

RF – Rogalandsforskning. <http://www.rf.no>

Forfatter: Åge Molversmyr

Sammenlignende laboratorieprøving 2003 Analyse av klorofyll a

Rapport RF – 2003/264

Prosjektnummer: 7151687
Prosjektets tittel: Sammenlignende laboratorieprøving for
klorofyll a - 2003
Kvalitetssikrer: Stig Westerlund

Oppdragsgiver(e): RF / SLP-deltakere

ISBN: 82-490-0168-0
Gradering: Åpen

Forord

RF – Rogalandforskning har to ganger tidligere arrangert sammenlignende laboratorieprøvinger for klorofyll a, i 1997 og i 2000. Etter ønske fra flere laboratorier, ble det på nytt arrangert en tilsvarende laboratorieprøving i 2003.

Prøvetaking og utsendelse av prøver ble utført 25. august 2003, av Åge Molversmyr (RF) og Finn Løvhøyden (M-Lab). 11 laboratorier deltok i prøvingen, som hovedsakelig ble finansiert gjennom en deltakeravgift.

Stavanger, 10. desember 2003

Prosjektleder: Åge Molversmyr

Innhold

SAMMENDRAG	1
1 GJENNOMFØRING.....	2
1.1 Innhenting av vannprøver og prøveutsendelse.....	2
1.2 Anvendte metoder	3
1.3 Presentasjon og vurdering av resultatene.....	3
2 RESULTATER	4
2.1 Statistikk	7
3 VURDERINGER OG KONKLUSJONER	8
4 DELTAKERE	10
5 REFERANSER.....	11

Sammendrag

Det deltok 11 laboratorier i denne sammenlignende laboratorieprøvingen som omfattet analyse av klorofyll *a*, og det ble benyttet 4 ulike analysemetoder. Det ble analysert 4 prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer), to med relativt høyt algeinnhold (prøve A og B) og to med lavt algeinnhold (prøve C og D).

Laboratoriene oppnådde stort sett tilfredsstillende resultater med de aktuelle analysemetodene, og dataene gir ikke grunnlag for å avdekke eventuelle metodiske forskjeller.

For prøveparet med høyt klorofyllinnhold (A og B) var 73% av resultatene tilfredsstillende, når en akseptgrense på 15% legges til grunn. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde 82% mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. For prøveparet med lavt klorofyllinnhold (C og D) var 55% av resultatene tilfredsstillende (innenfor en akseptgrense på 20%), mens 73% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var om lag som ved forrige SLP i 2000.

Fem av laboratoriene er akkreditert for analyse av klorofyll *a*, og med unntak av ett som mottok prøvene senere enn de andre, oppnådde alle disse tilfredsstillende resultater for samtlige enkeltprøver (med avvik < 13% fra antatt "sann" verdi).

Betydelige avvik fra antatt "sann" verdi kunne synes å ha sammenheng med forlenget periode før prøvefiltrering, eller også med mangelfull kontroll og kalibrering av spektrofotometeret. Resultatene indikerer at prøver bør håndteres og filtreres i tråd med retningslinjene som er gitt i standardmetodene, og at anbefalingene om å unngå høye eller lave absorbanser ved spektrofotometermålinger bør tas i betraktning. En bør dessuten unngå å samle for mye materiale på filtrene som skal ekstraheres.

1 Gjennomføring

Denne sammenlignende laboratorieprøvingen er gjennomført etter prinsippene i Youdens metode (Youden & Steiner 1975). Deltakerne analyserer prøver parvis, der prøveparene har samme matriks og konsentrasjoner i samme konsentrasjonsområde. Analysesvarene presenteres i et Youdendiagram, der hver deltakers resultat for et prøvepar er avsatt i et punkt. Punktets plassering i diagrammet gir et mål for analysefeilens størrelse og art. Videre beskrivelser gis i avsnitt 1.3.

1.1 Innhenting av vannprøver og prøveutsendelse

Laboratorieprøvingen er basert på prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer): 2 med relativt høyt algeinnhold (prøve A og B) og 2 med lavt algeinnhold (prøve C og D).

Prøvene ble hentet inn 25. august 2003. Ved prøveinnhenting i felt ble vannet filtrert gjennom en nylonduk med maskevidde 150 µm, før vannet ble helt på 25 liters kanner. Filtringen ble gjort for å fjerne store individer av dyreplankton, som kunne tenkes å forårsake forskjeller mellom delprøver dersom dyreplankton ble fordelt ulikt på disse.

