

Metodické poznámky ke stanovení chlorofylu-a podle ČSN ISO 10260 získané z výsledků programů zkoušení způsobilosti

Petr Pumann, Tereza Pouzarová

Státní zdravotní ústav

Vodárenská biologie 21
10. – 11. 2. 21, Praha

Chlorofyl-a ve vodním prostředí

- přítomen v řasách, sinicích, ale i v makrofytech
- údaj o jeho koncentraci se využívá jako míra pro množství přítomného fytoplanktonu
- různé metody stanovení
 - spektrofotometricky po extrakci (různými činidly - etanol, aceton, metanol)
 - spektrofotometricky in vivo
 - in-situ fluorescenční sondy
 - HPLC
 - z družicových snímků
- v provozní praxi zatím převládá metoda dle ČSN ISO 10260 – Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů – Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a
 - rutinně v několika desítkách laboratoří (podniky povodí, zdravotní ústavy, některé vodárny a jiné provozní laboratoře)

Postup podle ČSN ISO 10260

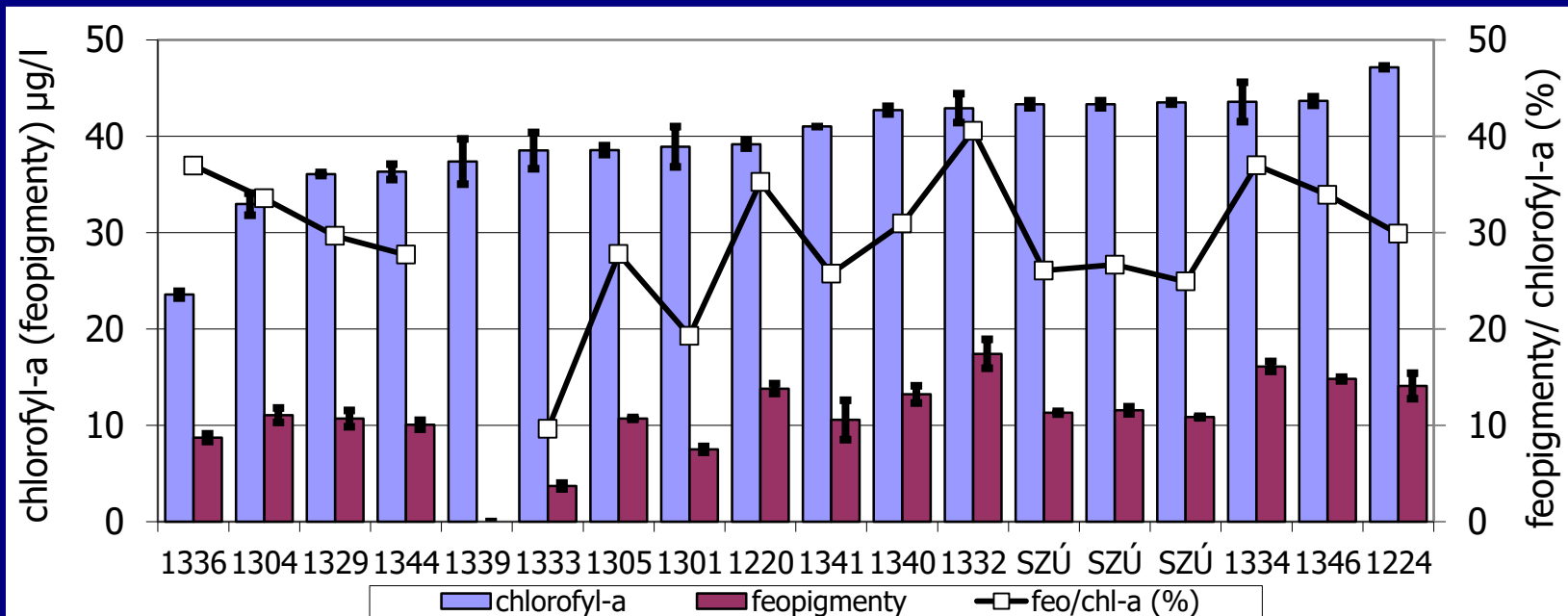
- filtrace (obvykle 0,1 - 2 litry vzorku)
 - filtr ze skleněných vláken, záchyt nad 1 μ m
- extrakce v 90% etanolu
 - filtr roztřepat
 - vodní lázeň při 75 °C po dobu 5 min (varianta B)
- vyčištění extraktu
 - centrifugace nebo filtrace
- měření při 665 a 750 nm
- měření při 665 a 750 nm po okyselení HCl (korekce na feopigmenty)
- výpočet (výsledky v μ g/l) dle známých optických vlastností chlorofylu-a

