



International Research Institute of Stavanger

www.irisresearch.no

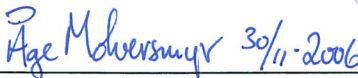
Åge Molversmyr

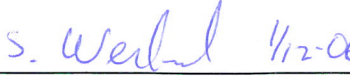
**Klorofyll *a***  
**Sammenlignende**  
**laboratorieprøving**  
**2006**

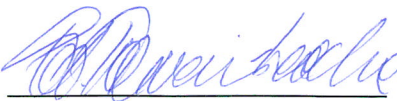
Rapport IRIS – 2006/043

Prosjektnummer: 7151765  
Prosjektets tittel: Sammenlignende laboratorieprøving for klorofyll *a*, 2006  
Oppdragsgiver(e): IRIS / SLP-deltakere  
Forskningsprogram:  
ISBN: 82-490-0434-5  
Gradering: Åpen

Stavanger, 30.11.2006

  
Åge Molversmyr 30/11-2006  
Prosjektleder Sign.dato

  
Stig Westerlund 1/12-06  
Kvalitetssikrer Sign.dato

  
Päivi A. Teivainen-Lædre Sign.dato  
Forskningssjef  
IRIS-Marint miljø

## **Forord**

*International Research Institute of Stavanger AS (tidligere RF – Rogalandforskning) har tidligere arrangert sammenlignende laboratorieprøvinger for klorofyll a, i 1997, 2000 og 2003. Etter ønske fra flere laboratorier ble det på nytt arrangert en tilsvarende laboratorieprøving i 2006.*

*Prøvetaking og prøveutsendelse ble foretatt 26. og 27. juni 2006, av Åge Mølversmyr (IRIS). 8 laboratorier deltok i prøvingen, som hovedsakelig ble finansiert gjennom en deltakeravgift.*

*Stavanger, 30. november 2006.*

## 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
3 DELTAKERE .....	4
4 REFERANSER.....	4

## Sammendrag

Det deltok 8 laboratorier i denne sammenlignende laboratorieprøvingen 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 noe lavere 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 høyest klorofyllinnhold (A og B) var 75% av resultatene tilfredsstillende, når en akseptgrense på 15% legges til grunn. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde også 75% mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. For prøveparet med lavere klorofyllinnhold (C og D) var 63% av resultatene tilfredsstillende (innenfor en akseptgrense på 15%), mens 69% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var om lag som ved de to foregående SLP i 2000 og 2003.

Fem av laboratoriene er akkreditert for analyse av klorofyll a. Ett av disse oppnådde ikke tilfredsstillende resultat for noen av prøvene, mens et annet hadde noe høyt avvik for en av prøvene. To av de tre ikke-akkrediterte laboratoriene oppnådde tilfredsstillende resultater for alle prøvene. Datamaterialet gir ikke grunnlag for å påvise forskjeller mellom resultater fra akkrediterte og ikke-akkrediterte laboratorier.

Betydelige avvik fra antatt "sanne" verdi synes for et av laboratoriene å ha sammenheng med stort filtreringsvolum og bruk av lange kyvettelengder, som har gitt for høy absorbanse ved måling i spektrofotometeret. Her må en påpeke viktigheten av å unngå høye eller lave absorbanse, og at retningslinjene som er gitt i standardmetodene følges.

---

### Referanse:

Molversmyr, Å., 2006. Klorofyll a. Sammenlignende laboratorieprøving, 2006. *International Research Institute of Stavanger, rapport IRIS - 2006/043.*

---

# 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 noe lavere algeinnhold (prøve C og D).

Prøvene ble hentet inn 26. juni 2006. 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 2,5 liters plastflasker. Flaskene ble fylt helt fulle, og plassert sammen med et fryseelement i kjølebager. Kjølebager ble oppbevart på kjølerom til neste dag, før de ble sendt som ekspresspakker til de enkelte deltakerne (med ankomst påfølgende dag).

Følgende prøver ble sendt ut:

Prøve A og B: Innsjøprøver med algebiomasse på henholdsvis 1,61 og 1,81 mg/l (våtvekt). Planteplanktonet bestod i hovedsak av kiselalger (*Fragilaria* og *Asterionella*) og cryptomonader (*Cryptomonas*), med innslag av blågrønnalger (*Gomphosphaeria*), fureflagellater (*Ceratium*) og små uidentifiserte algetyper (µ-alger). I prøve B var det litt mer kiselalger og fureflagellater enn i prøve A.

