
МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу
окружающей среды (Росгидромет)**

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

**РД
52.24.784–
2013**

**МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА «а»
Методика измерений спектрофотометрическим методом
с экстракцией этанолом**

Ростов-на-Дону
2013

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Гидрохимический институт» (ФГБУ «ГХИ»)

2 РАЗРАБОТЧИКИ Е.Н. Бакаева, д-р биол. наук, Н.А. Игнатова, канд. биол. наук, Г.Е. Ковалева, Г.Г. Черникова

3 СОГЛАСОВАН с ФГБУ «НПО «Тайфун» 31.05.2013
и УМЗА Росгидромета 12.07.2013

4 УТВЕРЖДЕН Заместителем Руководителя Росгидромета 15.07.2013

5 АТТЕСТОВАН ФГБУ «ГХИ», свидетельство об аттестации методики измерений № 784.01.00175-2012 от 07.07.2012

6 ЗАРЕГИСТРИРОВАН ЦМТР ФГБУ «НПО «Тайфун» за номером РД 52.24.784-2013 от 02.08.2013

7 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Приписанные характеристики погрешности измерения	2
4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам	2
4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства	2
4.2 Реактивы и материалы	3
5 Метод измерений	4
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	4
7 Требования к квалификации операторов	4
8 Требования к условиям измерений	4
9 Отбор и хранение проб	5
10 Подготовка к выполнению измерений	5
10.1 Подготовка реактивов и фильтров	5
11 Порядок выполнения измерений	6
11.1 Гомогенизация и экстрагирование	6
11.2 Центрифугирование	6
11.3 Спектрофотометрирование экстракта	7
12 Обработка результатов измерений	7
13 Оформление результатов измерений	8
14 Контроль точности результатов измерений	8
14.1 Общие положения	8
14.2 Алгоритм оперативного контроля повторяемости	9
Приложение А (справочное) Определение объемов проб воды для определения хлорофилла а	10
Приложение Б (обязательное) Форма представления результатов по определению массовой концентрации хлорофилла а поверхностных вод водных объектов	12
Библиография	13

Введение

При экологическом мониторинге пресноводных водоемов большое внимание уделяется обилию фитопланктона — основного продуцента первичного органического вещества. При развитии водорослей до степени “цветения” воды оценка обилия фитопланктона становится особенно актуальной. Однако исследования структуры фитопланктона сопряжены с трудностями количественного и качественного учета водорослей, требующего больших затрат времени и хороших знаний таксономии. Применение косвенных методов оценки развития фитопланктона, в частности спектрофотометрического определения пигментов в сестоне, получило широкое распространение с середины прошлого столетия. Исследователей привлекает доступность и быстрота определения пигментов, поэтому во многих гидробиологических работах принято выражать обилие водорослей количеством хлорофилла *a*. В настоящее время содержание хлорофилла *a* широко используется для оценки степени эвтрофикации и интенсивности самоочищения вод.

Фитопланктон играет в водных экосистемах самую важную роль — является поставщиком первичной продукции. Наличие и количество пигментов, в частности хлорофилла *a*, его концентрация служит показателем состояния фитопланктона и позволяет судить и о трофности водного объекта, и о его токсичности, т.е. о качестве вод. Трофность и токсичность являются слагаемыми качества воды, определяемого биологическими методами — биоиндикацией и биотестированием.

В РД 52.24.620 изложены основные принципы оценки уровня антропогенного эвтрофирования пресноводных экосистем по данным фитопланктона. Эта оценка основана на статистической обработке многолетней режимной информации по количественным показателям фитопланктонных сообществ в водоемах и водотоках России. Однако при оперативных наблюдениях, а особенно в случае чрезвычайных ситуаций на водном объекте, необходимо иметь экспрессную информацию для принятия управленческих решений. В этом случае оценку трофности и токсичности вод удобно производить по пигментному составу фитопланктона (в частности хлорофилла *a*), быстро отражающего реакцию фитопланктона на внешнее воздействие.

