

浮游植物叶绿素 a 浓度测定方法的比较研究

徐彩平^{1,2}, 刘霞¹, 陈宇炜^{1①} (1. 湖泊与环境国家重点实验室/中国科学院南京地理与湖泊研究所, 江苏 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 叶绿素 a 作为浮游植物生物量的表征, 其在水体中的浓度常被用作评价水环境富营养程度的指标, 但其测定方法多样, 尚未形成统一的标准方法。回顾了水体中浮游植物叶绿素 a 测定方法的发展历程, 对细胞破碎方法和提取液种类等方面的研究做了比较, 结合不同测定方法的优缺点提出了目前最合适使用的方法——热乙醇法。该方法操作简便, 提取效率高, 稳定可靠, 且对操作者的健康无危害。介绍了荧光法、高效液相色谱法和分光光度法 3 种常用测定方法的简要步骤、适用性和优缺点。经过对多种方法的比较, 认为采用热乙醇法提取和分光光度法测定是一种值得推广应用的测定方法, 以为国内制定叶绿素 a 测定的标准方法提供依据。

关键词: 叶绿素 a; 提取液; 热乙醇法; 分光光度法

中图分类号: X832 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2013)04-0438-05

Comparison of Methods for Determination of Phytoplankton Chlorophyll-a. XU Cai-ping^{1,2}, LIU Xia¹, CHEN Yu-wei¹ (1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment/ Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: As chlorophyll-a (Chl-a) is used to characterize phytoplankton biomass, its content in a waterbody is commonly used as an indicator of eutrophication level of the waterbody. Although there are a number of measurement procedures currently in use, not a unified standard method is developed. A retrospect is presented of the development history of the methods for determination of Chl-a. On such a basis, a comparative study was done of the methods in cell disruption technique and type of extractant. By comparing advantages and disadvantages of the various determination methods, a relatively effective method, hot-ethanol method, is proposed. This method is easy to operate, high in extracting rate, stable, reliable and harmless to human health. Besides, a brief introduction is presented the three commonly-used determination methods, i.e. spectrofluorometry, high efficiency liquid chromatographic and spectrophotometry, and their respective procedures, applicabilities, advantages and disadvantages. The comparison demonstrates that the combination of the hot ethanol extraction method with the spectrophotometry is a good method, worth extrapolating. It is expected that the review may provide some bases for development of a standard method for determination of Chl-a concentration in China.

Key words: chlorophyll-a; extracting solvent; hot-ethanol extraction; spectrophotometry

富营养化是全球淡水生态系统的主要环境问题之一, 大量的营养物质(主要是氮和磷)的输入往往导致浮游植物群落结构发生改变, 湖泊富营养化导致水体中藻类异常过度繁殖, 甚至造成水华。因此, 浮游植物群落结构和生物量常被用来评价水体的营养状态和污染状况^[1-3]。叶绿素 a 是浮游植物光合作用的重要载体, 其质量约占细胞干质量的 1%~2%, 在光合藻类中广泛存在, 它对细胞成分的贡献使其成为计算浮游藻类生物量和初级生产力的重要指标^[4]。湖泊富营养化的基本评价方法——卡尔森营养状态指数(TSI)及修正的营养状态指数(TSI_m)是按照叶绿素 a 含量的计算结果来划分水体富营养化程度的^[5]。

叶绿素呈深绿或墨绿色油状, 或糊状, 不溶于水, 易溶于丙酮和乙醚等有机溶剂和油脂类。对光、热和酸敏感, 性质不稳定, 遇酸时中心金属镁被氢置换脱离成暗绿至暗褐色的脱镁叶绿素^[6]。

准确测定水体中叶绿素 a 浓度对于评价水体营养状态及进一步管理和修复水域生态系统具有重要意义, 但目前国内外叶绿素 a 测定方法繁杂多样, 国内亦未颁布相应的标准分析方法, 导致不同研究者采用的测定方法多种多样, 从而降低了研究结果