Prøve C og D: Innsjøprøver med algebiomasse på henholdsvis 1,01 og 1,44 mg/l (våtvekt). Planteplanktonet bestod i hovedsak av blågrønnalger (*Anabaena* og *Planktothrix*), med et visst innslag av kiselalger (*Fragilaria*), cryptomonader (*Cryptomonas*) og små uidentifiserte algetyper (µ-alger).

## 1.2 Anvendte metoder

Analysemetode	Antall lab.	Prinsipp
NS 4766	1	Ekstraksjon med 90% aceton, og med oppmaling av filter.
NS 4767	5	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.

Laboratoriene benyttet filteroppsats med GF/C filtre med diameter på 47 mm (evt. 55 mm). Tre laboratorier anga ikke filterstørrelse.

De fleste laboratoriene startet filtrering relativt umiddelbart etter prøvemottak (noen ventet til senere samme dag). Et laboratorium mottok prøvene om ettermiddagen, og oppbevarte disse i kjølerom til neste dag før filtrering. Et laboratorium opplyser å ha oppbevart prøvene i kjølebagen i 2 døgn fra prøvemottak til filtrering.

Et laboratorium startet ekstraksjon umiddelbart etter filtrering, mens de andre oppbevarte filtrene i fryser (fra 4 til 42 døgn) før videre analyse (ekstraksjon). Et laboratorium ga ingen opplysninger utover selve prøvesvarene.

## 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 middelerverdi ( $\bar{x}$ ) og standardavvik ( $s$ ). Resultater som ligger utenfor  $\bar{x} \pm 3s$  forkastes før endelig beregning av middelerverdi, 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  $\pm 15\%$ . 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 prøveforsendelse fra IRIS 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.

## 2 Resultater

Analyseresultatene fra de deltagende laboratoriene er gjengitt i tabell 1, mens deltakernes resultater presentert i Youdendiagram er vist i figur 1 og figur 2. Enkel statistikk for hver prøve er vist i tabell 2.

Tabell 1. Resultater for de fire prøvene, slik deltakerne rapporterte de ( $\mu\text{g}/\text{l}$  klorofyll a).

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D	Timer før filtrering	Døgn i frys	Rang. nr.*
1	15,49	20,42	9,43	6,71	20	7	4
2	4,95 $\mathbf{u}$	5,56 $\mathbf{u}$	3,87 $\mathbf{u}$	3,84 $\mathbf{u}$	65	19	8
3	15,3	21,1	9,1	8,2	20	12	2,5
4	15,18	20,00	8,65	8,00	20	15	1,5
5	14	20	8,4	7,7	42	4	5
6	14,59	19,78	9,27	8,54	18	42	3,5
7	10,56	11,27	5,84	5,46	21	0	7
8	15,5	21,5	9,5	8,4	-	-	4,5