Пигменты фитопланктона можно разделить на две основные группы: хлорофиллы *a*, *b*, *c* и каротиноиды. Наибольший интерес представляет первая группа пигментов. Основным по количественному содержанию в клетках фитопланктона и лучшим показателем его фотосинтетической активности является хлорофилл *a*. Содержание хлорофилла *a* является одной из основных функциональных характеристик природного фитопланктона. Устойчивая взаимосвязь распределения пигмента с гидрохимическими, гидрологическими и гидробиологическими характеристиками конкретной акватории подтверждает его широкие информа-

ционные возможности. Содержание хлорофилла *a* в планктоне показывает хорошее соответствие с трофическим статусом водоемов. На основании ряда исследований были установлены концентрации хлорофилла *a*, характерные для основных трофических типов водоемов [1]: от 0,1 до 1,0 мкг/дм³ для олиготрофных; от 1,0 до 10 мкг/дм³ для мезотрофных; свыше 10 мкг/дм³ для эвтрофных водоемов.

Из имеющихся к настоящему времени методов определения растительных пигментов – спектрофотометрических, флуориметрических и хроматографических – в гидробиологической практике преимущественно используется спектрофотометрический метод с экстракцией пигментов, разработанный в своей основе Ричардсом Ф. и Томпсоном Т. [2]. Этот метод рекомендован для сети Росгидромета для определения пигментов фитопланктона [1].

Из существующей приборной базы для определения концентрации хлорофилла используют флуориметры. Однако флуориметры рекомендованы для определения хлорофилла *a* при низком содержании его в планктоне (менее 0,1 мкг/дм³). На юге России, как правило, значения концентрации хлорофилла *a* на порядок выше.

Использование фотометров менее пригодно, чем спектрофотометров, из-за отсутствия светофильтра, близкого к 675 нм, соответствующего максимуму поглощения хлорофилла *a* в интактных клетках.

Наиболее оптимальными приборами для определения хлорофилла *a* являются спектрофотометры, не требующие сжигания пробы, с разрешающей способностью 1 - 2 нм при длине волны 664 нм с кюветами 1 и 2 см.

Разработка методики определения массовой концентрации хлорофилла *a* спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом обусловлена необходимостью получения адекватной информации о качестве вод поверхностных водных объектов и наличием ряда методических проблем. Так, известны разные методы экстракции хлорофилла *a* с помощью ацетона по ГОСТ 17.1.4.02 и этанола по ISO 10260:1992. Формулы расчета массовой концентрации хлорофилла *a*, указанные в литературе, даже при использовании одного растворителя отличаются. Существенно отличаются абсолютные значения массовых концентраций хлорофилла *a*, получаемых с помощью разных растворителей. В этанольных вытяжках абсолютные цифры массовых концентраций хлорофилла *a* выше, поскольку происходит более полное экстрагирование пигмента. Кроме того безопасность для оператора и окружающей среды при использовании этанольных экстрактов значительно ниже.

Использование данной методики позволяет повысить результативность исследований по наблюдению за качеством поверхностных вод суши и обеспечить экологическую безопасность исследований.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА *a*
Методика измерений спектрофотометрическим методом
с экстракцией этанолом

Дата введения – 2013-12-01

1 Область применения

1.1 Настоящий руководящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации хлорофилла *a* спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом в диапазоне от 0,1 мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в поверхностных водах суши различной трофности: от ультраолиготрофных до политрофных вод (далее – методика).

1.2 Методика предназначена для лабораторий, осуществляющих наблюдения за химико-биологическим состоянием поверхностных вод суши в рамках государственной службы наблюдений за состоянием окружающей природной среды, для подразделений соответствующих министерств, осуществляющих природоохранную деятельность, а также для проведения научно-исследовательских экотоксикологических и экологических работ.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 17.1.4.02-90 Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *a*

ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ISO 10260:1992 Качество воды. Измерение биохимических параметров. Спектрофотометрическое определение концентрации хлорофилла *a*

РД 52.24.620-2000 Методические указания. Охрана природы, Гидросфера. Организация и функционирование подсистемы мониторинга антропогенного эвтрофирования пресноводных экосистем

Примечание — Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделе 4.