收稿日期: 2012-12-07

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2012CB417005)

① 通信作者 E-mail: ywchen@niglas.ac.cn

之间的可比性,因此制定一种合适的方法对今后研究工作的开展至关重要。笔者在纵观前人研究的基础上,简要回顾了叶绿素 a 测定方法的发展过程,比较分析了常用的测定方法及其优缺点,以期在国内制定科学统一的测定方法提供理论依据。

1 叶绿素 a 的提取方法

浮游植物叶绿素 a 的测定步骤主要包括水样的采集和保存、水样的浓缩、叶绿素 a 的提取以及叶绿素 a 浓度的测定。我国普遍采用的叶绿素 a 提取方法多是参照《湖泊富营养化调查规范》^{[7]268-270}或《水和废水监测分析方法》^{[8]670-671},即丙酮研磨提取法。该方法的具体步骤:将滤膜剪碎,放入研钵或匀浆器中,加入适量 $\varphi = 90\%$ 的丙酮,磨成糊状后倒入离心管内,盖上管塞,摇动后置于黑暗低温处(冰箱)静置。该提取方法存在耗时长、提取不完全和步骤繁琐等缺点,现已有不少研究从细胞破碎方法、提取时间、提取液和提取温度等方面对其加以改进。

1.1 细胞破碎方法

很多研究者指出研磨法不仅费时费力,且不易将样品细胞完全磨碎,多次研磨、转移还会造成样品的损失。因此提出了不研磨直接浸提、超声波法和反复冻融法等多种细胞破碎方法。

文献^[9-11]中,将“带有浮游植物滤膜研磨”步骤改为“滤膜直接放入带塞试管中,加入 $\varphi = 90\%$ 的丙酮直接浸提”,研究表明研磨法处理样品繁琐,相对偏差较大,精密密度不高,测定结果偏低,其原因主要是研磨时容器表面会有残留,转移过程中也会有损失。采用不研磨方法,能够有效地避免样品损失,不需离心、研磨,用 $\varphi = 90\%$ 的丙酮直接浸提可较完全地提取叶绿素 a,具有简单、快速、准确等优点。

另有研究提出采用超声波法来破碎藻细胞^[12-14]。张宗祥等^[14]开展了超声法和研磨法的比较实验,将“研磨”步骤改为“超声振荡处理 10 min”。结果表明,丙酮-超声法测定叶绿素 a 的提取效率和测定结果精密密度均优于丙酮-研磨法,提取效率平均可提高 5%。超声法的整个提取过程在黑暗中进行,可避免光和高温对叶绿素 a 降解的影响,且可避免研磨转移损失,还能有效减少研磨过程中丙酮挥发对操作人员健康的影响。因此,超声波法能明显提高提取效率,而且能保证较高的准确性和精确性。

林少君等^[15]介绍了反复冻融法来破碎藻类细胞,将文献^[7]中的“研磨提取”步骤改为“将过滤水

样后的滤膜装进黑色塑料袋,于 20 °C 冰箱和室温下反复冻融 3~5 次,再放进盛有 10 mL 丙酮($\varphi = 90\%$)的离心管中振摇 1 min 后,于 4 °C 冰箱浸提 20 h,浸提过程中需振摇 1~2 次”,该方法原理是在低温冰冻和室温融解过程中,利用细胞内冰粒的形成和细胞液浓度的增高可引起溶涨从而达到破碎藻细胞的目的。该结果表明采用反复冻融-浸提法所测得的叶绿素 a 水平明显高于研磨法,且标准偏差较小。

与反复冻融法原理相同,也有研究者采用温差法破碎细胞。例如,陈宇炜等^[12]用热乙醇法运用冷热差原理将浮游植物细胞破碎,即将带样品的滤纸置于冰箱冷冻室内冷冻过夜,再迅速用热乙醇在 80 °C 热水浴中萃取。吴志旭等^[16]采用热丙酮法也是利用温度骤变来加速细胞的破裂,该方法能大大缩短实验操作时间。

