



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

## **Sammenlignende laboratorieprøving 2000 Analyse av klorofyll a**

RF-2000/285



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

Vår referanse: <b>7806502-15</b>	Forfatter(e): <b>Åge Molversmyr &amp; Elin Horve</b>	Versjonsnr. / dato: <b>Vers. 1 / 08.12.2000</b>
Ant. sider: <b>14</b>	Faglig kvalitetssikrer: <b>Inger-Lisa Andersen</b>	Gradering: <b>Åpen</b>
ISBN: <b>82-490-0072-2</b>	Oppdragsgiver(e): <b>RF / Vannringen</b>	Åpen fra (dato):
Forskningsprogram:	Prosjekttittel:	

Sammendrag/konklusjoner:

Det deltok 12 laboratorier i denne ringtesten som omfattet analyse av klorofyll *a*. Tre ulike analysemetoder ble benyttet. Det ble analysert fire prøver fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer), to med høyt algeinnhold og to med moderat /lavt algeinnhold.

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 var 75% av resultatene tilfredsstillende, når en legger til grunn en akseptgrense på 20%. For prøveparet med moderat /lavt klorofyllinnhold var 67% av resultatene tilfredsstillende. Andelen av tilfredsstillende resultater var litt lavere enn det som ble funnet ved forrige ringtest i 1997.

Betydelige avvik fra antatt "sann" verdi kunne synes å ha sammenheng med store filtreringsvolum, eller også med manglende kontroll og kalibrering av spektrofotometeret. Dataene indikerer at en bør unngå å samle for mye materiale på filterne som skal ekstraheres. For denne analysen må en også 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

Prosjektleder  
Elin Horve

for RF - Rogalandforskning  
Inger-Lisa Andersen

## **Forord**

*I forbindelse med et arbeidsseminar i "Vannringen" i mars 2000 ble det uttrykt ønske fra flere laboratorier om en ny ringtest på metoden for klorofyll a.*

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

*Prøvetaking og utsendelse av prøver ble utført 29. august 2000. 12 laboratorier deltok i prøvingen, som hovedsakelig ble finansiert gjennom en deltakeravgift på kr. 3000.*

*Stavanger, 8. desember 2000.*

## **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 analysedata .....	3
2 RESULTATER.....	4
2.1 Statistikk.....	6
3 VURDERINGER OG KONKLUSJONER .....	8
4 DELTAKERE.....	9
5 REFERANSER.....	10

## Sammendrag

Det deltok 12 laboratorier i denne ringtesten som omfattet analyse av klorofyll *a*, og det ble benyttet 3 ulike analysemetoder. Det ble analysert 4 prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer), to med relativt høyt algeinnhold (prøve A og B) og to med moderat/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 75% av resultatene tilfredsstillende, når en legger til grunn en akseptgrense på 20%. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde 83% mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. For prøveparet med moderat/lavt klorofyllinnhold (C og D) var 67% av resultatene tilfredsstillende, mens 71% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var litt lavere enn det som ble funnet ved forrige ringtest i 1997.

Fem av laboratoriene er akkreditert for analyse av klorofyll *a*, og alle disse oppnådde tilfredsstillende resultater (med avvik < 12% fra antatt "sann" verdi for samtlige prøver).

Betydelige avvik fra antatt "sann" verdi kunne synes å ha sammenheng med store filtreringsvolum, eller også med manglende kontroll og kalibrering av spektrofotometeret. Dataene indikerer at en bør unngå å samle for mye materiale på filtrene som skal ekstraheres. For denne analysen må en også 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 prøver hentet fra naturlige ferskvannskilder (innsjøer): 2 med relativt høyt algeinnhold (prøve A og B) og 2 med moderat /lavt algeinnhold (prøve C og D).

Prøvene ble hentet inn 29. august 2000. 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, og dermed minske eventuelle forskjeller mellom senere delprøvene som kunne tenkes å forårsakes av disse.