3 Приписанные характеристики погрешности измерения

При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения с вероятностью 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Диапазон измерений массовой концентрации хлорофилла *a*, значения характеристик погрешности и ее составляющих при принятой вероятности $P=0,95$

Трофность водного объекта (категории трофности)	Диапазон измеряемых концентраций хлорофилла <i>a</i> X , мкг/дм ³	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ , мкг/дм ³	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R , мкг/дм ³	Показатель точности (границы погрешности при вероятности $P=0,95$) Δ , мкг/дм ³
Ультра олиготрофные	От 0,1 до 5,9 включ.	0,4	0,5	1,0
Олиготрофные	Св. 6,0 до 10,9 включ.	0,7	0,8	1,6
Мезотрофные	Св. 11,0 до 25,9 включ.	1,8	2,2	4,3
Эвтрофные	Св. 26,0 до 75,9 включ.	3,0	3,6	7,1
Политрофные	Св. 76,0 до 150,0 включ.	12,3	14,8	29,0

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

4.1.1 Спектрофотометр № СФ-8, Спекол-221 или иной спектрофотометр с аналогичными характеристиками. Выделяемый спектральный интервал должен быть не более 2-3 нм, точность установки длин волн в диапазоне от 400 до 750 нм не ниже ± 2 нм, погрешность измерений по шкале оптических плотностей не более 0,01 относительных единиц.

4.1.2 Центрифуга лабораторная, типа ЦЛН-2, ОПН-ВУХЛ 4.2 или иная с ускорением 4000-5000 g.

4.1.3 Водяная баня, поддерживающая температуру (75 ± 1) °С.

4.1.4 Устройство фильтрующее с воронками типа Зейтца под фильтры диаметром 35 мм.

4.1.5 Насос вакуумный ручной для фильтровального аппарата с манометром, типа Сарториус 16673.

4.1.6 Батометр для отбора проб воды, типа Руттнера или иной с металлическим резервуаром с изолированным органическим покрытием, устраняющим коррозионные и теплехимические реакции, объемом от 0,5 до 3 литров.

4.1.7 Канистры полиэтиленовые темного цвета. Количество канистр полиэтиленовых зависит от количества отобранных проб воды для анализа.

4.1.8 Пробирки стеклянные градуированные с притертой пробкой на 10 см^3 с ценой деления $0,1 \text{ см}^3$ по ГОСТ 1770-74. Количество пробирок стеклянных градуированных зависит от количества отобранных проб воды для анализа.

4.1.9 Пробирки центрифужные на 10 см^3 с ценой деления $0,1 \text{ см}^3$ П1-10-105 ГОСТ 1770-74. Количество пробирок центрифужных определяется маркой центрифуги.

4.1.10 Колбы мерные вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770-74. Количество колб мерных зависит от количества отобранных проб воды для анализа.

4.1.11 Фарфоровая ступка с пестиком диаметром 3,0 см.

Примечание — Допускается применение других типов средств измерений, посуды и вспомогательных устройств, в том числе импортных, с аналогичными и лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

4.2 Реактивы и материалы

4.2.1 Порошок углекислого магния MgCO_3 , х.ч.

4.2.2 Спирт этиловый (этанол) по ГОСТ 18300-87.

4.2.3 Соляная кислота по ГОСТ 3118-77, ч.д.а.

4.2.4 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

4.2.5 Фильтры мембранные «Владипор МФАС-ОС-2», 0,35 мм по ТУ 6-55-221-1-29-89 или другого типа, равноценного по характеристикам.

4.2.6 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

Примечание — Допускается использование реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных с квалификацией не ниже указанной в 4.2.

5 Метод измерений

Метод основан на спектрофотометрическом измерении этанольного экстракта пигментов фитопланктона до и после его подкисления раствором соляной кислоты.

Для приготовления экстракта пробу воды фильтруют через мембранный фильтр с нанесенным на нем слоем углекислого магния. Осадок с фильтра снимают, перетирают в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества этанола. Пигменты экстрагируют чистым этанолом, с помощью центрифугирования из экстракта удаляют светорассеивающую взвесь.

Расчеты концентрации хлорофилла *a* основаны на известных удельных спектральных показателях поглощения света хлорофиллом *a*.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 При выполнении измерений массовой концентрации хлорофилла *a* в пробах поверхностных вод суши соблюдают требования безопасности, установленные в национальных стандартах и соответствующих нормативных документах.