På laboratoriet ble hele prøven overført til en større dunk, hvor prøven ble forsiktig blandet før overføring til mindre plastflasker. Prøve A og B ble overført til 1 liters flasker som var pakket i aluminiumsfolie for å unngå påvirkning fra lys. Prøve C og D ble overført til 2,5 liters blå, lystette plastkanner. Alle flaskene/kannene ble fylt helt fulle. Prøveflaskene ble emballert sammen med et fryseelement, for å holde lav temperatur så lenge som mulig.

Prøvene ble sendt som ekspresspakker til de enkelte deltakerne, slik at de ville være fremme om morgenen/ formiddagen dagen etter. Ett laboratorium mottok likevel ikke prøvene før etter ytterligere ett døgn, og dette laboratoriet oppnådde også sterkt avvikende resultater (se videre under avsnitt 3).

Følgende prøver ble sendt ut:

Prøve A og B: Innsjøprøver med algebiomasse på henholdsvis 1,59 og 1,54 mg/l (våtvekt). Plantep planktonet bestod i hovedsak av blågrønnalger (*Gomphosphaeria*) og fureflagellater (*Ceratium*), med innslag av kiselalger (*Fragilaria*), ulike typer grønnalger og små uidentifiserte algetyper (µ-alger). I prøve B var det noe mer kiselalger og noe mindre blågrønnalger enn i prøve A.

Prøve C og D: Innsjøprøver med algebiomasse på henholdsvis 0,16 og 0,25 mg/l (våtvekt). Plantep planktonet bestod i hovedsak av ulike typer grønnalger og små uidentifiserte alger (µ-alger), med et lite innslag av fureflagellater og blågrønnalger. I prøve C var andelen blågrønnalger litt høyere (*Gomphosphaeria lacustris*), mens andelen grønnalger var høyere i prøve D.

1.2 Anvendte metoder

Analysemetode	Antall lab.	Prinsipp
NS 4766	1	Ekstraksjon med 90% aceton, og med oppmaling av filter.
NS 4767	7	Ekstraksjon med 100% metanol, uten oppmaling av filter.
SS 028146	1	Som NS 4766, men med korreksjon for klorofyll <i>b</i> og <i>c</i> .
Stauffer <i>et al.</i> (1979)	2	Ekstraksjon med aceton og DMSO i forhold 1:1, uten oppmaling av filter.

Laboratoriene benyttet filteroppsats med GF/C filtre med diameter fra 42,5 til 55 mm. Et laboratorium anga ikke filterstørrelse.

De fleste laboratoriene startet filtrering relativt umiddelbart etter prøvemottak (noen ventet til senere samme dag), mens to laboratorier oppbevarte prøvene til neste dag før filtrering. Fem laboratorier startet ekstraksjon umiddelbart, mens de andre oppbevarte filtrerne i fryser (fra 1 til 21 døgn) før videre analyse (ekstraksjon).

1.3 Presentasjon og vurdering av resultatene

Analyseresultater er behandlet etter følgende regler:

Resultater som avviker mer enn 50% fra medianverdien av samtlige resultater forkastes. Av gjenstående data finnes middelværdi (\bar{x}) og standardavvik (s). Resultater som ligger utenfor $\bar{x} \pm 3s$ forkastes før endelig beregning av middelværdi, standardavvik, og andre statistiske parametere.

Som antatt "sann" verdi er valgt medianverdien av samtlige godkjente resultater.

Resultatene for prøvepar i samme konsentrasjonsnivå er fremstilt i såkalte Youdendiagram (figur 1 og figur 2). Denne formen for datafremstilling gjør det mulig å skjelne mellom systematiske og tilfeldige feil. I praksis sprer punktene seg oftest langs en 45°-linje trekt gjennom skjæringspunktet mellom linjene som markerer "sann" verdi. Dette viser at en oftest gjør samme systematiske feil ved analyse av to nærstående prøver. Avstanden parallelt med 45°-linjen uttrykker bidraget fra systematiske feil, mens avstanden vinkelrett på linjen viser bidraget fra tilfeldige feil. Totalfeilen er gitt ved uttrykket:

$$\text{Totalfeil} = \sqrt{(\text{Sann}_1 - \text{Res}_1)^2 + (\text{Sann}_2 - \text{Res}_2)^2}$$

Grensen for akseptabelt resultat angis som en sirkel med sentrum i skjæringspunktet mellom linjene for "sann" verdi. Sirkelens radius (akseptgrensen) er en gitt andel av midlere "sann" verdi for de to prøvene som danner et par. Det er foreslått en akseptgrense på $\pm 15\%$ for prøvene med høyt klorofyllinnhold (A og B) og $\pm 20\%$ for prøvene med lavt innhold (C og D). Resultatpar som faller innenfor sirkelen har totalfeil mindre enn denne akseptgrensen.