从以上结果可以看出,超声波法和冻融法都能有效避免研磨法所造成的损失和较大误差,提高提取过效率和精确度。而孙利芹^[17]则采用超声波法和反复冻融法提取紫球藻的藻红蛋白,结果表明超声波法对细胞的破碎率明显高于冻融法。冯菁等^[18]对多种测定方法进行比较认为,超声波法提取叶绿素 a 的效率高于反复冻融法。

1.2 提取液

提取叶绿素 a 的有机溶剂有甲醇、乙醇、丙酮、*N-N* 二甲基甲酰胺(DMF)和混合溶剂等,其中丙酮是最常用的测定叶绿素 a 的提取剂。MARKER^[19]研究指出甲醇提取过程中叶绿素对酸碱度是敏感的,因此在酸化中易产生误差,而且甲醇对人体毒性大,因此,目前甲醇已经很少被用作提取溶剂。1940 年, MACKINNEY 等^[20]首先提出用丙酮作为提取剂, HUMPHREY 等^[21]于 1966 年证实 $\varphi = 90\%$ 的丙酮是提取海洋浮游植物中叶绿素的一种理想溶剂。到目前为止,以 $\varphi = 90\%$ 丙酮为溶剂的方法仍然在广泛使用。

鉴于丙酮作为叶绿素 a 的提取剂存在提取不完全、提取时间长的缺点,人们尝试过很多其他有机溶剂。20 世纪 80 年代国外研究者探索出一种新的溶剂——DMF,并证明它的提取效果确实比丙酮更理想。SUZUKI 等^[22]将 DMF 与丙酮在不同实验条件下的提取效果做了全面比较,为 DMF 的应用推广提供可能。焦念志^[23]首先向国内介绍了这种新的提取剂及其应用方法,指出 DMF 能将提取时间缩短 0.5 h,萃取结果受温度影响小,挥发损失小,而且对叶绿素的提取率高于丙酮,因此他总结出用 DMF 萃

取法测定叶绿素具有高效、快速、简便的优点,且特别适合于野外大批量样品的处理。潘欣等^[24]对DMF提取叶绿素a的方法做了改进,认为以往在常温和4℃条件下虽然对大多数藻类细胞有很好的提取效率,但对有些藻类不能提净,因此改进后通过DMF沸水浴短时间处理来提取微藻细胞叶绿素a被认为是一种更高效的方法。

尽管多个实验都证明DMF法具有高效、省时的优点,但长时间的DMF浸泡会导致部分叶绿素a降解,且DMF毒性较强,易从呼吸道吸入或从皮肤渗入,对操作者危害较大^[25],另外成本也比其他常规提取剂要高,因此不利于叶绿素a的常规大量样品的监测。国内使用DMF的相关研究都是针对海洋浮游藻类,鉴于该方法存在的一些缺点而未得到广泛应用,因此对于DMF法的探索改进还有待研究。

在迄今已知的色素提取溶剂中,乙醇是最安全的提取溶剂,但多被用于提取淡水浮游植物的色素,对海洋浮游植物的提取应用较少。JESPERSEN等^[26]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条件下的萃取效率,为热乙醇萃取法的推广应用提供了较好的理论基础。国际标准组织提出的方法(ISO 10260, 1992)是基于考虑到以上提取剂的毒性而发展起来的方法,已被许多国家的淡水监测实验室使用,所使用的提取液为 $\varphi = 90\%$ 的乙醇溶剂。此后出于萃取效果、安全性等考虑,乙醇逐渐替代丙酮成为国际上通用的叶绿素a提取剂,在最近的研究中得到广泛使用^[27-28]。