På laboratoriet ble hver prøve forsiktig blandet for å få homogene prøver, før disse ble overført til 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.

Prøvene ble sendt som bedriftspakker ("ekspress over natten") til de enkelte deltakerne, slik at de ville være fremme om morgenen /formiddagen dagen etter. To laboratorier rapporterte at emballasjen var blitt delvis ødelagt i postgangen, mens ett laboratorium rapporterte en liten lekkasje på en eller flere av flaskene i pakken. Ingen av disse forholdene syntes å ha påvirket analyseresultatene.

Følgende prøver ble sendt ut:

Prøve	Beskrivelse
Prøve A	Innsjøprøve med en algebiomasse på 6,62 mg/l (våtvekt), bestående av 91% blågrønnalger ( <i>Gomphosphaeria</i> , <i>Aphanizomenon</i> og <i>Anabaena</i> ), 5% kiselalger ( <i>Melosira</i> ), 2% fureflagellater ( <i>Ceratium</i> ) og 2% andre alger.
Prøve B	Innsjøprøve med en algebiomasse på 4,91 mg/l (våtvekt), bestående av 84% blågrønnalger ( <i>Gomphosphaeria</i> , <i>Anabaena</i> og <i>Aphanizomenon</i> ), 12% fureflagellater ( <i>Ceratium</i> ), 1% kiselalger ( <i>Melosira</i> ) og 3% andre alger.
Prøve C	Innsjøprøve med en algebiomasse på 0,33 mg/l (våtvekt), bestående av 73% gullalger ( <i>Dinobryon</i> ), 9% kiselalger ( <i>Fragilaria</i> ), 3% fureflagellater ( <i>Ceratium</i> ) og 15% andre alger (µ-alger).
Prøve D	Innsjøprøve med en algebiomasse på 0,37 mg/l (våtvekt), bestående av 65% gullalger ( <i>Dinobryon</i> ), 3% kiselalger ( <i>Fragilaria</i> ), 5% blågrønnalger ( <i>Anabaena</i> ) og 27% andre alger (µ-alger).

## 1.2 Anvendte metoder

Analysemetode	Antall lab.	Prinsipp
NS 4766	1	Ekstraksjon med 90% aceton, og med oppmaling av filter.
NS 4767	9	Ekstraksjon med 100% metanol, uten oppmaling av filter.
Stauffer <i>et al.</i> (1979)	2	Ekstraksjon med aceton og DMSO i forhold 1:1, uten oppmaling av filter.

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

Laboratoriene startet filtrering relativt umiddelbart etter prøvemottak (ett laboratorium oppbevarte prøvene til neste dag før filtrering). Fire laboratorier startet ekstraksjon umiddelbart, mens de fleste av laboratoriene oppbevarte filtrene i fryser (i inntil 5 uker) 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 middelerdi ( $\bar{x}$ ) og standardavvik ( $s$ ). Resultater som ligger utenfor  $\bar{x} \pm 3s$  forkastes før endelig beregning av middelerdi, standardavvik, og andre statistiske parametre.

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

Resultatene er presentert i tabell 1, som angir samtlige innsendte resultater, opplysninger om hvilke metoder som er benyttet, eventuell lagringstid for filtre i fryser, og rangeringsnummer i ringtesten (se nedenfor). Resultater fra statistiske beregninger er vist i tabellform under avsnitt 2.1.

Resultatene for prøvepar i samme konsentrasjonsnivå er også fremstilt i såkalte Youdens diagram (figur 1 og 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:

$$\text{Error!} \quad \text{Bookmark} \quad \text{not} \\ \text{defined. Totalfeil} = \sqrt{(Sann_1 - Res_1)^2 + (Sann_2 - Res_2)^2}$$

Grensen for akseptabelt resultat angis som en sirkel med sentrum i skjæringspunktet mellom linjene for "sann" verdi. Det er satt en akseptgrense på 20%.