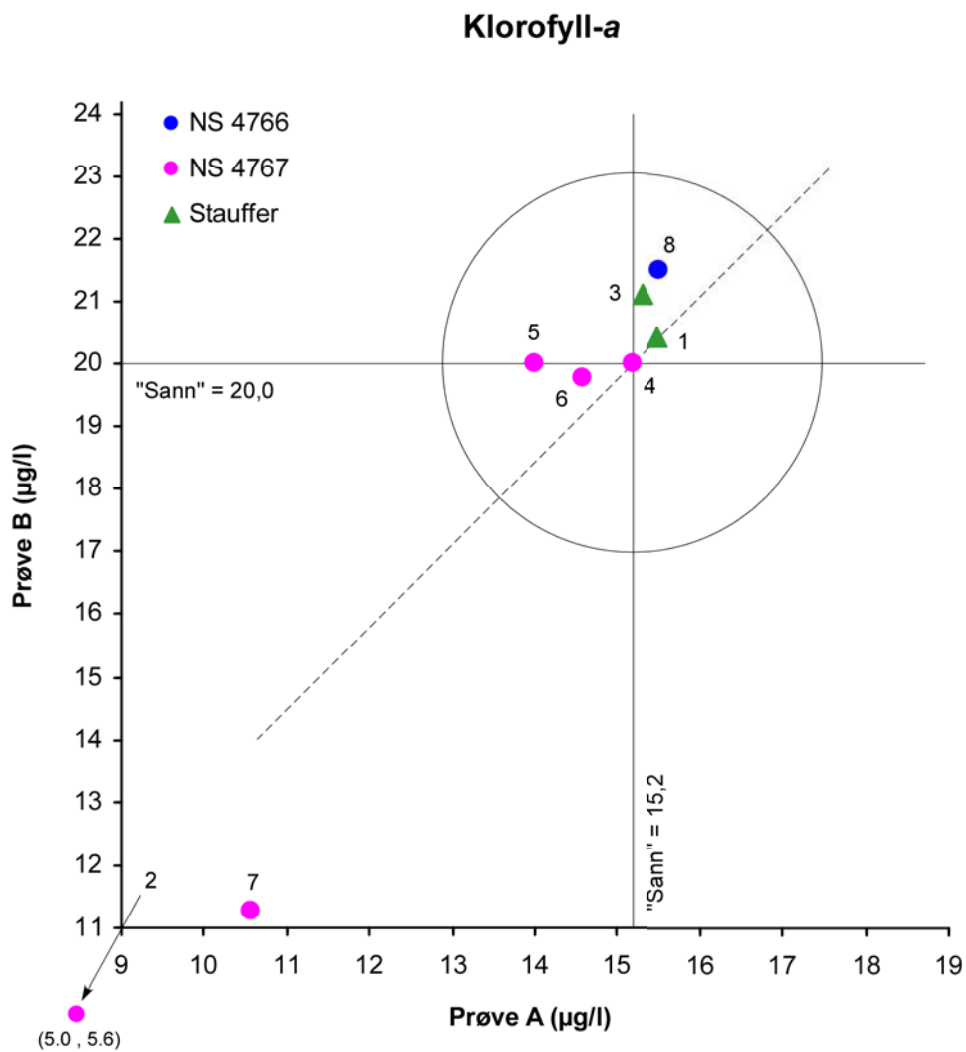
\* for hvert prøvepar er laboratoriene rangert etter minste totalfeil, og gjennomsnittet for de to prøveparene er angitt som rangeringsnummer (rang.nr.).

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

Totalt deltok 8 laboratorier i denne sammenlignende laboratorieprøvingen for analyse av klorofyll a.