陈宇炜等^[12]进行了丙酮与乙醇的对比实验,首次向国内介绍了热乙醇萃取法。将文献^[7]²⁶⁸⁻²⁷⁰中的“丙酮研磨提取”步骤改为“将冷冻后的样品取出后迅速用 $\varphi = 90\%$ 的热乙醇于80℃条件下萃取2min,再置于室温避光处萃取4~6h,最后用 $\varphi = 90\%$ 的乙醇作为参比液,采用分光光度计进行比色测定”。试验结果表明,热乙醇法测定结果高于丙酮法,即萃取更为完全,且测得结果的方差和标准误差小于丙酮。李振国等^[29]的试验也得出了相似的结论,进一步证明了热乙醇法具有萃取效率高的优点。杨彩根等^[30]对乙醇、丙酮和DMF做了比较研究,总结出乙醇法具有萃取完全、重复性好和简便安全等优点,因此建议在水环境监测中应广泛采用乙醇法。梁兴飞等^[31]对热乙醇法做了优化改进,提出用超声辅助热乙醇提取,其改进步骤是“热水浴萃取2min后进行超声破碎,再置于暗处静置”。该研究得出的最佳条件:萃取温度80℃,萃取时间2

h, φ (乙醇)=90%,超声时间10min。该改进方法虽然辅助了超声破碎而使提取效率有所提高,但效率提高并不显著,而且增加这一步骤使得提取过程变得繁琐,时间加长。如果对提取效率有较高要求时可以考虑辅助超声波法,但是对于野外大量样品的集中分析还是建议用更为简便快速的热乙醇法。

2 叶绿素a的测定方法

水体中浮游植物叶绿素a的测定方法根据所使用的仪器可分为荧光光度法、高效液相色谱(HPLC)法和分光光度法。

2.1 荧光光度法

叶绿素分子被紫外光照射后可发射出特征红色荧光,其荧光强度与叶绿素浓度呈正比,据此可采用荧光法进行叶绿素a的定量分析^[32]。荧光法测定叶绿素浓度又分为普通萃取荧光法和同步荧光分析法。

普通萃取荧光法的操作步骤主要为标准溶液的配制、标准曲线的制定和样品荧光强度的测定。将提取的新鲜绿色植物液中的叶绿素作为储备液,用分光光度法标定其浓度;将标准储备液稀释配制成标准系列,用荧光光度计测定标准系列的荧光强度,绘制叶绿素a标准曲线;由样品测得的荧光强度从叶绿素a标准曲线上查得相应浓度。

有研究^[33]指出,叶绿素a和叶绿素b荧光发射峰相隔很近,在普通荧光分析中叶绿素b的荧光发射峰易被叶绿素a的发射峰掩盖,用同步荧光分析法可成功地将其所含叶绿素a和叶绿素b的荧光发射峰分开。同步荧光法是一种新型荧光分析技术,该方法同时扫描荧光分光光度计的激发和发射2个单色器波长,由测得的荧光强度信号与对应的激发波长(或发射波长)构成光谱图。此方法首先应用于海洋浮游植物的色素分析^[33]。唐尧基等^[34]用同步荧光法测定了海水中叶绿素a含量,也充分表明同步荧光法在消除海水中存在的其他色素和干扰物质对测定的影响方面是非常有效的。

2.2 HPLC法

尽管荧光法操作简便,快速,灵敏度较高,但无法给出单种色素的含量。MANTOURA等^[35]于1983年建立了分析海洋浮游植物光合色素组成的HPLC法,WRIGHT等^[36]于1991年对该方法作了改进。此外,国外学者在这一领域做了大量研究,应用HPLC技术分析海洋浮游植物的叶绿素和类胡萝卜素的方法近年来在国际上发展迅速,在国内也有报道,该方法主要用于海洋浮游藻类色素成分的分

析。与荧光法相比,HPLC 法具有更快速、准确的优点,另外由于 HPLC 法有效排除了其他色素的干扰,因此获得的叶绿素含量值偏低,此外两者分析结果的相关性较好^[37]。

