

ICS 13. 160
Z 16

SL

中华人民共和国水利行业标准

SL 88—2012
替代 SL 88—1994

水质 叶绿素的测定 分光光度法

Water quality—Determination of chlorophyll by
spectrophotometry

MACY 美析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

2012-07-31 发布

2012-10-31 实施



中华人民共和国水利部 发布

中华人民共和国水利部
关于批准发布水利行业标准的公告

2012 年第 25 号

中华人民共和国水利部批准《水质 叶绿素的测定 分光光度法》(SL 88—2012) 标准为水利行业标准，现予以公布。

序号	标准名称	标准编号	替代标准号	发布日期	实施日期
1	水质 叶绿素的测定 分光光度法	SL 88—2012	SL 88—1994	2012. 7. 31	2012. 10. 31

MACY 美析仪器
水利部
2012 年 7 月 31 日
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

目 次

前言	IV
1 范围	1
2 方法原理	1
3 干扰及消除	1
4 试剂和材料	1
5 仪器和设备	1
6 水样的采集和保存	2
7 分析步骤	2
8 结果计算	2
9 精密度和准确度	3
10 质量保证和质量控制	4
11 注意事项	4

M **MACY** **美析仪器**
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

前 言

本标准依据 GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》、GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析法》的规则起草。

本标准替代 SL 88—1994《叶绿素的测定（分光光度法）》，主要修订内容如下：

——修改了水样的保存方式：原标准规定水样在 2~5℃ 冰箱中避光保存，新标准规定水样在 24h 内过滤，滤膜在 -20℃ 以下的冰箱内保存；

——修改了过滤藻类的滤膜：原标准使用醋酸纤维滤膜，新标准使用玻璃纤维滤膜；

——修改了水样过滤时的操作：原标准要求抽干滤膜，新标准不抽干滤膜，而是在减压状态下缓慢结束抽滤，最后用滤纸吸干水分；

——修改了藻类细胞破碎方法：原标准使用研磨法，新标准使用反复冻融法；

——修改了提取时间：原标准提取 24h，新标准提取 4~12h；

——修改了测定时的吸收波长：原标准在 750nm、663nm、645nm、630nm 下测定吸光度，新标准在 750nm、664nm、647nm、630nm 下测定吸光度；

——修改了计算公式，原标准中公式被新公式替代；

——增加了校正脱镁叶绿素 a 的相关内容。

本标准为全文推荐。

本标准批准部门：中华人民共和国水利部。

本标准主持机构：水利部水文局。

本标准解释单位：水利部水文局。

本标准主编单位：松辽流域水环境监测中心。

本标准出版、发行单位：中国水利水电出版社。

本标准主要起草人：白焱、傅春艳、戴欣、潘曼曼、杨航、董华、石岩、鲁雪、李聪。

本标准审查会议技术负责人：齐文启。

本标准体例格式审查人：徐海峰、王艺。

本标准所替代标准的历次版本为：

——SL 88—1994。

水质 叶绿素的测定 分光光度法

1 范围

本标准规定了测定水中叶绿素的分光光度法。

本标准适用于地表水中叶绿素的测定。

当水样体积为 300mL、使用 1cm 比色皿时，叶绿素 a 的检出限为 $0.11\mu\text{g/L}$ ，测定下限为 $0.5\mu\text{g/L}$ ；叶绿素 b 的检出限为 $0.25\mu\text{g/L}$ ，测定下限为 $1.0\mu\text{g/L}$ ；叶绿素 c 的检出限为 $0.25\mu\text{g/L}$ ，测定下限为 $1.0\mu\text{g/L}$ 。

2 方法原理

将一定量水样用玻璃纤维膜过滤，收集藻类，使用反复冻融法对藻类细胞进行破碎，用 90% 丙酮溶液提取叶绿素，根据叶绿素光谱特性依次测定 750nm、664nm、647nm、630nm 波长下的吸光度，计算叶绿素的含量。

3 干扰及消除

脱镁叶绿素 a 能干扰叶绿素 a 的测定，当含有脱镁叶绿素 a 时，应在测定叶绿素 a 的同时测定脱镁叶绿素 a 的含量，以校正干扰。

校正脱镁叶绿素 a 时，分别测定酸化前后吸收池内的吸光度，代入公式中计算，以校正脱镁叶绿素 a 对叶绿素 a 的干扰。

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和纯水。

4.1 碳酸镁悬浊液： $w(\text{MgCO}_3) = 1\%$ 。于 1.0g 碳酸镁粉末中加入 100mL 纯水，搅拌成悬浊液。每次使用时应充分摇匀。

4.2 丙酮溶液： $\varphi(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}) = 90\%$ 。在 900mL 丙酮中加 100mL 纯水。