Deltakernes resultater i ringtesten er i tillegg rangert etter minst totalfeil for hvert prøvepar, og laboratorienes rangeringsnummer (gjennomsnitt for de to prøveparene) er vist i tabell 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-Miljølab. Resultater fra disse målingene viste ingen signifikante forskjeller mellom første og siste prøveuttak.

Analyseresultatene fra de deltakende laboratoriene er vist i tabell 1.

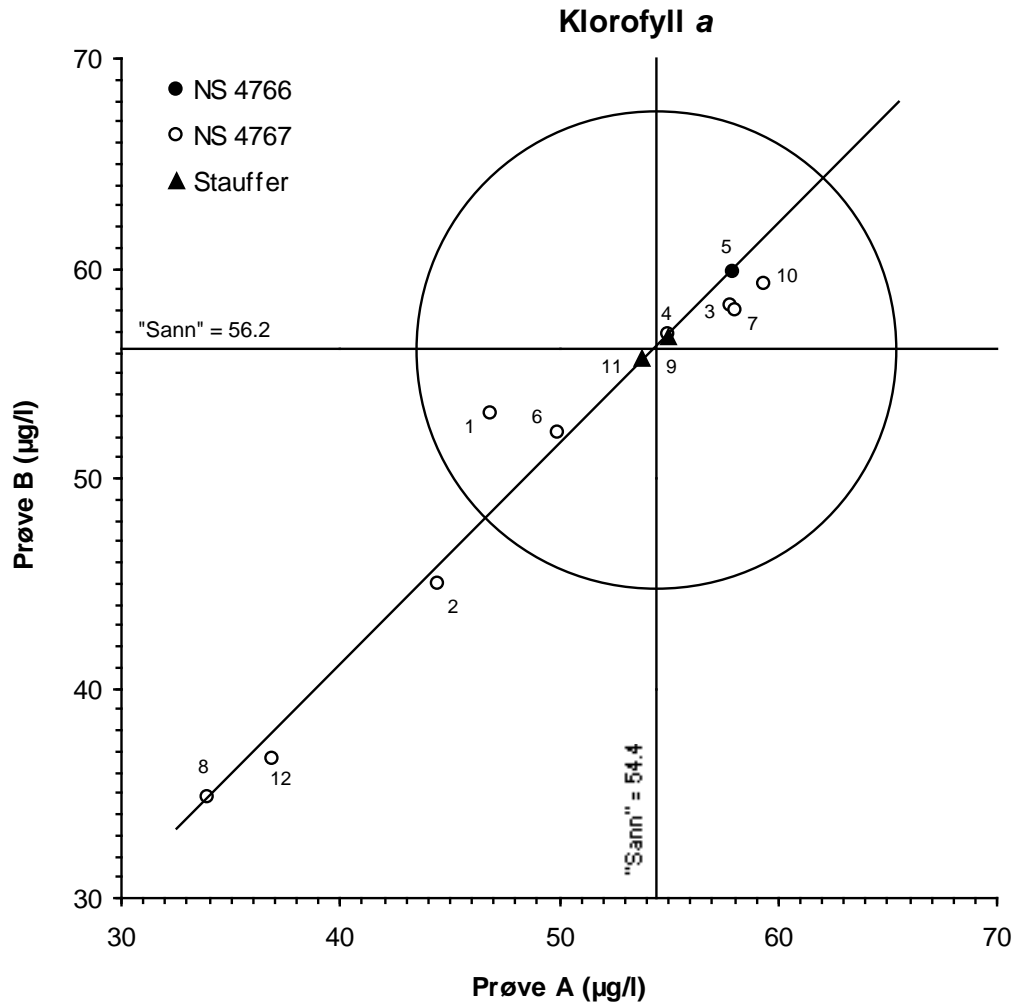
Tabell 1. Deltakernes resultater for de fire prøvene ( $\mu\text{g/l}$  klorofyll *a*).