6.2 По степени воздействия на организм вредные вещества, используемые при выполнении измерений, относятся к 3-му классу опасности по ГОСТ 12.1.007.

6.3 Содержание используемых вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать установленных предельно допустимых концентраций в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

6.4 Слив отходов анализа в канализацию допускается после их предварительного разбавления.

7 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и к обработке их результатов допускают лиц с высшим химическим или биологическим образованием, обладающих опытом проведения типовых биохимических анализов, а так же навыками обращения со спектрофотометрами, и освоившие методику.

8 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений в лаборатории соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С.....22±5;
- атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.) от 84,0 до 106,7 (от 630 до 800);
- влажность воздуха при температуре 25 °С, %, не более.....80;
- напряжение в сети, В.....220±10;
- частота переменного тока в сети питания, Гц.....50±1.

9 Отбор и хранение проб

9.1 Отбор проб воды проводят в соответствии с ГОСТ Р 51592.

9.2 Отобранные пробы воды объемом от 0,1 до 2 дм³ в зависимости от концентрации хлорофилла *a* (приложение А) следует немедленно профильтровать. При отсутствии такой возможности допускается хранить пробу в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С. Максимально допустимая продолжительность хранения с момента отбора составляет 3 ч. После хранения, перед началом фильтрования, пробу необходимо осторожно перемешать.

9.3 Пробу воды фильтруют через мембранный фильтр, покрытый слоем MgCO₃. Предварительно для получения на фильтре плотного и равномерного по толщине слоя MgCO₃ и во избежание его взмучивания наливают в фильтровальную воронку 5 см³ суспензии MgCO₃, создают перепад давления, пропуская ее до полного осаждения. Фильтр с суспензией подсушивают на воздухе, после чего приступают к фильтрованию отобранной пробы.

Фильтрование проводят под вакуумом или под давлением (в том числе самотеком), перепад давления от 0,15 до 0,20 атм.

Продолжительность фильтрования не должна превышать 15 мин.

9.4 После окончания фильтрования необходимо подсушить фильтр с помощью фильтровальной бумаги, подкладывая ее в несколько слоев под фильтр с осадком и меняя три раза в течение 15 мин. При необходимости высушенный фильтр можно хранить в холодильнике при температуре 4 °С в течение трех дней, а в морозильнике при температуре ниже минус 25 °С хранение возможно в течение 30 дней.

9.5 Воронку Зейтца необходимо тщательно вымыть и прополоскать дистиллированной водой после фильтрования пробы.

9.6 Хлорофилл *a* легко разрушается под воздействием света, при повышении температуры и в кислой среде, поэтому при проведении всех процедур, начиная от момента отбора пробы и до окончания спектрофотометрирования необходимо обеспечить нахождение объекта анализа (пробы воды, фильтра с осадком или экстракта) в затемненном прохладном месте при отсутствии паров кислоты.

9.7 Продолжительность анализа одной пробы от момента ее отбора до окончания спектрофотометрирования без учета времени хранения пробы, фильтра с осадком и экстракта не должна превышать 3 ч.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Подготовка реактивов и фильтров

10.1.1 Порошок углекислого магния (MgCO₃), тщательно растирают в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества дистиллированной воды и используют для приготовления суспензии. Рекомендуются

емая концентрация MgCO_3 в суспензии 30 г/дм^3 . Порция суспензии, добавляемой в фильтровальную воронку перед фильтрованием, берется из расчета $5 \text{ см}^3 \text{ MgCO}_3$.

10.1.2 В небольшом объеме дистиллированную воду заливают в сосуд, в котором производится кипячение (бикс, химический стакан, эмалированная кастрюля и т. п.). Дистиллированную воду в сосуде доводят до температуры от $80 \text{ }^\circ\text{C}$ до $90 \text{ }^\circ\text{C}$, после чего нагрев убавляют. Далее осторожно с помощью пинцета достают мембранные фильтры из пачки и по одному помещают на поверхность воды для предотвращения скручивания. Дистиллированную воду с помещенными в нее мембранными фильтрами медленно доводят до кипения и кипятят на слабом огне в течение 15 мин. После кипячения проводят выбраковку деформированных фильтров. Затем воду сливают и заменяют небольшим количеством (чтобы покрыть мембранные фильтры) стерильной дистиллированной водой. После этого мембранные фильтры готовы к использованию. Готовые мембранные фильтры хранят в дистиллированной воде в закрытом боксе.