4.3 盐酸溶液： $c(\text{HCl}) = 0.1\text{mol/L}$ 。将 8.5mL 浓盐酸加入到 500mL 纯水中，冷却至室温后稀释至 1000mL。

5 仪器和设备

分析时均使用符合国家标准的 A 级玻璃量器。

5.1 可见分光光度计。

5.2 抽滤器。

5.3 微孔滤膜：直径为 47mm、孔径为 $0.7\mu\text{m}$ 的玻璃纤维滤膜。

5.4 真空泵。

5.5 低温冰箱：能控制在 $-40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

5.6 离心机：转速能达到 $3000 \sim 4000\text{r/min}$ ，宜使用带控温装置的离心机。

5.7 培养皿：用来盛放、转移滤膜。

5.8 具塞玻璃离心管：10mL 或 15mL。

5.9 铝箔。

5.10 镊子。

5.11 针式过滤器：0.45 μ m 孔径的聚四氟乙烯有机相针式过滤器。

5.12 实验室常用仪器。

6 水样的采集和保存

6.1 水样的采集

根据不同的水体，采集 500~1000mL 水样于棕色玻璃瓶或深色塑料瓶中，每升水样加入 1mL1% 的碳酸镁悬浊液（见 4.1 条），以防止酸化引起的色素溶解。

6.2 水样的保存

水样应避免光保存，低温运输。采样后 24h 内用微孔滤膜（见 5.3 条）过滤水样，过滤后的滤膜在 -20℃ 以下的冰箱内保存，并于 25d 内分析测试完毕。

7 分析步骤

7.1 抽滤

将微孔滤膜（见 5.3 条）放置在连接有真空泵的抽滤器上，根据水样中叶绿素的浓度准确量取定量体积的混匀水样进行抽滤，抽滤时负压不应超过 20kPa，逐渐减压，在水样刚刚完全通过滤膜时结束抽滤。用镊子小心将滤膜取出，将有样品的一面对折，用滤纸吸干剩余水分。

如果样品不能及时提取，应将吸干水分的滤膜放入培养皿（见 5.7 条）中，外面包裹一层铝箔，放入 -20℃ 以下的冰箱中保存。

7.2 提取

将过滤后的滤膜放入具塞玻璃离心管（见 5.8 条）中，盖紧塞帽，放入 -40℃ 低温冰箱（见 5.5 条）中冷冻 20min，取出放置于室温下 5min，此过程反复 3 次。向离心管中加入 10mL90% 丙酮溶液（见 4.2 条），盖紧塞帽剧烈摇振片刻，放置于 4℃ 冰箱中避光浸泡 4~12h 备用，在浸泡过程中应再摇振 2~3 次。

7.3 离心

将离心管放入离心机（见 5.6 条）中，以 3500r/min 的速度离心 15min。

7.4 测定

将离心后的上清液倒入 1cm 比色皿中，以 90% 丙酮溶液（见 4.2 条）做参比，分别在 750nm、664nm、647nm、630nm 波长处测定吸光度值。

当含有脱镁叶绿素 a 时，应在测定叶绿素 a 的同时测定脱镁叶绿素 a 的含量。具体做法是：向装有离心上清液的 1cm 比色皿内滴加 0.1mol/L 的盐酸溶液（见 4.3 条）40 μ L（约 1 滴），酸化 20min 后测定 750nm、665nm 波长处吸光度值。

8 结果计算

8.1 叶绿素计算公式

按照式（1）~式（3）计算水体中叶绿素的浓度：

$$\rho_{\text{chl-a}} = \frac{[11.85(A_{664} - A_{750}) - 1.54(A_{647} - A_{750}) - 0.08(A_{630} - A_{750})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (1)$$

5.11 针式过滤器：0.45 μ m 孔径的聚四氟乙烯有机相针式过滤器。

5.12 实验室常用仪器。

6 水样的采集和保存

6.1 水样的采集

根据不同的水体，采集 500~1000mL 水样于棕色玻璃瓶或深色塑料瓶中，每升水样加入 1mL1% 的碳酸镁悬浊液（见 4.1 条），以防止酸化引起的色素溶解。

6.2 水样的保存

水样应避免光保存，低温运输。采样后 24h 内用微孔滤膜（见 5.3 条）过滤水样，过滤后的滤膜在 -20℃ 以下的冰箱内保存，并于 25d 内分析测试完毕。

7 分析步骤

7.1 抽滤

将微孔滤膜（见 5.3 条）放置在连接有真空泵的抽滤器上，根据水样中叶绿素的浓度准确量取定量体积的混匀水样进行抽滤，抽滤时负压不应超过 20kPa，逐渐减压，在水样刚刚完全通过滤膜时结束抽滤。用镊子小心将滤膜取出，将有样品的一面对折，用滤纸吸干剩余水分。