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D	Metode	Døgn i frys	Rang. nr.*
1	46,88	53,11	4,25	4,43	NS 4767	7	6
2	44,5	45,0	3,38	3,49	NS 4767	0	10
3	57,81	58,18	5,36	5,45	NS 4767	0 (1?)	6,5
4	55,01	56,85	4,58	5,19	NS 4767	27	4,5
5	57,98	59,78	8,09 $\mathbf{u}$	5,62	NS 4766	5	9
6	49,9	52,2	4,70	4,57	NS 4767	34	6
7	58,0	58,0	3,78	4,00	NS 4767	0	6,5
8	33,9	34,8	2,89	2,69	NS 4767	19	11,5
9	55,0	56,7	4,30	4,45	Stauffer	20	1,5
10	59,4	59,2	4,92	4,73	NS 4767	0	6
11	53,8	55,7	4,4	4,8	Stauffer	14	1
12	36,88	36,65	5,25	4,88	NS 4767	0	9

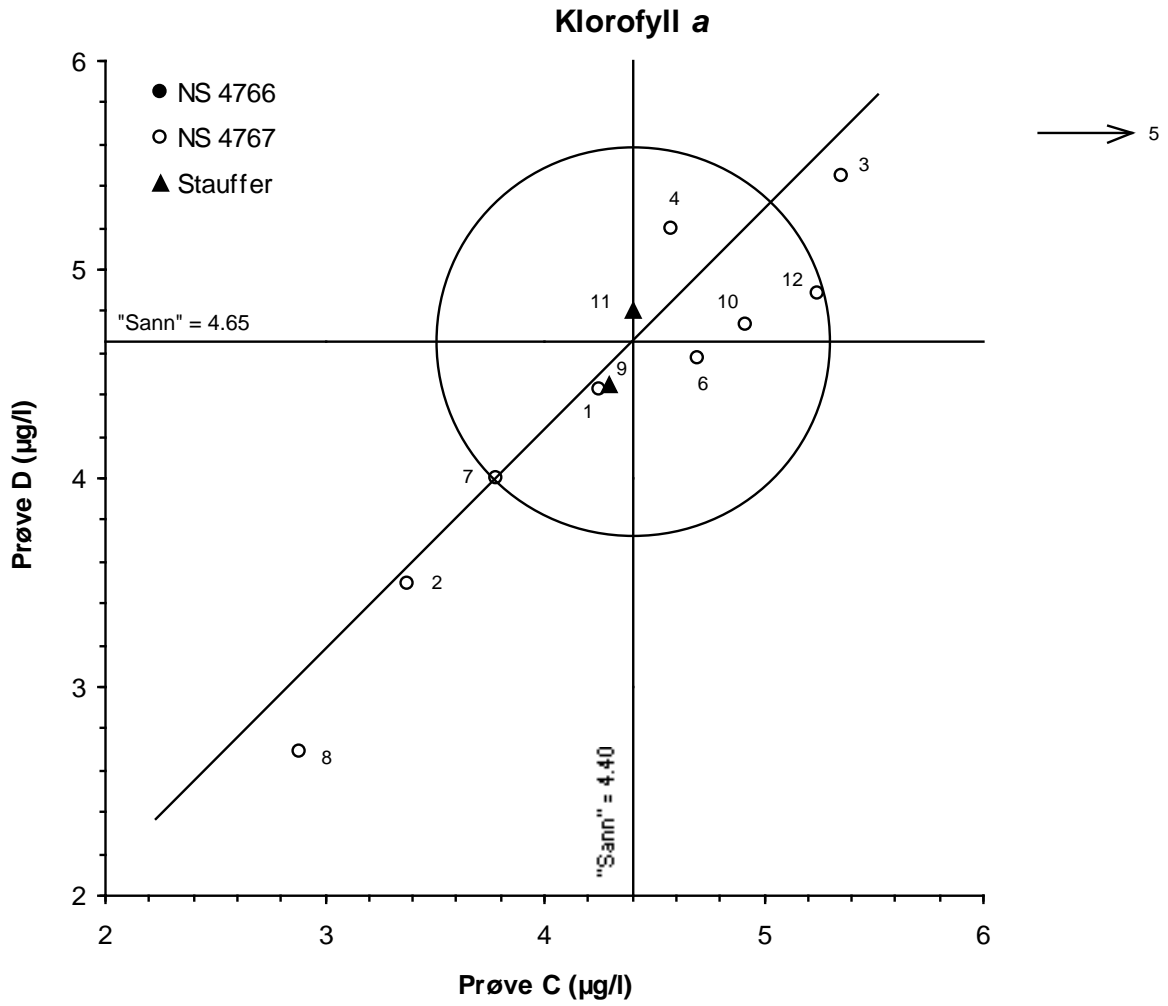
\* for hvert prøvepar er laboratoriene rangert etter minst totalfeil, og rangeringsnummer (rang.nr.) er angitt som gjennomsnittet for de to prøveparene.