10.1.3 Готовят $0,5 \text{ M}$ раствор соляной кислоты. Для этого пипеткой берут $3,0 \text{ см}^3$ концентрированной соляной кислоты с удельным весом $1,19$, вносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой. Аккуратно перемешивают.

11 Порядок выполнения измерений

11.1 Гомогенизация и экстрагирование

11.1.1 Слой MgCO_3 , содержащий отфильтрованную взвесь, снимают скальпелем с мембранного фильтра и полностью переносят в фарфоровую ступку.

11.1.2 В ступку добавляют 2 см^3 чистого этанола и в течение 2 мин взвесь тщательно растирают.

11.1.3 Перетертую взвесь с этанолом переносят в плоскодонную колбу вместимостью 30 см^3 , закрывают пробкой для предотвращения потерь экстрагента. Колбу слегка встряхивают и погружают в нагретую до температуры $75 \text{ }^\circ\text{C}$ водяную баню. Нагревают сосуд до 5 мин. Затем экстракту дают остыть и сливают его в центрифужную пробирку, смывая этанолом остатки пигмента из колбы.

Объем экстракта в центрифужной пробирке доводят этанолом до 10 см^3 .

11.2 Центрифугирование

11.2.1 Светорассеивающую взвесь удаляют из экстракта центрифугированием при $4000\text{--}5000 \text{ г}$ в течение 45 мин. Чистота экстракта контролируется по оптической плотности на 750 нм . Последняя не должна

превышать 0,005 относительных единиц на каждый сантиметр рабочей длины кюветы. При более высокой плотности центрифугирование следует повторить.

11.2.2 После центрифугирования экстракт следует перенести в стеклянную мерную пробирку, при необходимости добавляя чистый этанол, довести его объем до объема фотометрической кюветы и закрыть пробирку притертой пробкой.

Экстракту необходимо отстояться в течение 15 мин.

11.3 Спектрофотометрирование экстракта

11.3.1 Чистый экстракт переносят пипеткой в спектрометрическую кювету. При спектрофотометрировании используют кюветы с рабочей длиной от 0,5 до 5,0 см в зависимости от объема экстракта и его оптической плотности. Последняя должна находиться в диапазоне от 0,05 до 0,8 относительных единиц.

11.3.2 Измерение оптических плотностей проводят на длине волны 664 и 750 нм до и после подкисления экстракта. Экстракт перед повторным измерением подкисляют 0,01 см³ соляной кислоты на 10 см³ объема экстракта.

11.3.3 Измерение оптических плотностей подкисленного экстракта проводят на двух длинах волн 664 и 750 нм.

12 Обработка результатов измерений

Для расчета концентрации хлорофилла а предварительно рассчитывают оптическую плотность экстракта до и после подкисления.

Поглощающую способность экстракта перед подкислением A , отн. ед., вычисляют по формуле

$$A = A_{664} - A_{750}, \quad (1)$$

где A_{664} – оптическая плотность экстракта на длине волны 664 нм до подкисления;

A_{750} – оптическая плотность экстракта на длине волны 750 нм до подкисления.

Поглощающую способность экстракта после подкисления A_a , отн. ед., вычисляют по формуле

$$A_a = A'_{664} - A'_{750}, \quad (2)$$

где A'_{664} – оптическая плотность экстракта на длине волны 664 нм после подкисления;

A'_{750} – оптическая плотность экстракта на длине волны 750 нм после подкисления.

Концентрацию хлорофилла *a* в пробе *X*, мкг/дм³, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(A - A_a)}{K_c} \cdot \frac{R}{R-1} \cdot \frac{V_e}{V_s \cdot d} \cdot 10^3 \quad (3)$$

где K_c – коэффициент для хлорофилла *a*, равный 82 дм³/(мг · см);

R – отношение (A/A_a) для чистого хлорофилла *a*, равное 1,7;

V_e – объем использованного экстракта, см³;

V_s – объем отфильтрованной пробы, см³;

d – длина кюветы, см.