如果样品不能及时提取，应将吸干水分的滤膜放入培养皿（见 5.7 条）中，外面包裹一层铝箔，放入 -20℃ 以下的冰箱中保存。

7.2 提取

将过滤后的滤膜放入具塞玻璃离心管（见 5.8 条）中，盖紧塞帽，放入 -40℃ 低温冰箱（见 5.5 条）中冷冻 20min，取出放置于室温下 5min，此过程反复 3 次。向离心管中加入 10mL90% 丙酮溶液（见 4.2 条），盖紧塞帽剧烈摇振片刻，放置于 4℃ 冰箱中避光浸泡 4~12h 备用，在浸泡过程中应再摇振 2~3 次。

7.3 离心

将离心管放入离心机（见 5.6 条）中，以 3500r/min 的速度离心 15min。

7.4 测定

将离心后的上清液倒入 1cm 比色皿中，以 90% 丙酮溶液（见 4.2 条）做参比，分别在 750nm、664nm、647nm、630nm 波长处测定吸光度值。

当含有脱镁叶绿素 a 时，应在测定叶绿素 a 的同时测定脱镁叶绿素 a 的含量。具体做法是：向装有离心上清液的 1cm 比色皿内滴加 0.1mol/L 的盐酸溶液（见 4.3 条）40 μ L（约 1 滴），酸化 20min 后测定 750nm、665nm 波长处吸光度值。

8 结果计算

8.1 叶绿素计算公式

按照式（1）~式（3）计算水体中叶绿素的浓度：

$$\rho_{\text{chl-a}} = \frac{[11.85(A_{664} - A_{750}) - 1.54(A_{647} - A_{750}) - 0.08(A_{630} - A_{750})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (1)$$

$$\rho_{\text{chl-b}} = \frac{[21.03(A_{647} - A_{750}) - 5.43(A_{664} - A_{750}) - 2.66(A_{630} - A_{750})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (2)$$

$$\rho_{\text{chl-c}} = \frac{[24.52(A_{630} - A_{750}) - 7.60(A_{647} - A_{750}) - 1.67(A_{664} - A_{750})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- $\rho_{\text{chl-a}}$ ——水样中叶绿素 a 的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- $\rho_{\text{chl-b}}$ ——水样中叶绿素 b 的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- $\rho_{\text{chl-c}}$ ——水样中叶绿素 c 的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- A_{750} ——提取液在波长 750nm 处的吸光度值；
- A_{664} ——提取液在波长 664nm 处的吸光度值；
- A_{647} ——提取液在波长 647nm 处的吸光度值；
- A_{630} ——提取液在波长 630nm 处的吸光度值；
- V_1 ——提取液体积，mL；
- V_2 ——水样体积，L；
- L ——比色皿光程，cm。

8.2 校正脱镁叶绿素 a 的计算公式

按照式 (4)、式 (5) 计算校正脱镁叶绿素 a 后叶绿素 a 及脱镁叶绿素 a 的浓度：

$$\rho'_{\text{chl-a}} = \frac{26.7[(A_{664} - A_{750}) - (A_{665a} - A_{750a})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (4)$$

$$\rho_{\text{phe-a}} = \frac{26.7[1.7(A_{665a} - A_{750a}) - (A_{664} - A_{750})]V_1}{V_2L} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

- $\rho'_{\text{chl-a}}$ ——水样中校正脱镁叶绿素 a 后叶绿素 a 的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- $\rho_{\text{phe-a}}$ ——水样中脱镁叶绿素 a 的质量浓度， $\mu\text{g/L}$ ；
- A_{750} ——提取液酸化前在波长 750nm 处的吸光度值；
- A_{664} ——提取液酸化前在波长 664nm 处的吸光度值；
- A_{750a} ——提取液酸化后在波长 750nm 处的吸光度值；
- A_{665a} ——提取液酸化后在波长 665nm 处的吸光度值；
- V_1 ——提取液体积，mL；
- V_2 ——水样体积，L；
- L ——比色皿光程，cm。

9 精密度和准确度

实验室间分别 10 次平行测定叶绿素 a 浓度相对为低 ($<10\mu\text{g/L}$)、中 ($10\sim 25\mu\text{g/L}$)、高 ($>25\mu\text{g/L}$) 三个浓度范围的水样，结果的标准偏差及相对标准偏差数据见表 1。实验室间使用美国环保署 EPA M446.0 方法及本标准分别 10 次平行测定同一水样，统计两种标准测得数据的 F 检验、 t 检验结果，经计算统计两种标准方法所测定数值的 F 检验、 t 检验结果均小于 $F_{\text{表}}$ 和 $t_{\text{表}}$ ，说明两种方法测得数据的准确度及精密度的均没有差别，本标准准确度及精密度的符合要求。具体结果见表 2。