Resultatene er også presentert i tabell 1, som angir samtlige innsendte resultater, tid fra prøvoforsendelse fra RF til filtrering, eventuell lagringstid for filtre i fryser, og rangeringsnummer etter minst totalfeil (gjennomsnitt for de to prøveparene). Resultater fra statistiske vurderinger er vist i tabellform under avsnitt 2.1.

2 Resultater

For å kontrollere at prøvene var godt blandet ved uttak av delprøver, ble første og siste delprøve fra de aktuelle prøvene analysert for Klorofyll *a* (5 replikater fra hver) ved RF. Resultater fra disse målingene viste ingen signifikante forskjeller mellom første og siste prøveuttak, og de viste godt samsvar med antatte "sanne" verdier.

Analyseresultatene fra de deltakende laboratoriene er gjengitt i tabell 1.

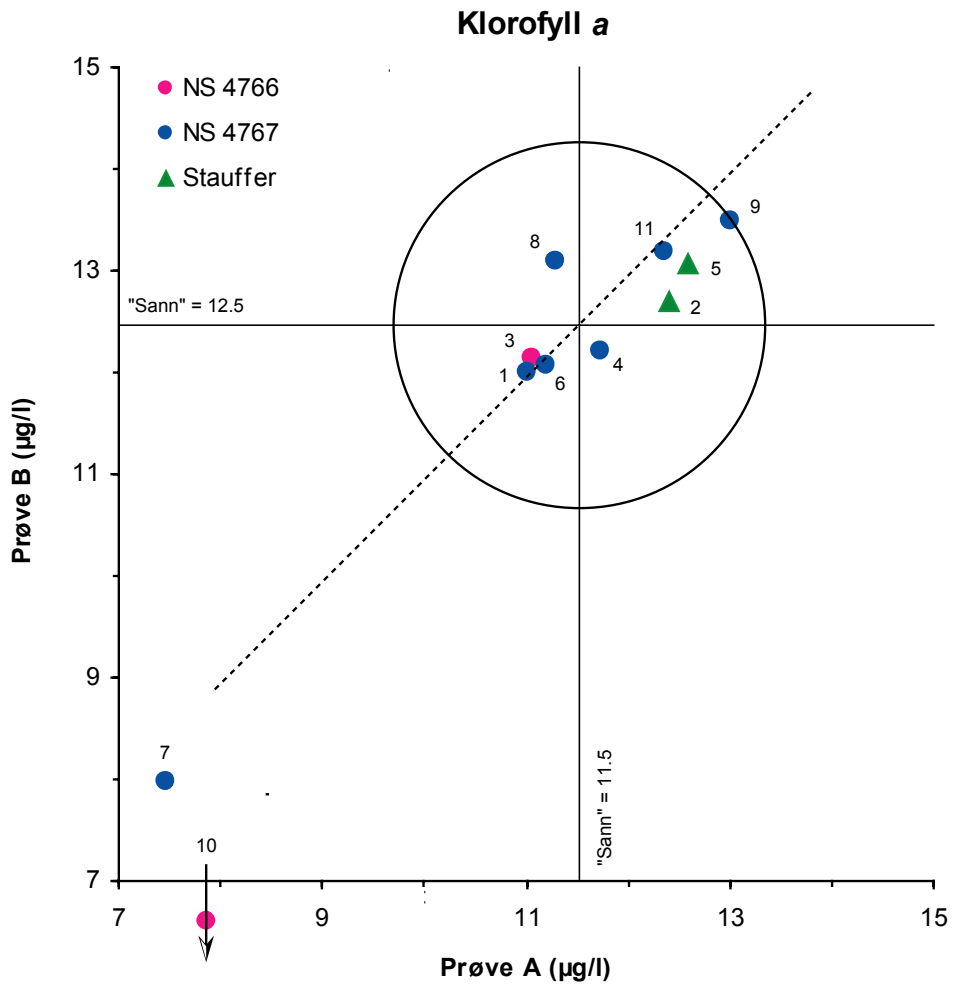
Tabell 1. Deltakernes resultater for de fire prøvene ($\mu\text{g/l}$ klorofyll *a*).