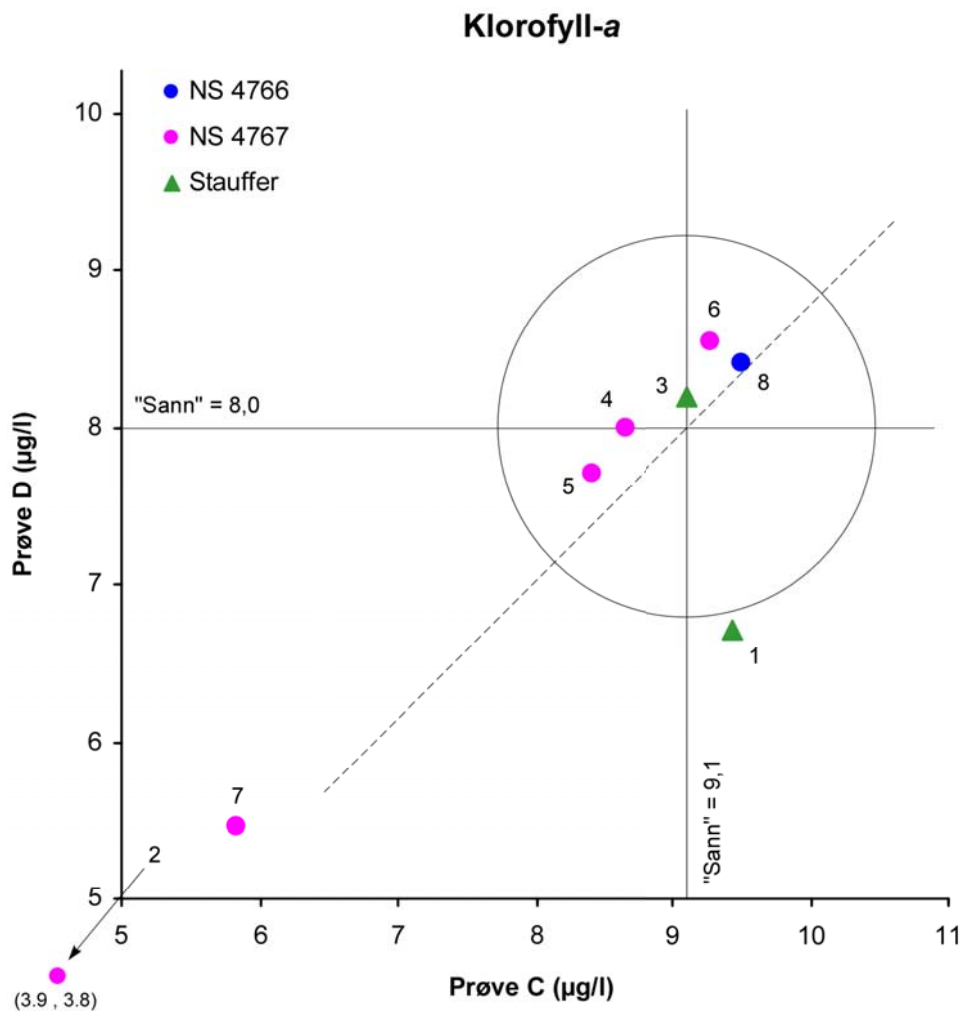
For prøveparet med høyest klorofyllinnhold (A og B) var 75% av resultatene tilfredsstillende, når en legger til grunn en akseptgrense på 15%. Ser en på enkeltresultatene for disse prøvene, hadde også 75% mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. For prøveparet med lavere klorofyllinnhold (C og D) var 63% av resultatparene tilfredsstillende (innenfor en akseptgrense på 15%), mens 69% av enkeltresultatene for disse prøvene hadde mindre avvik enn 15% fra antatt "sann" verdi. Andelen av tilfredsstillende resultater var om lag som ved de to foregående SLP i 2000 og 2003 (Molversmyr & Horve 2000; Molversmyr 2003).

Et laboratorium oppga resultater for samtlige prøver som avvek så mye fra antatt "sanne" verdier at resultatene ble utelatt fra videre beregninger. Dette laboratoriet filtrerte relativt store prøvevolum (hele de mottatte prøvene på ca. 2,5 liter), og brukte 5 cm kyvetter ved avlesning i spektrofotometeret. Stort prøvevolum gjør at ekstraktet blir sterkt farget, og ved bruk av 5 cm kyvetter kan en komme over et metningspunkt der spektrofotometeret ikke lenger gjengir lineær respons på økt klorofyllinnhold. Generelt vil spektrofotometri gi betydelig usikkerhet ved lave og høye absorbanser, og i standardmetodene er det derfor anbefalt at filtreringsvolumet velges slik at en oppnår absorbans mellom 0,05 og 0,8 ved avlesningen (uansett kyvettelengde). Det aktuelle laboratoriet opplyste i ettertid at prøveekstraktene også ble målt i 1 cm kyvetter, og at resultatene da var i rimelig samsvar med det som er antatt som "sann" verdi for prøvene.



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 15%.

Tabell 2. Statistikk

Prøve:	<b>A</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	8	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	15,2	
Middelverdi:	14,4	
Medianverdi:	15,2	
Standardavvik:	1,8	
Relativt standardavvik (%):	12,3	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
2	4,95u	-67,4
7	10,56	-30,4
5	14	-7,8
6	14,59	-3,9
4	15,18	0,0
3	15,3	0,8
1	15,49	2,0
8	15,5	2,1

Prøve:	<b>B</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	8	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	20,0	
Middelverdi:	19,2	
Medianverdi:	20,0	
Standardavvik:	3,5	
Relativt standardavvik (%):	18,4	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
2	5,56u	-72,2
7	11,27	-43,7
6	19,78	-1,1
4	20	0,0
5	20	0,0
1	20,42	2,1
3	21,1	5,5
8	21,5	7,5

Prøve:	<b>C</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	8	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	9,10	
Middelverdi:	8,60	
Medianverdi:	9,10	
Standardavvik:	1,28	
Relativt standardavvik (%):	14,9	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
2	3,87u	-57,5
7	5,84	-35,8
5	8,40	-7,7
4	8,65	-4,9
3	9,1	0,0
6	9,27	1,9
1	9,43	3,6
8	9,5	4,4

