



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

Sammenlignende laboratorieprøving Analyse av klorofyll a

RF-2000/050



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

Vår referanse: 660/679101-06	Forfatter(e): Inger-Lisa Andersen & Åge Molversmyr	Versjonsnr. / dato: Vers. 1 / 09.03.2000
Ant. sider: 15	Faglig kvalitetssikrer: Elin Horve	Gradering: Åpen
ISBN: 82-490-0026-9	Oppdragsgiver(e): RF / Vannringen	Åpen fra (dato):
Forskningsprogram:	Prosjektittel: Drift Vannlab.	

Sammendrag:

Det deltok 13 laboratorier i denne ringtesten, som omfattet analyse av klorofyll a. Tre ulike analysemetoder ble benyttet. Det ble analysert to prøver fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer) med relativt moderat algeinnhold, samt en prøve av en fortynnet algekultur.

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

Betydelige avvik fra antatt "sann" verdi kunne i enkelte tilfeller synes å ha sammenheng med manglende kontroll og kalibrering av spektrofotometeret. For denne analysen må en påpeke viktigheten av å føre kontroll med spektrofotometerets bølgelengder, siden resultater ikke kan sammenholdes med kalibreringsløsninger eller andre prøver med kjent verdi, men oppnås direkte ved å anvende absorpsjonskoeffisienter.

Emne-ord:

Ringtest, Klorofyll a

RF - Rogalandforskning er sertifisert etter et kvalitetssystem basert på NS - EN ISO 9001


for
Prosjektleder
Inger-Lisa Andersen


for RF - Rogalandforskning
Kåre Netland

Forord

I forbindelse med et arbeidsseminar i ”Vannringer” i februar 1997 ble det uttrykt ønske fra flere laboratorier om deltakelse i ringtest på metoden for klorofyll *a* med hensikt på senere akkreditering av metoden.

RF-Rogalandforskning – Miljølaboratoriet tilbød å stå for den praktiske gjennomføring av en sammenlignende laboratorieprøving for klorofyll *a*.

Prøvetaking og utsendelse av prøver ble utført 27-28. mai 1997. 13 laboratorier deltok i prøvingen, som hovedsakelig ble finansiert gjennom en deltakeravgift på kr. 2.500.

Ullandhaug, 09.03.2000

Innhold

SAMMENDRAG	1
1 GJENNOMFØRING	2
1.1 Innhenting av vannprøver og prøveutsendelse	2
1.2 Anvendte metoder	2
1.3 Presentasjon og vurdering av analysedata	3
2 RESULTATER.....	3
2.1 Statistikk.....	6
3 VURDERINGER OG KONKLUSJONER	9
4 DELTAKERE.....	10
5 REFERANSER.....	11

Sammendrag

Det deltok 13 laboratorier i denne ringtesten, som ble arrangert i 1997. Ringtesten omfattet analyse av klorofyll *a*, og det ble benyttet 3 ulike analysemetoder. Det ble analysert 2 prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer) med relativt moderat algeinnhold (prøve A og B), samt en prøve av en fortynnet algekultur (prøve F).

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

Totalt sett var 69% av resultatene tilfredsstillende for prøveparet A-B. For prøve F var det flere resultater som hadde betydelige avvik fra antatt "sann" verdien (og derfor ble underkjent), mens det for de resterende resultatene var betydelig mindre spredning (lavere standardavvik) sammenlignet med prøve A og B. For prøve F var 77% av enkeltresultatene innenfor et avvik på 20% fra antatt "sann" verdi.

Betydelige avvik fra antatt "sann" verdi kunne i enkelte tilfeller synes å ha sammenheng med manglende kontroll og kalibrering av spektrofotometeret. For denne analysen må en påpeke viktigheten av å føre kontroll med spektrofotometerets bølgelengder, siden resultater ikke kan sammenholdes med kalibreringsløsninger eller andre prøver med kjent verdi, men oppnås direkte ved å anvende absorpsjonskoeffisienter.

1 Gjennomføring

1.1 Innhenting av vannprøver og prøveutsendelse

Ringtesten ble basert på 3 vannprøver: 2 prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer) med relativt moderat algeinnhold, samt en prøve av en fortynnet algekultur fra RF-Miljølab.

Prøvene ble hentet inn 27.mai 1997. Ved prøveinnhenting i felt ble vannet filtrert gjennom en nylonduk med maskevidde 150µm, før vannet ble helt på 25 liters kanner. Dette ble gjort for å fjerne dyreplankton, og dermed minske eventuelle forskjeller mellom senere delprøvene som kunne tenkes å være forårsaket av disse.