HPLC 法能够精确地测定各种光合色素的含量,但由于仪器精密昂贵,分析操作步骤繁琐,一般不用于野外大量样品的快速分析^[38]。如何确定该方法中流动相的组分来进一步提高色素分离的性能,以及如何简化操作步骤来提高测定效率都值得深入研究,期望该方法能在一般的野外样品分析中得以推广。

2.3 分光光度法

由于叶绿体色素溶液各组成成分在可见光谱中具有不同的特征吸收峰,因此应用分光光度计在某一特定波长下所测定的光密度,根据经验公式即可计算出色素溶液中叶绿素 a 浓度。

根据文献[8]⁶⁷⁰⁻⁶⁷¹提供的方法,取带样品的滤膜剪碎后在组织破碎器中加适量 $\varphi = 90\%$ 的丙酮研磨至足够细,移入具塞刻度试管中于暗处静置萃取 24 h 后,置于医用离心机中以 $3\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 得上清液后定容,利用 UV-9100 型分光光度计分别于波长 750、663、645 和 630 nm 处测定光密度。叶绿素 a 含量 [$\rho(\text{Chl-a})$] 的计算公式为

$$\rho(\text{Chl-a}) = [11.64 \times (D_{663} - D_{750}) - 2.16 \times (D_{645} -$$

$$D_{750}) + 0.1 \times (D_{630} - D_{750})] \times V_{\text{丙酮}} / V_{\text{水样}} \times \delta。$$
 其中, $\rho(\text{Chl-a})$ 为丙酮法测定的叶绿素 a 含量, $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$; D_{750} 、 D_{663} 、 D_{645} 和 D_{630} 分别为丙酮萃取液于波长 750、663、645 和 630 nm 处的光密度; $V_{\text{丙酮}}$ 为提取液定容后的体积, mL; $V_{\text{水样}}$ 为水样过滤的体积, L; δ 为比色皿光程, cm。

丙酮研磨提取后用分光光度计测定的方法繁琐费时,准确度较差,建议用热乙醇提取。陈宇炜等^[12]用热乙醇萃取的分光光度法操作步骤:先将过滤后带样品的滤纸冷冻 12 h 以上,取出后用 $\varphi = 90\%$ 的热乙醇水浴萃取,于暗处静置 4~6 h,然后过滤萃取液并定容。将叶绿素样品萃取液在分光光度计中比色,先在波长 665 nm 处测定消光率 E_{665} , 再在 750 nm 处测定消光率 E_{750} 。然后在样品比色皿中用 $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸滴定进行酸化,加盖摇匀,1 min 后重新在 665 nm 处测定消光率 E_{665}' , 再在波长 750 nm 处测定消光率 E_{750}' 。 $\rho(\text{Chl-a})$ 的计算公式为 $\rho(\text{Chl-a}) = 27.9 \times [(E_{665} - E_{750}) - (E_{665}' - E_{750}')] \times V_{\text{乙醇}} / V_{\text{水样}} \times \delta。$ 其中, $V_{\text{乙醇}}$ 为提取液定容的体积, mL。

可见,热乙醇提取法提取效率高,且分光光度法测定步骤也更为简便,而丙酮研磨提取法的测定步骤繁琐,计算公式复杂。叶绿素 a 的 3 种测定方法的优缺点和适用性见表 1。

表 1 3 种测定方法的比较

Table 1 Comparison of three determination methods

测定方法	优点	缺点	适用性
荧光法	灵敏度高,能精确测定叶绿素含量低的样品	易受其他色素干扰	适合测定叶绿素含量较低的样品
高效液相色谱法	快速准确,能有效排除其他色素的干扰	仪器昂贵,分析操作步骤繁琐	对单种色素含量的精度有较高要求
分光光度法	仪器设备简单,操作简便,应用广泛	无法给出单种色素的含量	野外大量样品的快速分析