При использовании 90 % этанола концентрацию хлорофилла *a* вычисляют по упрощенной формуле

$$X = 29,6 (A - A_a) \cdot \frac{V_e}{V_s \cdot d} \quad (4)$$

13 Оформление результатов измерений

Результаты измерений должны содержать следующую информацию:

- место, время и устройство отбора проб;
- любые отклонения от данной методики и другие обстоятельства, которые могут повлиять на результаты определений;
- ссылка на настоящий руководящий документ.

Результаты измерений представляют в соответствии с таблицей Б.1 (приложение Б).

14 Контроль точности результатов измерений

14.1 Общие положения

14.1.1 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности повторяемости).

14.1.2 Периодичность оперативного контроля исполнителем процедуры выполнения измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируются в Руководстве по качеству лаборатории.

14.2 Алгоритм оперативного контроля повторяемости

14.2.1 Контроль повторяемости осуществляют для одной пробы из серии 10-12 рабочих проб. Для этого отобранную пробу воды делят на две части, и выполняют измерения в соответствии с разделом 11 одновременно в обеих аликвотах.

14.2.2 Результат контрольной процедуры r_k , мкг/дм³, рассчитывают по формуле

$$r_k = X_1 - X_2, \quad (5)$$

где X_1 , X_2 – результаты параллельных измерений массовой концентрации хлорофилла *a* в пробе, мкг/дм³.

14.2.3 Предел повторяемости r_n , мкг/дм³, рассчитывают по формуле

$$r_n = 2,77 \cdot \sigma_r, \quad (6)$$

где σ_r – показатель повторяемости методики, мкг/дм³.

14.2.4 Результат контрольной процедуры должен удовлетворять условию

$$r_k \leq r_n. \quad (7)$$

14.2.5 При несоблюдении условия (7) выполняют еще два измерения и сравнивают разницу между максимальным и минимальным результатами с нормативом контроля равным $3,6 \cdot \sigma_r$. В случае повторного превышения предела повторяемости, поступают в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6 (раздел 5).

Приложение А (справочное)

Определение объемов проб воды для определения хлорофилла а

Объем пробы воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла а в пробе ориентировочно можно определить в соответствии с таблицей А.1 по ГОСТ 17.1.4.02 (приложение 2).

Т а б л и ц а А.1 – Объем проб воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла а в пробе

Концентрация хлорофилла а в пробе, мкг/дм ³	Объем пробы, дм ³
0,05	Св. 40
0,1	Св. 20 до 40 включ.
0,5	Св. 4 до 20 включ.
5,0	Св. 0,4 до 4 включ.
50,0	Св. 0,2 до 0,4 включ.
100,0	Св. 0,02 до 0,2 включ.

Приведенные объемы проб рассчитаны, исходя из:

- оптимального диапазона оптических плотностей экстракта на длине волны 664 нм (0,005–0,8 относительных единиц). Если относительные единицы оптической плотности экстракта будут превышать значения 0,8, то экстракт следует разбавить этанолом в два раза и провести повторное измерение на приборе. В этом случае при расчете хлорофилла а необходимо учесть примененное разбавление;

- характерного отношения объема к рабочей длине для кювет, обычно используемых при фотометрировании. Это отношение может меняться от 2,5 до 4. При использовании специальных кювет с меньшим отношением объема к длине объем проб следует уменьшить пропорционально уменьшению указанного отношения.

Ориентировочные соотношения между количеством хлорофилла а в экстракте, мкг, длиной кюветы l , см, объемом экстракта в кювете V_3 , см³, концентрацией хлорофилла а в экстракте X , мкг/см³, и оптической плотностью D_{664} приведены в таблице А.2. Таблица А.2 составлена в соответствии с ГОСТ 17.1.4.02 (приложение 2).