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





Figur 1. Deltakernes resultater for prøveparet A – B. Akseptgrense, angitt ved en sirkel, er satt til 20%.



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

**2.1 Statistikk**

Prøve:	<b>A</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	12	
Antall utelatte resultater:	0	
Antatt "sann" verdi:	54,4	
Middelverdi:	50,8	
Medianverdi:	54,4	
Standardavvik:	8,6	
Relativt standardavvik (%):	16,9	
Lab. Nr.	Resultat	% avvik "sann"
8	33,9	-37,7
12	36,88	-32,2
2	44,5	-18,2
1	46,88	-13,8
6	49,9	-8,3
11	53,8	-1,1
9	55,0	1,1
4	55,01	1,1
3	57,81	6,3
5	57,98	6,6
7	58,0	6,6
10	59,4	9,2

Prøve:	<b>B</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	12	
Antall utelatte resultater:	0	
Antatt "sann" verdi:	56,2	
Middelverdi:	52,2	
Medianverdi:	56,2	
Standardavvik:	8,7	
Relativt standardavvik (%):	16,6	
Lab. Nr.	Resultat	% avvik "sann"
8	34,8	-38,1
12	36,65	-34,8
2	45,0	-19,9
6	52,2	-7,1
1	53,11	-5,5
11	55,7	-0,9
9	56,7	0,9
4	56,85	1,2
7	58,0	3,2
3	58,18	3,5
10	59,2	5,3
5	59,78	6,4

Prøve:	<b>C</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	12	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	4,40	
Middelverdi:	4,35	
Medianverdi:	4,40	
Standardavvik:	0,76	
Relativt standardavvik (%):	17,4	
Lab. Nr.	Resultat	% avvik "sann"
8	2,89	-34,3
2	3,38	-23,2
7	3,78	-14,1
1	4,25	-3,4
9	4,30	-2,3
11	4,4	0,0
4	4,58	4,1
6	4,70	6,8
10	4,92	11,8
12	5,25	19,3
3	5,36	21,8
5	8,09 <u>u</u>	83,9

Prøve:	<b>D</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	12	
Antall utelatte resultater:	0	
Antatt "sann" verdi:	4,65	
Middelverdi:	4,53	
Medianverdi:	4,65	
Standardavvik:	0,82	
Relativt standardavvik (%):	18,2	
Lab. Nr.	Resultat	% avvik "sann"
8	2,69	-42,2
2	3,49	-24,9
7	4,00	-14,0
1	4,43	-4,7
9	4,45	-4,3
6	4,57	-1,7
10	4,73	1,7
11	4,8	3,2
12	4,88	4,9
4	5,19	11,6
3	5,45	17,2
5	5,62	20,9

**u** = resultat som er utelatt fra statistiske beregninger.

### 3 Vurderinger og konklusjoner

Totalt 12 laboratorier deltok i denne ringtesten for analyse av klorofyll *a*.

For prøveparet med høyt klorofyllinnhold (A og B) var 75% av resultatene tilfredsstillende, når en legger til grunn en akseptgrense på 20%. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde 83% mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. For prøveparet med moderat /lavt klorofyllinnhold (C og D) var 67% av resultatene tilfredsstillende (innenfor en akseptgrense på 20%), mens 71% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 20% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var litt lavere enn det som ble funnet ved forrige ringtest i 1997 (Andersen & Molversmyr 2000).