På laboratoriet ble hver prøve forsiktig blandet for å få homogene prøver, før disse ble overført til plastflasker. Flaskene ble pakket i aluminiumsfolie for å unngå påvirkning fra lys. For å muliggjøre dobbeltbestemmelser, ble innsjøprøvene fylt på 2,5 liters kanner, mens algekulturen (se nedenfor) ble fylt på 1 liters flasker. Alle flaskene/kannene ble fylt helt fulle.

Prøvene ble sendt som bedriftspakker ("ekspress over natten") til de enkelte deltakere, slik at de ville være fremme om morgenen/formiddagen dagen etter.

Følgende prøver ble sendt ut:

Prøve	Beskrivelse
Prøve A	Innsjøprøve med en algebiomasse på 0,32 mg/l (våtvekt), bestående av 40% blågrønnalger (<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> og <i>Gomphosphaeria</i>), 50% Cryptomonader (<i>Cryptomonas</i>) og 10% såkalte µ-alger.
Prøve B	Innsjøprøve med en algebiomasse på 0,51 mg/l (våtvekt), bestående av 30% grønnalger (Chlorococcales) og 60% Cryptomonader (<i>Cryptomonas</i>) og 10% såkalte µ-alger.
Prøve F	Fortynnet laboratoriekultur av grønnalgen <i>Selenastrum capricornutum</i> , med en tetthet på ca. 160000 celler/ml (8 mg/l våtvekt).

1.2 Anvendte metoder

Analysemetode	Antall lab.	Prinsipp
NS 4766	2	Ekstraksjon med 90% aceton, og med oppmaling av filter.
NS 4767	8	Ekstraksjon med 100% metanol, uten oppmaling av filter.
Stauffer et. al. (1979)	3	Ekstraksjon med aceton og DMSO i forhold 1:1, uten oppmaling av filter.

Ett laboratorium benyttet GF/C filter på Büchnertrakt til filtrering av prøver. Øvrige laboratorier benyttet filteroppsats med GF/C filter med diameter fra 2,5 til 5,5 cm.

Laboratoriene startet filtrering relativt umiddelbart etter prøvemottak. De fleste av laboratorier oppbevarte filtrene i fryser (i inntil 5-6 uker) før videre analyse (ekstraksjon). Samtlige deltakere utførte dobbeltanalyse på prøvene.

1.3 Presentasjon og vurdering av analysedata

Analyseresultater er behandlet etter følgende regler:

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

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

Resultatene er presentert i tabellform (tabellene 1 - 4), som angir samtlige innsendte resultater, statistiske beregninger, opplysninger om hvilke metoder som er benyttet, eventuell lagringstid for filtre i fryser, og eventuelle merknader angitt av laboratoriet.

For prøve A og B, som er to innsjøprøver med klorofyllinnhold i samme konsentrasjonsnivå, er resultatene også fremstilt i et såkalt Youdens diagram (figur 1). Middelvei av replikate målinger fra hvert laboratorium (data som ikke er forkastet) er plottet i diagrammet. Denne formen for datafremstilling gjør det mulig å skjelne mellom systematiske og tilfeldige feil. I praksis sprer punktene seg oftest langs 45°-linjen, som viser at en oftest gjør samme systematiske feil ved analyse av to nærstående prøver.

Grensen for akseptabelt resultat angis som en sirkel med sentrum i skjæringspunktet mellom linjene som markerer "sann" verdi. For målingene av prøveparet A-B er det satt en akseptgrense på 20%.

For prøve F er resultatene bare presentert i tabellform (tabell 1 og 4). Her er det også satt en akseptgrense på 20% ved vurdering av resultatene.