Т а б л и ц а А.2 – Ориентировочные соотношения между количеством хлорофилла *a* в экстракте, длиной кюветы *l*, объемом экстракта в кювете V_3 , концентрацией хлорофилла *a* в экстракте *X* и оптической плотностью D_{664}

Количество хлорофилла <i>a</i> в экстракте, мкг	Параметры			
	<i>l</i> , см	V_3 , см ³	<i>X</i> , мкг/см ³	D_{664}
2	1	4	0,500	0,050
	2	8	0,250	
	5	20	0,100	
5	1	4	1,250	0,125
	2	8	0,625	
	5	20	0,250	
10	1	4	2,500	0,250
	2	8	1,250	
	5	20	0,500	
20	1	4	5,000	0,500
	2	8	2,500	
	5	20	1,000	

Приложение Б
(обязательное)

**Форма представления результатов определения
массовой концентрации хлорофилла а поверхностных вод
водных объектов**

Результаты определения концентрации хлорофилла а поверхностных вод водных объектов приводят в соответствии с таблицей Б.1.

Т а б л и ц а Б.1 – Форма предоставления результатов определения массовой концентрации хлорофилла а поверхностных вод водных объектов

Наименование		Дата		Номер пробы	Концентрация хлорофилла а X, мкг/дм ³
водного объекта	пункта наблюдений	отбора пробы	проведения анализа		
1	2	3	4	5	6

Библиография

[1] Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений / Под ред. А.В. Абакумова. – Л.: Гидрометеиздат, 1983. – 239 с.

[2] Richards F. A., Thompson T. G. The estimation and characterisation of plankton populations by pigment analysis. II Spectrophotometric method for estimation of plankton pigments. – J. Mar. Res., 1952, vol. 11, N 2, p. 156-172.

Лист регистрации изменений

Номер изменения	Номер страницы				Номер документа (ОРН)	Подпись	Дата	
	изме- нен- ной	заме- нен- ной	новой	анну- лирован- ной			внесения изменения	введения изменения

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИДРОХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»**

344090, г. Ростов-на-Дону
пр. Стачки, 198

Факс: (863) 222-44-70
Телефон (863) 297-51-63
E-mail: ghi@aaanet.ru

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики измерений № 784.01.00175-2012

Методика измерений массовой концентрации хлорофилла *a* спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом, разработанная федеральным государственным бюджетным учреждением «Гидрохимический институт» (ФГБУ «ГХИ») и регламентированная РД 52.24.784-2013 Массовая концентрация хлорофилла *a* в водах. Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом, аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований.

1. В результате аттестации установлено, что методика соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает метрологическими характеристиками, приведенными в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Диапазон измерений массовой концентрации хлорофилла *a*, значения характеристик погрешности и ее составляющих при принятой вероятности $P=0,95$

Трофность водного объекта (категории трофности)	Диапазон измерений массовых концентраций хлорофилла <i>a</i> X, мг/дм ³	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ , мг/дм ³	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R , мг/дм ³	Показатель точности (границы погрешности) Δ , мг/дм ³
Ультра олиготрофные	От 0,1 до 5,9 включ.	0,4	0,5	1,0
Олиготрофные	Св. 6,0 до 10,9 включ.	0,7	0,8	1,6
Мезотрофные	Св. 11,0 до 25,9 включ.	1,8	2,2	4,3
Эвтрофные	Св. 26,0 до 75,9 включ.	3,0	3,6	7,1
Политрофные	Св. 76,0 до 150,0 включ.	12,3	14,8	29,0

Таблица 2 – Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при принятой вероятности $P=0,95$

Трофность водного объекта (категории трофности)	Диапазон измерений массовых концентраций хлорофилла а, мкг/дм ³	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) г , мкг/дм ³	Предел воспроизводимости (для двух результатов измерений) R, мкг/дм ³
Ультра олиготрофные	От 0,1 до 5,9 включ.	1,1	1,4
Олиготрофные	Св. 6,0 до 10,9 включ.	1,9	2,2
Мезотрофные	Св. 11,0 до 25,9 включ.	4,9	6,1
Эвтрофные	Св. 26,0 до 75,9 включ.	8,3	10,0
Политрофные	Св. 76,0 до 150,0 включ.	34,1	40,9

2 При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости).

Алгоритм оперативного контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в РД 52.24.784-2013.

Периодичность оперативного контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Дата выдачи свидетельства 07.07.2012.

Директор

А.М. Никаноров

Главный метролог

А.А. Назарова