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D	Timer før filtrering	Døgn i frys	Rang. nr.*
1	11	12	2,1	2,3	18	1	3
2	12,4	12,7	2,18	2,07	18	0	5
3	11,06	12,13	1,68	1,71	41	5	6,5
4	11,74	12,21	2,02	2,70	20	0	3,5
5	12,59	13,08	2,30	2,42	24	0	5
6	11,19	12,07	1,96	1,93	18	21	4,5
7	7,47	7,98	1,83	1,77	17	21	9,5
8	11,3	13,1	2,6	2,4	22	17	6
9	13,0	13,5	2,40	2,50	18	0	7
10	7,83 \mathbf{u}	5,45 \mathbf{u}	1,10 \mathbf{u}	1,06 \mathbf{u}	65	17	11
11	12,36	13,18	2,32	2,50	17	0	5

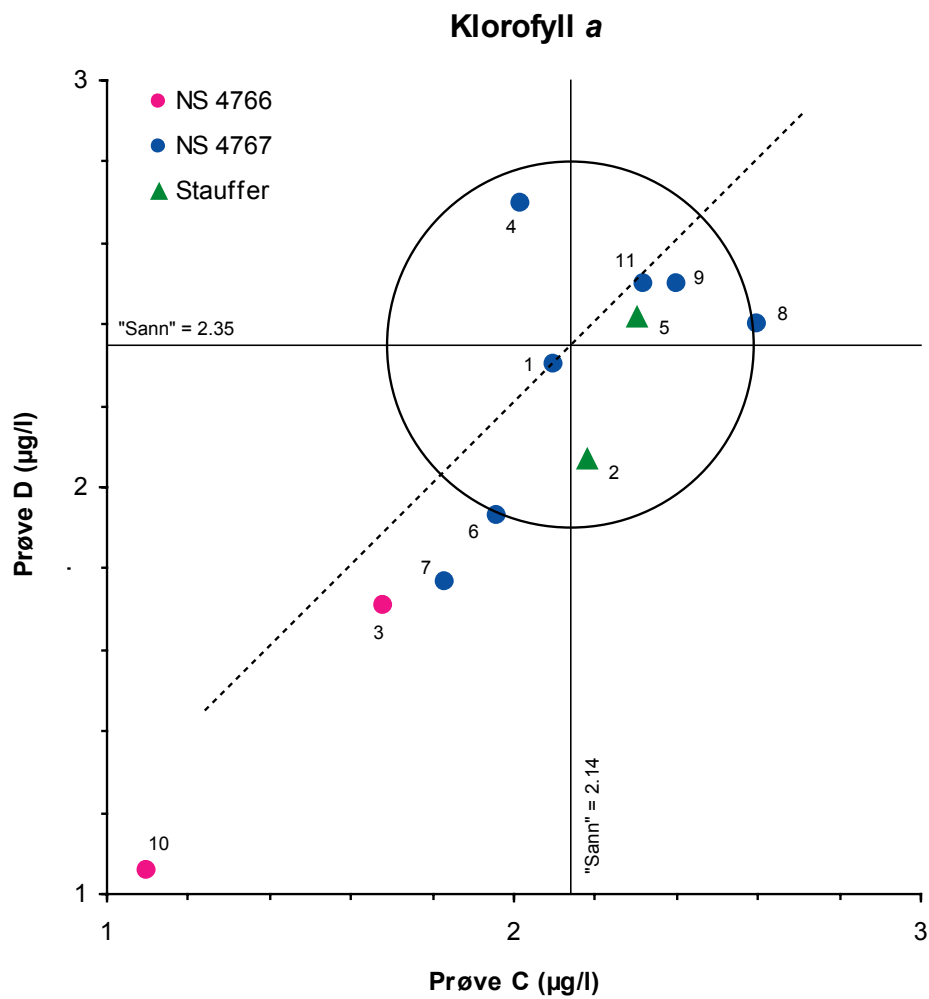
* for hvert prøvepar er laboratoriene rangert etter minst totalfeil, og gjennomsnittet for de to prøveparene er angitt som rangeringsnummer (rang.nr.).

\mathbf{u} = resultater som er utelatt fra statistiske beregninger.

Deltakernes resultater presentert i Youdendiagram er vist i figur 1 og figur 2.



Figur 1. Deltakernes resultater for prøveparet A - B. Akseptgrense, angitt ved en sirkel, er foreslått ved 15%.



Figur 2. Deltakernes resultater for prøveparet C – D. Akseptgrense, angitt ved en sirkel, er foreslått ved 20%.