I prøvene med høyt algeinnhold (prøve A og B) var planteplanktonet dominert av blågrønnalger, som regnes å være vanskeligere ekstraherbare enn mange andre algetyper. Både metanol (NS 4767) og aceton-DMSO (Stauffer-metoden) regnes å være egnede ekstraksjonsmidler for prøver med høyt innhold av slike alger (Klaveness 1984; Stauffer *et al.* 1979). Laboratoriene som benyttet den såkalte Stauffer-metoden (aceton-DMSO) oppnådde begge meget tilfredsstillende resultater. De fleste andre laboratoriene benyttet NS 4767 (metanol), og tre av disse oppnådde systematisk for lave resultater for prøveparet A - B. To av disse oppnådde for øvrig også systematisk for lave resultater for prøvene med lavt algeinnhold (prøve C og D). Felles for disse laboratoriene var det de benyttet relativt store volum ved filtrering av prøvene. Det er derfor tenkelig at dette kan ha medført at mengden materiale på filtrene var for stor til at ekstraksjonen ble fullstendig, særlig for prøve A og B hvor planteplanktonet var dominert av blågrønnalger. Ett av disse laboratoriene benyttet i tillegg 5 cm kyvetter i spektrofotometeret, noe som betyr at den avleste absorbansen for prøve A og B må ha vært betydelig høyere enn det som er anbefalt som øvre grense i standardmetoden (NS 4767). Laboratoriet som benyttet NS 4766 (ekstraksjon i aceton) oppnådde for øvrig også tilfredsstillende resultater for prøveparet A - B.

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

Fire av laboratoriene ga ingen opplysninger om vedlikehold av spektrofotometeret og kalibrering av bølgelengde. Det er uklart om de aktuelle laboratoriene ikke fører kontroll med dette, men i hvert fall ett av de må antas å ha tilfredsstillende rutiner siden de er akkreditert for klorofyllmetoden. Fire av de fem laboratoriene som har ett eller flere resultater som faller utenfor akseptgrensen på 20%, har ikke gitt noen opplysning om kalibrering av spektrofotometeret eller at det er over 2 år siden dette ble utført. Manglende instrumentkalibrering kan derfor tenkes å ha medvirket til avvikende resultater for disse laboratoriene.

Fem av laboratoriene er akkreditert for analyse av klorofyll *a*, og alle disse oppnådde tilfredsstillende resultater (med avvik < 12% fra antatt "sann" verdi for samtlige prøver).

Totalt viser denne ringtesten at det stort sett oppnås tilfredsstillende resultater med de aktuelle analysemetodene for klorofyll *a*. Dataene indikerer imidlertid at en bør unngå å samle for mye materiale på filtrene som skal ekstraheres, særlig i tilfeller hvor planteplanktonet har høyt innslag av vanskeligere ekstraherbare algetyper. En vil også 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**

AnalyCen

ANØ Miljøkompetanse

ChemLab Services AS

Miljølaboratoriet i Telemark

NIVA

Næringsmiddeltilsynet i Asker og Bærum

Næringsmiddeltilsynet i Midt-Rogaland

Næringsmiddeltilsynet i Romsdal

Næringsmiddeltilsynet i Trondheim

Næringsmiddeltilsynet i Tønsberg

Oslo vann- og avløpsetat

RF-Rogalandsforskning, Miljølaboratoriet

## 5 Referanser

- Andersen, I-L. & Å. Mølversmyr, 2000. Sammenlignende laboratorieprøving. Analyse av klorofyll a. *Rogalandforskning, rapport RF-2000/050*.
- Klaveness, D., 1984. Klorofyll a. *I: Vennerød, K. (red.), Vassdragsundersøkelser. En metodebok i limnologi. Universitetsforlaget, s 127-131.*
- 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.*