Prøve:	<b>D</b>	
Metoder:	alle	
Enhet:	µg/l	
Antall deltakere:	8	
Antall utelatte resultater:	1	
Antatt "sann" verdi:	8,00	
Middelverdi:	7,57	
Medianverdi:	8,00	
Standardavvik:	1,11	
Relativt standardavvik (%):	14,7	
Lab. nr.	Resultat	% avvik "sann"
2	3,84u	-52,0
7	5,46	-31,8
1	6,71	-16,1
5	7,7	-3,8
4	8	0,0
3	8,2	2,5
8	8,40	5,0
6	8,54	6,7

u = resultat som er utelatt fra statistiske beregninger.

Av de andre laboratoriene som oppnådde tilfredsstillende resultater var det også noen som filtrerte relativt store prøvevolum (2 liter eller mer), men disse benyttet hensiktsmessige kyvettelengder. En mulig feilkilde med metodene er utilstrekkelig ekstraksjon, men resultatene indikerer at prøvevolumer opp til 2,5 liter, med et algeinnhold som i de aktuelle prøvene, bli ekstrahert tilstrekkelig/ fullstendig.

Et annet laboratorium oppnådde også for lave resultater for begge prøveparene. I følge opplysninger fra dette laboratoriet ble prøvene filtrert kort tid etter mottak, og ekstraksjon ble igangsatt umiddelbart. Også filtreringsvolum og kyvettstørrelser var hensiktsmessige, og avvikende resultater må derfor ha andre årsaker (for eksempel feil ved instrument eller kalibrering).

Laboratoriet med svært avvikende resultater oppbevarte prøvene i hele 2 døgn etter prøvemottak, før filtrering ble foretatt. Selv om dette er betydelig lengre enn den maksimale lagringstiden på 24 timer (oppbevart mørkt og kaldt) som standardmetodene foreskriver, synes forholdet ikke å ha vært årsaken til de avvikende resultatene siden avviket antakelig var knyttet til bruk av for store kyvettelengder (se ovenfor). Et annet laboratorium, som oppnådde tilfredsstillende resultater, oppbevarte også prøvene vesentlig lengre enn anbefalt. Et laboratorium (med tilfredsstillende resultater) overskred dessuten betydelig den anbefalte maksimumstiden for oppbevaring av filtre i fryser før ekstraksjon. Ingen av disse forholdene knyttet til prøvehåndteringen syntes altså å ha innvirket vesentlig på resultatene, selv om enkelte avvikende resultater ved forrige SLP i 2003 ble tilskrevet dette (Molversmyr 2003).

De fleste laboratoriene opplyser at spektrofotometeret har vært kalibrert/kontrollert i løpet av det siste halvåret, med unntak av ett hvor siste kontroll var utført høsten 2004. Et laboratorium ga ingen opplysninger.

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). Dataene gir imidlertid 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. Ett av disse oppnådde ikke tilfredsstillende resultat for noen av prøvene, mens et annet hadde noe høyt avvik for en av prøvene. Laboratoriet som ble utelatt fra datasettet er ikke akkreditert, mens de to andre ikke-akkrediterte laboratoriene begge oppnådde tilfredsstillende resultater for alle prøvene. Datamaterialet gir imidlertid ikke grunnlag for å påvise forskjeller mellom resultater fra akkrediterte og ikke-akkrediterte laboratorier.

Totalt viser denne laboratorieprøvingen at det stort sett oppnås tilfredsstillende resultater med de aktuelle analysemetodene for klorofyll a. En må imidlertid påpeke viktigheten av å unngå høye eller lave absorbanser ved spektrofotometermålingene, i tråd med anbefalingene som er gitt i standardmetodene.

### **3 Deltakere**

AnalyCen AS, Moss

BUVA AS, Drammen

Kystlab AS, Molde

M-Lab AS, Stavanger

NIVA, Oslo

Oslo kommune, Vann- og avløpsetaten, Oslo

Trondheim kommune, Analysesenteret, Trondheim

VestfoldLAB AS, Tønsberg

## 4 Referanser

- 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., 2003. Sammenlignende laboratorieprøving 2003. Analyse av klorofyll a. *Rogalandsforskning, rapport RF-2003/264*.
- 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
- 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*.