2.1 Statistikk

Prøve:	A	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	11	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	11,5	
Middelverdi:	11,4	
Medianverdi:	11,5	
Standardavvik:	1,6	
Relativt standardavvik (%):	13,6	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
7	7,47	-35,2
10	7,83u	-32,0
1	11	-4,5
3	11,06	-4,0
6	11,19	-2,9
8	11,3	-1,9
4	11,74	1,9
11	12,36	7,3
2	12,4	7,6
5	12,59	9,3
9	13,0	12,8

Prøve:	B	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	11	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	12,5	
Middelverdi:	12,2	
Medianverdi:	12,5	
Standardavvik:	1,6	
Relativt standardavvik (%):	12,9	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
10	5,45u	-56,2
7	7,98	-35,9
1	12	-3,7
6	12,07	-3,1
3	12,13	-2,6
4	12,21	-2,0
2	12,7	2,0
5	13,08	5,0
8	13,1	5,2
11	13,18	5,8
9	13,5	8,4

Prøve:	C	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	11	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	2,14	
Middelverdi:	2,14	
Medianverdi:	2,14	
Standardavvik:	0,28	
Relativt standardavvik (%):	13,0	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
10	1,10u	-48,6
3	1,68	-21,5
7	1,83	-14,5
6	1,96	-8,4
4	2,02	-5,6
1	2,1	-1,9
2	2,18	1,9
5	2,30	7,5
11	2,32	8,4
9	2,40	12,1
8	2,6	21,5

Prøve:	D	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	11	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	2,35	
Middelverdi:	2,23	
Medianverdi:	2,35	
Standardavvik:	0,34	
Relativt standardavvik (%):	15,2	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
10	1,06u	-54,9
3	1,71	-27,2
7	1,77	-24,7
6	1,93	-17,9
2	2,07	-11,9
1	2,3	-2,1
8	2,4	2,1
5	2,42	3,0
9	2,50	6,4
11	2,50	6,4
4	2,70	14,9

u = resultat som er utelatt fra statistiske beregninger.

3 Vurderinger og konklusjoner

Totalt deltok 11 laboratorier i denne sammenlignende laboratorieprøvingen for analyse av klorofyll a.

For prøvene med høyt klorofyllinnhold (A og B) var 73% av resultatparene tilfredsstillende, når en legger til grunn en akseptgrense på 15%. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde 82% mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. For prøvene med lavt klorofyllinnhold (C og D) var 55% av resultatparene tilfredsstillende (innenfor en akseptgrense på 20%), mens 73% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var om lag som ved forrige SLP i 2000 (Molversmyr & Horve 2000).

Generelt regnes metanol å være et mer effektivt ekstraksjonsmiddel enn aceton, særlig for prøver som inneholder grønnalger og/eller blågrønnalger (Marker *et al.* 1980). Blandingen aceton-DMSO (Stauffer-metoden) regnes også som et godt alternativ for prøver med høyt innhold av slike alger (Klaveness 1984; Stauffer *et al.* 1979). Ett av laboratoriene som benyttet aceton som ekstraksjonsmiddel oppnådde systematisk for lave resultater for alle prøvene. Dette laboratoriet mottok prøvene ett døgn senere enn de andre, og de oppbevarte prøvene i ytterligere ett døgn før filtrering. Det er sannsynlig at dette kan ha forårsaket de avvikende resultatene, og dataene er utelatt fra datamaterialet for statistiske beregninger. Et annet laboratorium som benyttet aceton-metoden oppnådde også systematisk lave resultater for prøveparet C-D (som for øvrig inneholdt relativt stor andel grønnalger). Men også ved dette laboratoriet gikk det betydelig lengre tid enn hos de andre før prøvene ble filtrert, og vesentlig lengre enn det som er angitt i standardmetodene. Disse resultatene kan indikere viktigheten av å begrense oppbevaringstiden for prøver, en faktor som i seg selv vanskeliggjør slike SLP'er for klorofyllbestemmelse. Kontrollmålingene foretatt ved RF på ferske (ikke-lagrede) delprøver viste imidlertid godt samsvar med resultatene fra flertallet av laboratoriene ("sann" verdi), som mottok prøvene og utførte filtrering innen 17 - 24 timer etter prøveutsending. I følge standardmetodene er maksimal lagringstid 24 timer (oppbevart mørkt og kaldt).