3 结论

用丙酮研磨提取已经被证明费时,繁琐,准确度差;而直接浸提、反复冻融法虽能有效提取叶绿素 a,且没有加热过程,操作简单,但是这种提取方法耗时较长,如果处理大量样品效率较低。以 DMF 作为萃取剂的方法目前主要是国内外的海洋研究机构在使用,其提取效率高,快速简便,但由于其较大的毒性而不推荐使用,但在应急监测过程中或对监测效率有较高要求时使用该方法可大大缩短分析时间。热乙醇法提取效率高,稳定可靠,步骤简便,且对操作者健康有利,因此是一种值得推广应用的提取方法。

荧光法具有高效、灵敏的优点,HPLC 法可以同

时测定多种色素,但这 2 种方法所使用的仪器昂贵,操作步骤繁琐,难以用作常规的测定方法,比较适合于叶绿素含量低、对单种色素含量有较高要求的样品测定。分光光度法所使用的仪器设备简单,操作简便,因此该方法成为浮游植物叶绿素 a 测定最常用的方法。

目前仍存在一些有待完善和解决的问题:一是如何尽可能完全提取浮游藻类细胞中的叶绿素 a;二是如何防止浮游植物叶绿素 a 在样品处理过程中的降解;三是如何有效排除其他色素的干扰。虽然现行的一些方案都对这些问题作了改进,但还没有得到最满意的结果。在不能完全准确提取的情况下,只能在现有方法中选择一种测定效率相对较高的方法,即热乙醇法提取结合分光光度计测定,其

他方法有待进一步探索和改进。

参考文献:

- [1] CARLSON R E. A Trophic State Index for Lakes [J]. *Limnology and Oceanography*, 1977, 22(2): 361-369.
- [2] 李清雪, 陶建华. 应用浮游植物群落结构指数评价海域富营养化[J]. *中国环境科学*, 1999, 19(6): 548-551.
- [3] 钱奎梅, 陈宇炜, 宋晓兰. 太湖浮游植物优势种长期演化与富营养化进程的关系[J]. *生态科学*, 2008, 27(2): 65-70.
- [4] RENOLDS C S. *Ecology of Phytoplankton* [M]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006: 26.
- [5] 沈韞芬, 章宗涉. 微生物监测新技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1990: 127-129.
- [6] 李英华, 吕秀阳, 任浩明, 等. 叶绿素及其衍生物的分析方法研究进展[J]. *蚕桑通报*, 2004, 35(4): 1-5.
- [7] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 268-270.
- [8] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [9] 司大英, 魏菡, 杨旭. 测定生产力中“叶绿素 a”的方法探讨[J]. *环境工程*, 2000, 8(3): 52-53.
- [10] 韩桂春, 谷丰, 张忠臣. 淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨[J]. *中国环境监测*, 2005, 21(1): 55-57.
- [11] 唐曙霞. 改进淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨[J]. *江淮水利科技*, 2006(5): 40-41.
- [12] 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[J]. *湖泊科学*, 2000, 12(2): 185-188.
- [13] 董正臻. 快速测定藻类生物量的方法探讨[J]. *海洋科学*, 2004, 28(11): 3.
- [14] 张宗祥, 朱宇芳. 超声提取分光光度法测定地表水浮游植物中的叶绿素 a[J]. *干旱环境监测*, 2010, 24(2): 121-123.
- [15] 林少君, 贺立静, 黄沛生, 等. 浮游植物中叶绿素 a 提取方法的比较与改进[J]. *生态科学*, 2005, 24(1): 9-11.
- [16] 吴志旭, 张雅燕. 叶绿素 a 测定方法的改进及最优提取时间探讨[J]. *甘肃环境研究与监测*, 2003, 16(2): 37-38.
- [17] 孙利芹. 紫球藻细胞破碎方法研究[J]. *海洋通报*, 2004, 23(4): 71-74.
- [18] 冯菁, 李艳波, 朱擎, 等. 浮游植物叶绿素 a 测定方法比较[J]. *生态环境*, 2008, 17(2): 524-527.
- [19] MARKER A. The Use of Acetone and Methanol in the Estimation of Chlorophyll in the Presence of Phaeophytin [J]. *Freshwater Biology*, 1972, 2(4): 361-385.
- [20] MACKINNEY G, JOSLYN M. The Conversion of Chlorophyll to Pheophytin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1940, 62(1): 231-232.
- [21] HUMPHREY G, WOOTTON M. Comparison of the Techniques Used in the Determination of Phytoplankton Pigments [R]. Report SCOR-UNESCO, Paris, 1966.
- [22] SUZUKI R, ISHIMARU T. An Improved Method for the Determination of Phytoplankton Chlorophyll Using *N, N*-dimethylformamide [J]. *Journal of Oceanography*, 1990, 46(4): 190-194.
- [23] 焦念志. 一种新的叶绿素高效萃取剂及其应用方法[J]. *海洋科学*, 1994(3): 20.
- [24] 潘欣, 李建宏, 浩云涛, 等. DMF 提取微藻叶绿素 a 方法的改进[J]. *生物技术*, 2001, 11(1): 39-41.
- [25] 陈纪新, 叶翔, 陈小鹏, 等. 有机试剂提取浮游植物光合色素的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(1): 102-106.
- [26] JESPERSEN A, CHRISTOFFERSEN K. Measurements of Chlorophyll-a From Phytoplankton Using Ethanol as Extraction Solvent [J]. *Archiv fur Hydrobiologie*, 1987, 109(3): 445-454.
- [27] THOMPSON R, TOBIN M, HAWKINS S, et al. Problems in Extraction and Spectrophotometric Determination of Chlorophyll From Epilithic Microbial Biofilms: Towards a Standard Method [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 1999, 79(3): 551-558.
- [28] HALLING-SORENSEN B. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Used in Intensive Farming [J]. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 731-739.
- [29] 李振国, 卢军, 王国祥, 等. 分光光度法测定浮游植物叶绿素 a 的比较研究[J]. *中国环境监测*, 2006, 22(2): 21-23.
- [30] 杨彩根, 宋学宏, 孙丙耀. 浮游植物叶绿素 a 含量简易测定方法的比较[J]. *海洋科学*, 2007, 31(1): 6-9.
- [31] 梁兴飞, 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 856-861.
- [32] 孙力. 荧光法测定浮游植物体内叶绿素 a 的探讨[J]. *疾病控制杂志*, 2003, 7(5): 447.
- [33] 朱明远, 邢军, 吴宝铃. 两种荧光分析法在海洋浮游植物叶绿素测定中的应用[J]. *青岛海洋大学学报*, 1994, 24(4): 533-538.
- [34] 唐尧基, 游文玮, 陈莹, 等. 同步荧光法测定海水中叶绿素 a 的含量[J]. *分析仪器*, 2004(3): 24-26.
- [35] MANTOURA R, LLEWELLYN C. The Rapid Determination of Algal Chlorophyll and Carotenoid Pigments and Their Breakdown Products in Natural Waters by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1983, 151: 297-314.
- [36] WRIGHT S, JJEFFREY S, MANTOURA R. Improved HPLC Method for the Analysis of Chlorophylls and Carotenoids From Marine Phytoplankton [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, 77(2): 183-196.
- [37] 戴荣继. HPLC 测定饮用水中藻类叶绿素含量[J]. *北京理工大学学报*, 2006, 26(1): 87-89.
- [38] 陈宇炜, 陈开宇, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨[J]. *湖泊科学*, 2006, 18(5): 550-552.

作者简介: 徐彩平(1989—), 女, 安徽马鞍山人, 硕士生, 主要研究方向为淡水藻类生态学. E-mail: masxcp@126.com