

**클로로필 a**  
(Chlorophyll a)

2014

**1.0 개요****1.1 목적**

이 시험기준은 물속의 클로로필 a의 양을 측정하는 방법으로 아세톤 용액을 이용하여 시료를 여과한 여과지로부터 클로로필 색소를 추출하고, 추출액의 흡광도를 663 nm, 645 nm, 630 nm 및 750 nm에서 측정하여 클로로필 a의 양을 계산하는 방법이다.

**1.2 적용범위**

이 시험기준은 지표수, 폐수 등에 적용할 수 있다.

**1.3 간섭물질**

**1.3.1** 여과지 또는 실험실에서 기인하는 오염물질들이 630 nm ~ 665 nm 파장의 빛을 흡수하여 측정을 방해할 수 있다. 750 nm에서의 흡광도 측정은 시료 안의 탁도를 평가하기 위해 시행되며, 663 nm, 645 nm 및 630 nm에서의 시료 흡광도 값에서 750 nm에서의 흡광도 값을 뺀 후 실제 클로로필의 양을 측정한다. 측정 전에 시료를 원심분리 또는 여과하여 불순물을 제거한다.

**1.3.2** 색소에 대한 정확도와 회수는 여과된 시료의 충분한 불림과 추출 용매 내에서 불린 시간에 관계한다.

**1.3.3** 클로로필 a, b, c의 상대적인 양은 식물성플랑크톤의 분류군에 따라 차이가 있다. 클로로필과 페오포티바이드 a (Pheophytin a) · 페오파이틴 a (Pheophytin

a)의 스펙트럼 겹침 때문에 이 모든 색소를 가지는 용액의 측정값은 증가 또는 감소한다.

1.3.4 모든 광합성 색소들은 빛과 온도에 민감하다.

## 2.0 용어정의

### 2.1 클로로필 a

클로로필 a는 모든 조류에 존재하는 녹색 색소로써 유기물 건조량의 1 % ~ 2 %를 차지하고 있으며, 조류의 생물량을 평가하기 위한 유력한 지표이다.

[주 1] 클로로필 b, c 등 기타 클로로필량은 조류의 분류학적 조성의 지표이다.

## 3.0 분석기기 및 기구

### 3.1 조직 마쇄기 (tissue grinder)

원추형 디자인의 그라인딩 튜브와 막자를 가지는 조직 마쇄기 안에서 유리섬유 여과지를 추출하는 것은 어려우므로 유리 또는 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE, polytetrafluoroethylene)의 재질로 홈이 있는 둥근바닥 그라인드 튜브를 사용한다.

## 4.0 시약 및 표준용액

### 4.1 시약

#### 4.1.1 아세톤(9 + 1)

아세톤 (acetone,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , 분자량 : 58.08) 90 mL에 정제수 10 mL를 혼합한다.

## 5.0 시료채취 및 관리

ES 04130.1c 시료의 채취 및 보존 방법에 따른다.

## 6.0 정도보증/정도관리 (QA/QC)

“내용 없음”

## 7.0 분석절차

### 7.1 전처리

7.1.1 시료 적당량 (100 mL ~ 2,000 mL)을 유리섬유여과지 (GF/F, 47 mm)로 여과 한다.

[주 2] GF/F (0.7  $\mu$ m) 대용으로 GF/B (1.0  $\mu$ m), GF/C (1.2  $\mu$ m), Gelman AE (1.0  $\mu$ m)등을 사용할 수 있다.

[주 3] 시료 여과시 여과압이 20 kPa을 초과하거나 오랜 시간(10분 이상)동안 여과를 하면, 세포를 손상시켜 클로로필의 손실을 일으킬 수 있다.

7.1.2 여과지와 아세톤(9 + 1) 적당량 (5 mL ~ 10 mL)을 조직마쇄기에 함께 넣고 마쇄한다.

7.1.3 마쇄한 시료를 마개 있는 원심분리관에 넣고 밀봉하여 4  $^{\circ}$ C 어두운 곳에서 하룻밤 방치한다.

7.1.4 하룻밤 방치한 시료를 500 g의 원심력으로 20분간 원심분리하거나 혹은 용매-저항 (solvent-resistance)주사기를 이용하여 여과한다.

[주 4] 원심력 (g)의 계산방법

$$\text{상대원심력 (g)} = 0.00001118 \times r \times N^2$$

여기서, 상대원심력 (RCF, relative centrifugal force) : 중력에 대한 비율로 표시될 때의 원심력 (g)

r : 원심분리기 로터 (rotor)의 반지름 (cm)

N : 회전속도 (rpm)

7.1.5 원심 분리한 시료의 상층액을 시료로 한다.

## 7.2 분석방법

7.2.1 전처리한 시료 적당량을 취하여 증장 10 mm 흡수셀에 옮겨 시료로 한다.

7.2.2 아세톤(9 + 1)을 대조용액으로 하여 663 nm, 645 nm, 630 nm, 및 750 nm에서 시료용액의 흡광도를 측정한다.

## 8.0 결과보고

### 8.1 클로로필 a양의 계산

$$\text{클로로필 } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{(11.64X_1 - 2.16X_2 + 0.10X_3) \times V_1}{V_2} \quad (\text{식 1})$$

여기서,  $X_1$  : OD663 - OD750

$X_2$  : OD645 - OD750

$X_3$  : OD630 - OD750

OD : 흡광도 (optical density)

$V_1$  = 상층액의 양 (mL)

$V_2$  = 여과한 시료의 양 (L)

### 8.2 결과보고

소수점 첫째자리까지 보고한다.

## 9.0 참고자료

9.1 APHA, AWWA, WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th ed, 10200 H. "Chlorophyll", (2005)

9.2 EPA 446.0, "In Vitro Determination of Chlorophylls a, b, c1+c2 and

Pheopigments in Marine And Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry",  
EPA, (1997)

**9.3** EPA, "Guide to method Flexibility and Approval of EPA Water Methods",  
Analytical Methods Staff Engineering and Analysis Division(4303) Office of  
Science and Technology Office of Water, Washington, DC, (1996)

## **10.0 부록**

“내용 없음”