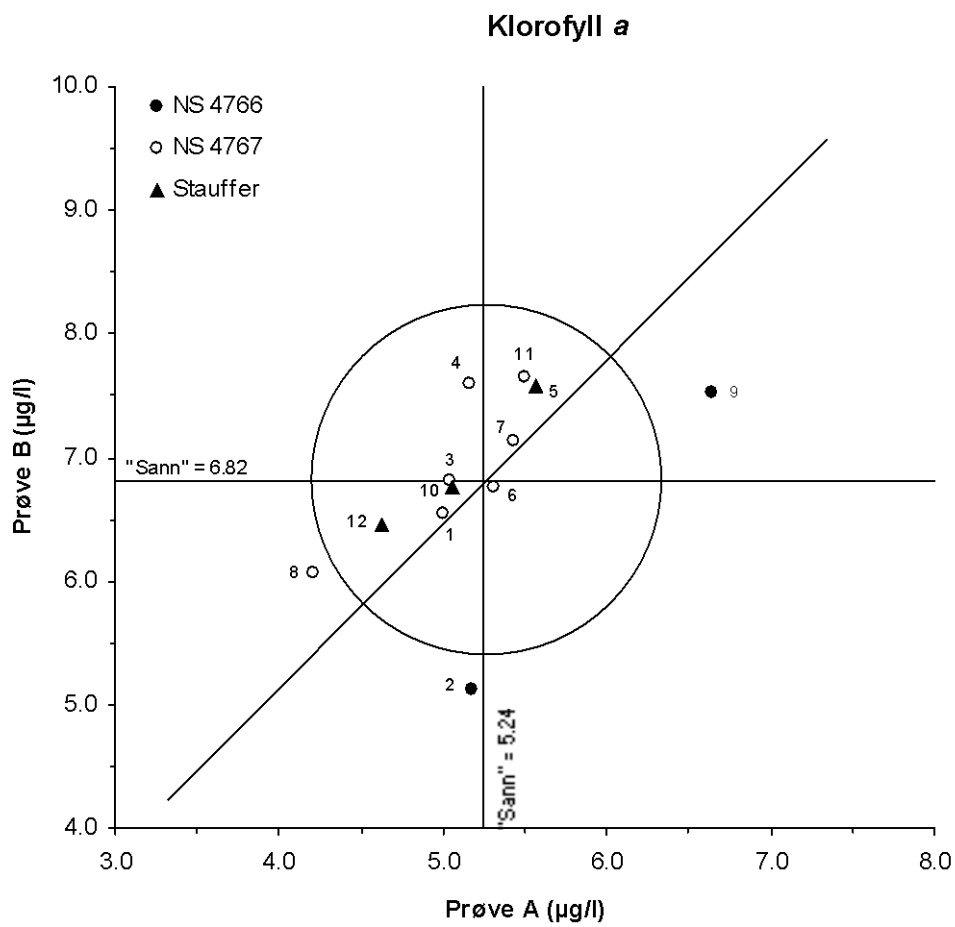
2 Resultater

Analyseresultatene fra de deltakende laboratoriene er vist i tabell 1. Resultatene fra ett laboratorium er utelatt for alle de tre prøvene. Det er opplyst at prøvene her ved en feil ble plassert på et lagerrom i flere dager etter ankomst, før filtrering ble foretatt.

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

Lab. nr.	Prøve A			Prøve B			Prøve F			Metode	Døgn i frys	Merknader
	Res. 1	Res. 2	Middel	Res. 1	Res. 2	Middel	Res. 1	Res. 2	Middel			
1	5.00	5.00	5.00	6.50	6.60	6.55	113.8	115.6	114.7	NS 4767	27	
2	5.15	5.21	5.18	5.33	4.90	5.12	38.0u	47.0u	42.5u	NS 4766	41	Eldre spektrofotometer benyttet.
3	4.82	5.27	5.05	6.82	6.82	6.82	113.4	110.9	112.2	NS 4767	-	
4	4.49	5.85	5.17	7.68	7.51	7.60	120.1	120.0	120.1	NS 4767	2	
5	5.53	5.60	5.57	7.45	7.72	7.59	118.8	119.9	119.4	Stauffer	-	
6	5.27	5.35	5.31	6.81	6.72	6.77	120.0	115.0	117.5	NS 4767	13	
7	5.55	5.31	5.43	7.18	7.10	7.14	112.1	117.5	114.8	NS 4767	8	
8	4.36	4.06	4.21	6.18	5.94	6.06	86.9	73.0u	80.0u	NS 4767	-	
9	6.59	6.69	6.64	7.87	7.19	7.53	121.0	124.0	122.5	NS 4766	2	En eller flere prøver har lekket.
10	5.10	5.00	5.05	6.64	6.88	6.76	111.5	108.8	110.2	Stauffer	19	Pakke ødelagt under transport. Lekkasje.
11	5.50	5.50	5.50	7.50	7.80	7.65	116.0	114.0	115.0	NS 4767	5	
12	4.68	4.58	4.63	6.49	6.41	6.45	110.7	110.9	110.8	Stauffer	?	
13	2.98u	2.80u	2.89u	2.42u	2.88u	2.65u	54.0u	54.3u	54.2u	NS 4767	28	Prøver glemt på lager i 6 dager før filtr.

u = resultater som er utelatt fra statistiske beregninger



Figur 1. Deltakernes resultater for prøveparet A-B. Middelerdi av replikate målinger fra hvert laboratorium (data som ikke er forkastet) er plottet i diagrammet. Akseptgrense, angitt ved en sirkel, er satt til 20%.

