chlorophyll a determination results at 24 h of ethanol extraction

**图 3.** 乙醇提取 24 h 下酸化时间对叶绿素 a 测定结果的影响

经过 SPSS 软件进行数据分析得出, 当提取时间为 24 h 时, 酸化时间对叶绿素 a 测定结果没有显著性影响( $P = 1.000 > 0.05$ )。

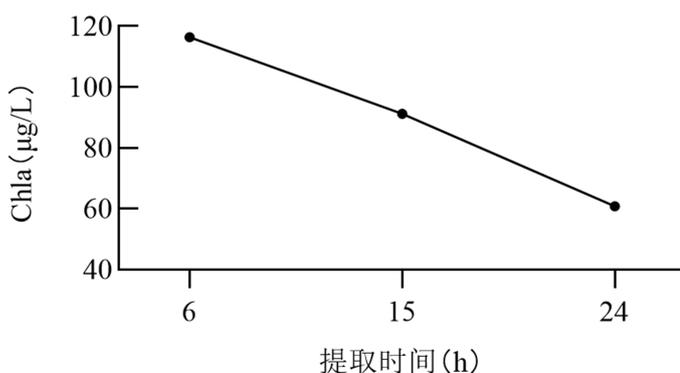
由图 3 可知, 当提取时间为 24 h 时, 叶绿素 a 浓度在酸化时间为 7 min、8 min 时出现最大值, 随后检测值呈下降趋势, 在第 10 min 时再次出现最大值。

### 4.1.4. 小结

酸化时间在 5~10 min 对乙醇 - 分光光度法的测定结果影响并不显著, 不同酸化时间下测定的叶绿素 a 含量结果, 对水样营养程度的定性判定影响不大。因此, 在选用乙醇作为叶绿素 a 的提取试剂时, 在酸化时间为 10 min 以内测定都是可行的, 但考虑到时间成本, 酸化时间选定为 5 min。

### 4.2. 丙酮 - 分光光度法测定水中叶绿素 a 的实验结果分析

用丙酮 - 分光光度法在不同提取时间下的叶绿素 a 含量检测结果如下图 4 所示。



**Figure 4.** Comparison of the results of chlorophyll a content detection by acetone at different extraction times

**图 4.** 丙酮在不同提取时间下的叶绿素 a 含量检测结果对比

由图 4 分析可知, 自提取 6 h 起至 24 h 止, 叶绿素 a 含量检测数值随着提取时间的增长而降低, 最佳提取时间在 6 小时。分析原因如下: 丙酮对叶绿素 a 的提取效果较强, 提取较大含量的叶绿素 a 所需

的时间较短,即在 6 小时左右就能提取出绝大部分色素。随着提取时间的延长,溶解到丙酮中的叶绿素 a 逐步进行分解反应,渐渐消耗,导致在 15 h 以及 24 h 的叶绿素 a 测量值显著降低。水利行业标准更新后将原标准中规定的提取时间由 24 h 变更为 4~12 h,这一变更与本文的实验结果也是相吻合的[23]。

综上所述,在丙酮-分光光度法中,提取时间对提取叶绿素 a 的效果以及测量值的准确度有很大影响。丙酮溶剂在不同的提取时间的测定值均存在较大差异,因此把握适当的提取时间对于分光光度法测量叶绿素 a 含量是非常重要的。在本实验探究中,认为对于丙酮而言,提取时间在 6 小时有较好的提取效果。

### 4.3. 乙醇-分光光度法和丙酮-分光光度法的测定结果对比

#### 4.3.1. 提取 6 h 下乙醇法和丙酮法结果对比

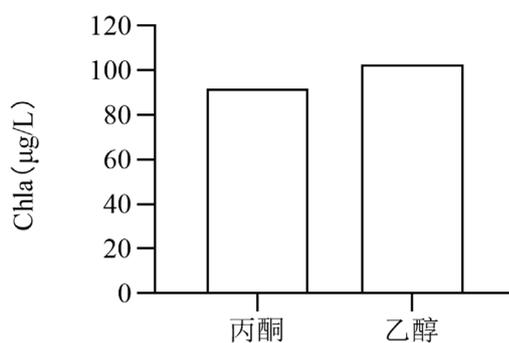


Figure 5. Differences in chlorophyll a content determination for different extraction reagents at 6 h of extraction