表 1 实验室间精密度数据汇总

叶绿素种类	相对浓度范围 (以叶绿素 a 计)	低浓度 ($<10\mu\text{g/L}$)	中等浓度 ($10\sim 25\mu\text{g/L}$)	高浓度 ($>25\mu\text{g/L}$)
叶绿素 a	标准偏差 ($\mu\text{g/L}$)	0.45~0.94	0.53~1.12	1.35~2.79
	相对标准偏差 (%)	8.42~11.13	3.26~5.55	3.02~4.97
叶绿素 b	标准偏差 ($\mu\text{g/L}$)	0.18~0.34	0.33~0.68	0.52~1.35
	相对标准偏差 (%)	7.15~9.77	4.23~8.60	3.23~9.27
叶绿素 c	标准偏差 ($\mu\text{g/L}$)	0.14~0.27	0.22~0.81	0.28~2.06
	相对标准偏差 (%)	8.31~13.95	3.42~9.78	3.91~7.32

表 2 实验室间 F 检验、t 检验结果汇总表

检验结果		F 检验结果 ($F_{表}=3.18$)			t 检验结果 ($t_{表}=2.09$)			结 论
叶绿素种类		叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 c	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 c	
不同实 验室	1	$F=0.81 < F_{表}$	$F=2.46 < F_{表}$	$F=1.21 < F_{表}$	$t=0.45 < t_{表}$	$t=0.12 < t_{表}$	$t=0.13 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异
	2	$F=1.03 < F_{表}$	$F=0.87 < F_{表}$	$F=0.55 < F_{表}$	$t=1.58 < t_{表}$	$t=0.57 < t_{表}$	$t=0.19 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异
	3	$F=1.74 < F_{表}$	$F=1.12 < F_{表}$	$F=1.67 < F_{表}$	$t=1.90 < t_{表}$	$t=0.54 < t_{表}$	$t=1.97 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异
	4	$F=1.39 < F_{表}$	$F=1.19 < F_{表}$	$F=1.68 < F_{表}$	$t=0.72 < t_{表}$	$t=1.46 < t_{表}$	$t=1.51 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异
	5	$F=0.55 < F_{表}$	$F=0.93 < F_{表}$	$F=0.70 < F_{表}$	$t=0.19 < t_{表}$	$t=0.62 < t_{表}$	$t=1.31 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异
	6	$F=1.19 < F_{表}$	$F=1.18 < F_{表}$	$F=0.93 < F_{表}$	$t=0.73 < t_{表}$	$t=1.28 < t_{表}$	$t=1.09 < t_{表}$	两组数据无 显著性差异

10 质量保证和质量控制

10.1 空白实验

每分析一批样品必须有一个全程空白，空白测试结果应低于方法检出限。

10.2 平行样

每分析一批样品必须有一个平行样。

11 注意事项

- 11.1 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。
- 11.2 因为叶绿素提取液对光敏感，故样品应尽快测定，提取操作等应在低温、弱光下进行。
- 11.3 比色皿应事先用 90% 的丙酮溶液进行校正。
- 11.4 提取液 750nm 处吸光度值不应超过 0.005，否则提取液应重新离心并用针式过滤器过滤。
- 11.5 提取液 664nm 处的吸光度应介于 0.1~1.0 之间，否则应将提取液稀释或更换不同光程的比色皿。



155084. 958

SL 88—2012

MACY

美析仪器
中华人民共和国水利行业标准
水质 叶绿素的测定 分光光度法
SL 88—2012

*

中国水利水电出版社出版发行
(北京市海淀区玉渊潭南路1号D座 100038)

网址: www.waterpub.com.cn

E-mail: sales@waterpub.com.cn

电话: (010) 68367658 (发行部)

北京科水图书销售中心(零售)

电话: (010) 88383994、63202643、68545874

全国各地新华书店和相关出版物销售网点经售

北京瑞斯通印务发展有限公司印刷

*

210mm×297mm 16开本 0.5印张 15千字

2012年8月第1版 2012年8月第1次印刷

印数 0001—2000册

*

书号 155084·958

定价 10.00元

凡购买我社规程, 如有缺页、倒页、脱页的,

本社发行部负责调换

其他问题, 请与本社水利水电技术标准咨询服务中心联系

电话(传真): (010) 68317913

E-mail: jwh@waterpub.com.cn

版权所有·侵权必究

专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com

MAQY INSTRUMENT
T 010-6319-4686