2.1 Statistikk

Prøve: A

Metoder: alle

Enhet: $\mu\text{g/l}$ klorofyll-a

Antall deltakere	13	Standardavvik, middelverdier	0.58
Antall utelatte resultater	2	Relativt standardavvik, middelverdier	11.2 %
Antatt "sann" verdi	5.24		
Middelverdi	5.23	Standardavvik, alle resultater	0.61
Median, middelverdier	5.18	Relativt standardavvik, alle resultater	11.7 %
Median, alle resultater	5.24		

Lab. nr.	Res. 1	Avvik fra "sann" (%)	Res. 2	Avvik fra "sann" (%)	Middel	Avvik fra "sann" (%)
13	2.98 <u>u</u>	-43.1	2.80 <u>u</u>	-46.6	2.89 <u>u</u>	-44.8
8	4.36	-16.8	4.06	-22.5	4.21	-19.7
12	4.68	-10.7	4.58	-12.6	4.63	-11.6
1	5.00	-4.6	5.00	-4.6	5.00	-4.6
3	4.82	-8.1	5.27	0.6	5.05	-3.7
10	5.10	-2.7	5.00	-4.6	5.05	-3.6
4	4.49	-14.3	5.85	11.6	5.17	-1.3
2	5.15	-1.7	5.21	-0.6	5.18	-1.1
6	5.27	0.6	5.35	2.1	5.31	1.3
7	5.55	5.9	5.31	1.3	5.43	3.6
11	5.50	5.0	5.50	5.0	5.50	5.0
5	5.53	5.5	5.60	6.9	5.57	6.2
9	6.59	25.8	6.69	27.7	6.64	26.7

u = resultater som er utelatt fra statistiske beregninger

Prøve: B

Metoder: alle

Enhet: µg/l klorofyll-a

Antall deltakere	13	Standardavvik, middelverdier	0.75
Antall utelatte resultater	2	Relativt standardavvik, middelverdier	11.0 %
Antatt "sann" verdi	6.82		
Middelverdi	6.83	Standardavvik, alle resultater	0.75
Median, middelverdier	6.79	Relativt standardavvik, alle resultater	10.9 %
Median, alle resultater	6.82		

Lab. nr.	Res. 1	Avvik fra "sann" (%)	Res. 2	Avvik fra "sann" (%)	Middel	Avvik fra "sann" (%)
13	2.42 <u>u</u>	-64.5	2.88 <u>u</u>	-57.8	2.65 <u>u</u>	-61.1
2	5.33	-21.8	4.90	-28.1	5.12	-25.0
8	6.18	-9.4	5.94	-12.9	6.06	-11.1
12	6.49	-4.8	6.41	-6.0	6.45	-5.4
1	6.50	-4.7	6.60	-3.2	6.55	-3.9
10	6.64	-2.6	6.88	0.9	6.76	-0.9
6	6.81	-0.1	6.72	-1.4	6.77	-0.8
3	6.82	0.0	6.82	0.0	6.82	0.0
7	7.18	5.3	7.10	4.1	7.14	4.7
9	7.87	15.4	7.19	5.5	7.53	10.4
5	7.45	9.3	7.72	13.2	7.59	11.2
4	7.68	12.6	7.51	10.1	7.60	11.4
11	7.50	10.0	7.80	14.4	7.65	12.2

u = resultater som er utelatt fra statistiske beregninger

Prøve: F

Metoder: alle

Enhet: µg/l klorofyll-a

Antall deltakere	13	Standardavvik, middelverdier	4.10
Antall utelatte resultater	5	Relativt standardavvik, middelverdier	3.6 %
Antatt "sann" verdi	115.0		
Middelverdi	114.3	Standardavvik, alle resultater	7.53
Median, middelverdier	114.9	Relativt standardavvik, alle resultater	6.6 %
Median, alle resultater	115.0		

Lab. nr.	Res. 1	Avvik fra "sann" (%)	Res. 2	Avvik fra "sann" (%)	Middel	Avvik fra "sann" (%)
2	38.0 <u>u</u>	-67.0	47.0 <u>u</u>	-59.1	42.5 <u>u</u>	-63.0
13	54.0 <u>u</u>	-53.0	54.3 <u>u</u>	-52.8	54.2 <u>u</u>	-52.9
8	86.9	-24.4	73.0 <u>u</u>	-36.5	80.0 <u>u</u>	-30.5
10	111.5	-3.0	108.8	-5.4	110.2	-4.2
12	110.7	-3.7	110.9	-3.6	110.8	-3.7
3	113.4	-1.4	110.9	-3.6	112.2	-2.5
1	113.8	-1.0	115.6	0.5	114.7	-0.3
7	112.1	-2.5	117.5	2.2	114.8	-0.2
11	116.0	0.9	114.0	-0.9	115.0	0.0
6	120.0	4.3	115.0	0.0	117.5	2.2
5	118.8	3.3	119.9	4.3	119.4	3.8
4	120.1	4.4	120.0	4.3	120.1	4.4
9	121.0	5.2	124.0	7.8	122.5	6.5

u = resultater som er utelatt fra statistiske beregninger

3 Vurderinger og konklusjoner

I denne ringtesten, som omfattet analyse av klorofyll *a*, deltok 13 laboratorier.