Et annet laboratorium, som benyttet metanol-metoden (NS 4767), oppnådde også for lave resultater for begge prøveparene. I følge opplysninger fra dette laboratoriet ble prøvene filtrert umiddelbart etter mottak, og tiden fra prøveforsendelse var den korteste av samtlige. Filtrene ble deretter oppbevart i fryser i 3 uker, som er innenfor grensen på 4 uker angitt i NS-ISO 5667-3. De avvikende resultatene synes derfor å ha andre årsaker enn prøvelagring, for eksempel feil ved instrument/kalibrering. Samtlige laboratorier opplyser imidlertid at spektrofotometeret har vært kalibrert/kontrollert i løpet av det siste halvåret.

En annen mulig feilkilde er utilstrekkelig ekstraksjon, men ingen av laboratoriene angir å ha filtrert urimelig store prøvevolum. Og med unntak av ett laboratorium ble det benyttet egnede kyvettelengder, slik at absorbansen ved spektrofotometermålingene har vært innenfor grensene som er anbefalt i standardmetodene. Ett laboratorium opplyser å ha filtrert et lite volum av prøvene med lavt klorofyllinnhold (C og D), som i kombinasjon med 10 mm kyvettelengder i spektrofotometeret må ha resultert i at avlest absorbans var betydelig lavere enn det som er anbefalt i standardmetoden (NS 4767). Dette laboratoriet hadde relativt stort avvik på en av disse prøvene.

Dataene gir ikke grunnlag for å avdekke eventuelle metodiske forskjeller for de tre ulike analysemetodene som ble benyttet i denne laboratorieprøvingen.

Fem av laboratoriene er akkreditert for analyse av klorofyll a. Med unntak av det ene laboratoriet som mottok prøvene ett døgn senere enn de andre, oppnådde alle disse tilfredsstillende resultater for samtlige enkeltprøver (med avvik < 13% fra antatt "sann" verdi).

Totalt viser denne laboratorieprøvingen at det stort sett oppnås tilfredsstillende resultater med de aktuelle analysemetodene for klorofyll a. En kan imidlertid påpeke viktigheten av at prøver blir håndtert og filtrert i henhold til de retningslinjer som er gitt i standardmetodene, og at anbefalingene om å unngå høye eller lave absorbanser ved spektrofotometermålinger tas i betraktning. Anbefalingen fra forrige SLP om å unngå å samle for mye materiale på filtrene som skal ekstraheres, særlig i tilfeller hvor planteplanktonet har høyt innslag av vanskeligere ekstraherbare algetyper, er fortsatt gyldig.

4 Deltakere

Alcontrol Söderhamn, Sandarne, Sverige

AnalyCen AS, Moss

Buskerud Vann og Avløpssenter AS, Drammen

Labnett Skien, Skien

M-Lab AS, Stavanger

NIVA, Oslo

NMT i Asker og Bærum, Østerås

Næringsmiddelkontrollen i Trondheim, Trondheim

Oslo kommune, Vann- og avløpsetaten, Oslo

Romsdal Næringsmiddeltilsyn, Molde

Vestfold Interkommunale Næringsmiddellaboratorium, Tønsberg

5 Referanser

- Andersen, I-L. & Å. Molversmyr, 2000. Sammenlignende laboratorieprøving. Analyse av klorofyll a. *Rogalandsforskning, rapport RF-2000/050*.
- Klaveness, D., 1984. Klorofyll a. I: Vennerød, K. (red.), *Vassdragsundersøkelser. En metodebok i limnologi*. Universitetsforlaget, s 127-131.
- Marker, A.F.H., E.A. Nusch, H. Rai & B. Remann, 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: Conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14: 91-106.
- Molversmyr, Å. & E. Horve, 2000. Sammenlignende laboratorieprøving 2000. Analyse av klorofyll a. *Rogalandsforskning, rapport RF-2000/285*.
- NS 4766 (1983): Bestemmelse av klorofyll a, spektrofotometrisk måling i acetonestrakt.
- NS 4767 (1983): Bestemmelse av klorofyll a, spektrofotometrisk måling i metanolestrakt.
- NS-EN ISO 5667-3 (1996): Vannkvalitet - Prøvetaking - Del 3: Veiledning i konservering og behandling av prøver
- SS 028146 (1980): Vattenundersökningar - Bestämning av klorofyll i vatten - Extraktion med aceton - Spektrofotometrisk metod.
- Stauffer, R.E., G.F. Lee & D.E. Armstrong, 1979. Estimating chlorophyll extraction biases. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 152-157.
- Youden, W.J. & E.H. Steiner, 1975. Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. *AOAC-publication 75-8867*.