图 5. 提取 6 h 下不同提取试剂的叶绿素 a 含量测定差异

由图 5 可知,当提取时间为 6 h 时,乙醇的检测结果比丙酮小 39%。

#### 4.3.2. 提取 15 h 下乙醇法和丙酮法结果对比

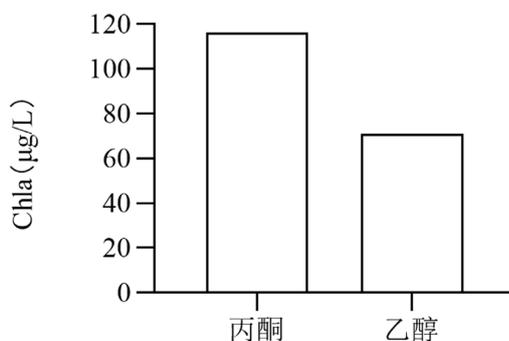
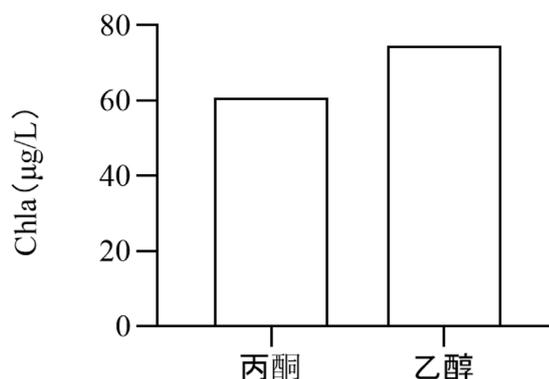


Figure 6. Differences in chlorophyll a content determination for different extraction reagents at 15 h of extraction

图 6. 提取 15 h 下不同提取试剂的叶绿素 a 含量测定差异

由图 6 可知,当提取时间为 15 h 时,乙醇的检测结果比丙酮大 12%。

### 4.3.3. 提取 24 h 下乙醇法和丙酮法结果对比



**Figure 7.** Differences in chlorophyll a content determination for different extraction reagents at 24 h of extraction

**图 7.** 提取 24 h 下不同提取试剂的叶绿素 a 含量测定差异

由图 7 可知，当提取时间为 24 h 时，乙醇的检测结果比丙酮大 23%。

小结：据以上数据分析可知：分别用丙酮和乙醇作提取试剂时，二者检测结果有一定差异，当提取时间为 15 h 时两者检测结果差值最小，为 12%。

### 4.3.4. 丙酮及乙醇分别在最佳提取条件下的叶绿素 a 测定值对比

**Table 6.** Comparison of the differences in the measured chlorophyll a content between acetone and ethanol at the optimal extraction time, respectively

**表 6.** 丙酮及乙醇分别在最佳提取时间下的叶绿素 a 含量测定值对比差异

提取时间(h)	提取试剂	Chla 均值(µg/L)	差值百分比
6	丙酮	116.42 ± 0.09%	12%
15 (酸化时间 5 min)	乙醇	102.40 ± 0.82%	

由表 6 可知，在最佳优化条件下，对同一水样乙醇法测定结果为 102.40 µg/L，丙酮法测定结果为 116.42 µg/L，乙醇法的测定结果略小于丙酮法的测定结果，差值为 12%。

## 4.4. 小结

根据以上数据结果及分析，优化后的乙醇法测定结果比丙酮法的测定结果小 12%。为了尽可能减少有毒试剂的使用，用乙醇代替丙酮作为提取剂，进行叶绿素 a 的测定实验教学或操作训练是可行的。

优化得到的乙醇法实验步骤如下：

- 1) 选用 90%乙醇作为提取试剂，采用研磨浸泡提取法进行强化预处理，黑暗低温环境下浸泡提取 15 小时；
- 2) 离心后取上清液定容到 10 mL，在 665 nm 和 750 nm 处分别测定其吸光度，其差值记为 A1；
- 3) 然后向比色皿中加入 1 滴 1 mol/L 的盐酸酸化，酸化时间为 5 min，再分别在 665 nm 和 750 nm 处测定其吸光度值，其差值记为 A2；
- 4) 代入公式(1)计算可得叶绿素 a 含量。

## 5. 结论

根据本研究实验, 得出以下结论:

- 1) 采用乙醇 - 分光光度法测定水中叶绿素 a, 酸化时间对测定结果影响不显著,
- 2) 采用乙醇 - 分光光度法测定水中叶绿素 a, 乙醇提取时间对测定结果影响显著, 当提取时间 15 h 时, 测得的叶绿素 a 值高于提取时间 6 h 和 24 h 时的测定结果。
- 3) 采用丙酮 - 分光光度法测定水中叶绿素 a, 丙酮提取时间对测定结果影响显著。提取时间 6 h 时, 测得的叶绿素 a 值显著高于其它两种情况, 提取时间 24 h 测定的叶绿素 a 值最低。
- 4) 经优化后的乙醇 - 分光光度法, 提取时间为 15 h, 酸化时间为 5 min, 其测定结果比丙酮 - 分光光度法小 12%。

为了尽可能减少有毒试剂的使用, 用乙醇代替丙酮作为提取剂, 可节约危化废液的处置费用, 也可避免实验中丙酮挥发对人体健康造成的潜在威胁。经本研究优化后的乙醇 - 分光光度法作为实验教学和操作训练中叶绿素 a 测定方法的减排代替方法是可行的。

## 参考文献

- [1] 巩元帅, 宋静静, 古小超. 荧光法测定水中叶绿素 a 的影响因素分析[J]. 水资源开发与管理, 2020(10): 39-41.
- [2] 环境保护部. HJ 897-2017. 水质叶绿素 a 的测定分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [3] 中国标准化委员会. GB17378-2007. 海洋检测规范[S]. 北京: 中国质检出版社, 2008.
- [4] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 第 2 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [5] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [6] 国家水利部. SL88-2012. 水质叶绿素的测定分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [7] 豆丁网. 水质叶绿素 a 的测定分光光度法[EB/OL]. <https://www.docin.com/p-798318033.html>, 2015-10-13.
- [8] ASTM D 3731-87 (2012) Standard Practice for Measurement of Chlorophyll Content of Algae in Surface Waters. American Public Health Association, Washington DC.
- [9] Arar, E.J. and Gary, B.C. (1997) Method 445.0, *in Vitro* Determination of Chlorophyll a and Pheophytin a in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 1-22.
- [10] Arar, E.J. (1997) Method 446.0, *in Vitro* Determination of Chlorophylls a, b, c1 + c2 and Pheopigments in Marine and Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 1-26.
- [11] Arar, E.J. (1997) Method 447.0, Determination of Chlorophylls a and Band Identification of Other Pigments of Interest in Marine and Freshwater Algae Using High Performance Liquid Chromatography with Visible Wavelength Detection. United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 1-20.
- [12] JIS K0400-80-10-2000. Water Quality-Measurement of Biochemical Parameters-Spectrometric Determination of the Chlorophyll-a Concentration.
- [13] BS ISO 10260-1992. Water Quality-Measurement of Biochemical Parameters-Spectrometric Determination of the Chlorophyll-a Concentration.
- [14] 黄倩, 陈浓, 赵琼洲, 等. 水中叶绿素 a 测定时间和浊度对测定结果的影响探析[J]. 中国化工贸易, 2019, 11(5): 110.
- [15] 康琦. 两种方法测定地表水中叶绿素 a 的比较[J]. 广州化工, 2018, 46(11): 71-73.
- [16] 万修志. 提取测定淡水藻中叶绿素 a 的方法研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东建筑大学, 2011: 2-35.
- [17] Qiu, N., Wang, X. and Zhou, F. (2018) A New Method for Fast Extraction and Determination of Chlorophylls in Natural Water. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences*, **73**, 77-86. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0157>
- [18] 李鹏飞, 孙昕, 杨婍, 等. 藻类叶绿素 a 提取的优化研究[J]. 化工学报, 2019, 70(9): 3421-3429.
- [19] 李宸熙. 浅谈绿色化学零污染及可持续发展[J]. 数字化用户, 2018, 24(48): 248.
- [20] Lorenzen, C.J. (1967) Determination of Chlorophyll and Phaeopigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, **12**, 343-346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>

- [21] 王燕青. 分光光度法测定水中叶绿素的影响因素[J]. 国际援助, 2020(19): 132.
- [22] 郭永斌, 雷赛芬. 地表水中叶绿素 a 的提取方法探讨[J]. 云南化工, 2020, 47(10): 117-119.
- [23] 冷维亮, 毕钦祥, 刘英昊, 等. 水库水中叶绿素 a 测定方法比较[J]. 治淮, 2013(12): 57-58.