For prøveparet A-B var 69% av resultatene tilfredsstillende (middelverdi av replikate målinger fra hvert laboratorium), når en legger til grunn en akseptgrense på 20%. Ser en disse prøvene hver for seg, hadde 83% av enkeltresultatene mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi.

For prøve F var 77% av enkeltresultatene innenfor et avvik på 20% fra antatt "sann" verdi. Her var det imidlertid flere resultater enn for prøve A og B som hadde betydelige avvik fra denne "sanne" verdien, og derfor ble utelatt fra statistiske beregninger. For resultater som ikke ble utelatt var det betydelig mindre spredning (lavere standardavvik) for prøve F enn for prøve A og B.

Det ble benyttet 3 ulike analysemetoder for klorofyll *a* i denne ringtesten, men dataene gir ikke grunnlag for å påpeke eventuelle metodiske forskjeller. Begge laboratoriene som benyttet NS 4766 falt imidlertid utenfor $\pm 20\%$ grensen for prøveparet A-B (figur 1), og det ene av disse ble også utelatt fra beregningene for prøve F (oppnådde mindre enn halvparten av antatt "sann" verdi"; tabell 1). Dette laboratoriet opplyste imidlertid å ha benyttet et eldre spektrofotometer, for "å prøve om dette er brukelig" (instrumentet er ikke angitt å være kontrollert/kalibrert). Avviket her skyldes derfor antakelig manglende kontroll og kalibrering av instrumentet. En kan også bemerke at dette laboratoriet hadde den lengste oppbevaringstid av filtre i fryser, før ekstraksjon ble startet (om lag 6 uker). Det andre laboratoriet som benyttet NS 4766 oppnådde gjennomgående noe høyere resultater enn antatt "sann" verdi, og var også de som fikk høyest resultat for prøve F.

Med unntak for 4 laboratorier, blir det opplyst at spektrofotometrenes bølgelengder blir kontrollert. Dette gjøres imidlertid stort sett ved årlig service, og bare 3 laboratorier angir at de selv kontrollerer spektrofotometeret mot kjente bølgelengder (hydrogenlinjen fra D₂-lampe og/eller kalibreringsfiltre). I tillegg til laboratoriet nevnt i forrige avsnitt, kan det bemerkes at et laboratorium hvor spektrofotometeret heller ikke er angitt å være kontrollert/kalibrert oppnådde betydelig lavere resultater enn antatt "sann" verdi for prøveparet A-B (utenfor akseptgrense), og fikk underkjent resultatet for prøve F (31% lavere enn antatt "sann" verdi).

Totalt synes denne ringtesten å vise at det stort sett oppnås tilfredsstillende resultater med de aktuelle analysemetodene for klorofyll *a*. En vil imidlertid påpeke viktigheten av å føre kontroll med spektrofotometerets bølgelengder for denne analysen, hvor resultater oppnås direkte ved å anvende absorpsjonskoeffisienter uten å være samholdt med kalibreringsløsninger eller andre prøver med kjent verdi.

4 Deltakere

AS Østfoldlaboratoriet

Avløpssambandet Nordre Øyeren, ANØ

Buskerud vann- og avløpssenter

KM-Lab A/S avd. Grimstad

Miljølaboratoriet i Telemark

NIVA

Næringsmiddeltilsynet i Trondheim

Næringsmiddeltilsynet i Tønsberg

Næringsmiddeltilsynet i Asker og Bærum

Næringsmiddeltilsynet i Midt-Rogaland

Næringsmiddeltilsynet i Romsdal

Oslo vann- og avløpsetat

RF-Rogalandforskning, Miljølaboratoriet

5 Referanser

NS 4766 (1983): Bestemmelse av klorofyll a, spektrofotometrisk måling i acetonestrakt.

NS 4767 (1983): Bestemmelse av klorofyll a, spektrofotometrisk måling i metanolestrakt.

Stauffer, R.E., G.F. Lee & D.E. Armstrong, 1979. Estimating chlorophyll extraction biases. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 152-157.