Vhodnou volbou objemu vzorku, etanolu a optické dráhy kyvety lze měřit chl-a v různých koncentračních úrovních



Chlorofyl-a a programy zkoušení způsobilosti

- není k dispozici referenční materiál, kterým by bylo možné prověřit celý postup (nanejvýš spektrofotometr)
- **velký význam mezilaboratorního porovnání**
 - v ČR nabízí SZÚ, CSLab, Aslab



Program pořádaný SZÚ

- 1x ročně (září/říjen)
- od roku 2004
- živé vzorky, etanolový extrakt, mražené filtry (2011-15)
- doplňují informace o metodě
- homogenita, „stabilita“

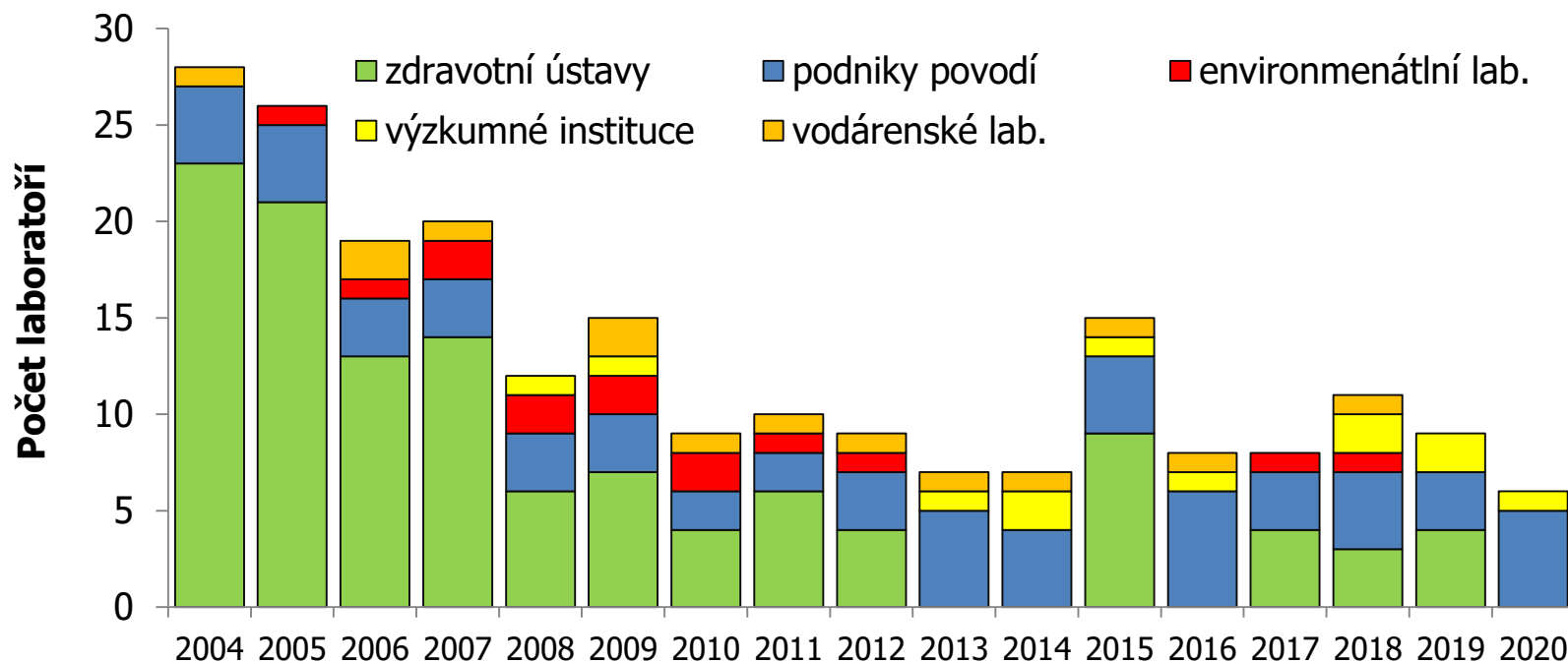
mražené filtry
2011 - 2015



vzorek / sbíraný údaj	rok 2004 - 2020																
	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
počet živých vzorků	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
počet etanolových extraktů						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
počet zmražených filtrů								2	2	2	2	2					
filtrovaný objem	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
objem extraktu	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
optická dráha kyvety	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
absorbance		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
typ spektrofotometru	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
typ filtru					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
extrakční varianta								✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
materiál extrakční nádoby									✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
čištění extraktu									✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
čas po extrakci									✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓

Účastníci programů

- ročně mezi 6 a 28 účastníky (poslední dobou kolem 10)
- především zdravotní ústavy a podniky povodí
- celkem se účastnilo 51 různých laboratoří (většina opakovaně)
- ojediněle účastníci ze Slovenska

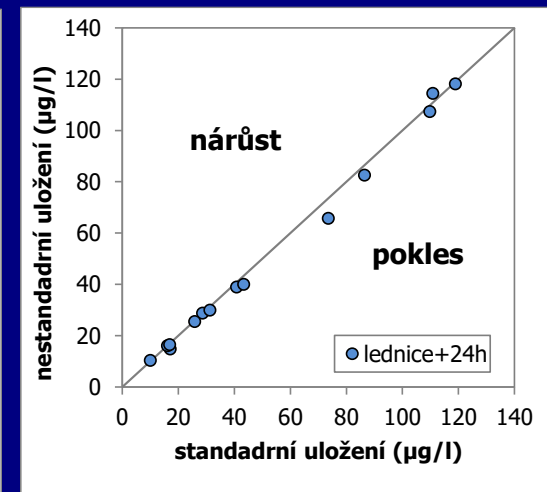
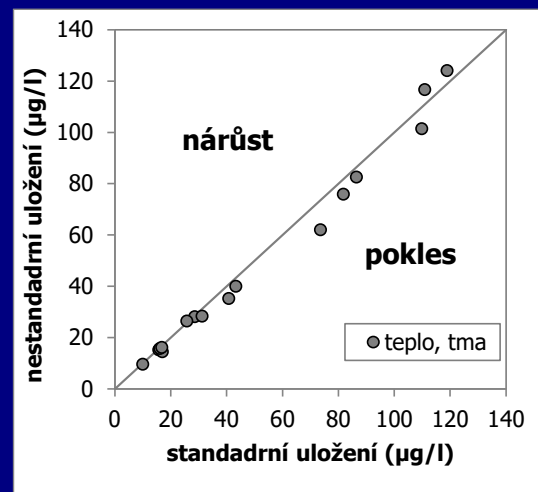
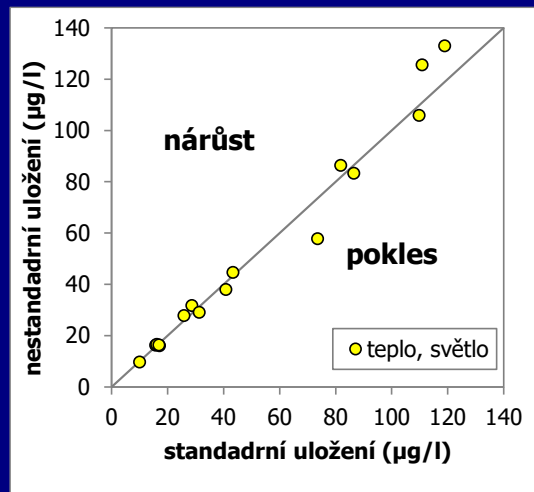


Kritické body (některé) ve stanovení chlorofylu-a podle ČSN ISO 10260

- uchování vzorku před analýzou (čas, teplota, světlo, složení vzorku)
- filtrace (objem vzorku, integrita filtru,...)
- účinnost extrakce (zbytková voda ve filtrech, dostatečný čas k extrakci, materiál extrakčních nádob, ...)
- vyčištění extraktu (zbytky filtru a zachyceného materiálu v extraktu)
- zacházení s extraktem (minimalizovat vliv světla)
- okyselení extraktu (správná koncentrace HCl, důsledná vizuální kontrola přidání HCl k extraktu)
- měření absorbance (spektrofotometr, vhodné rozmezí absorbancí)
- výpočet (chyby ve výpočtu, v přepisu, falzifikace výsledků)

Uchování vzorku před analýzou

- SZÚ kromě vzorků na kontrolu homogenity zpracovává i vzorky nestandardně uložené
 - na světle při laboratorní teplotě
 - ve tmě při laboratorní teplotě
 - v lednici o 24 hodin déle, než je předepsaný čas ke zpracování
- u vyšších výsledků často větší zastoupení sinic a skrytěnek – méně stabilní vzorky
- pro SZÚ při přípravě vzorků pro program - vyhnout se koncentracím kolem 100 $\mu\text{g/l}$
- pro účastníky – skladování mimo lednici je větší problém, než delší časová zpracování o den později



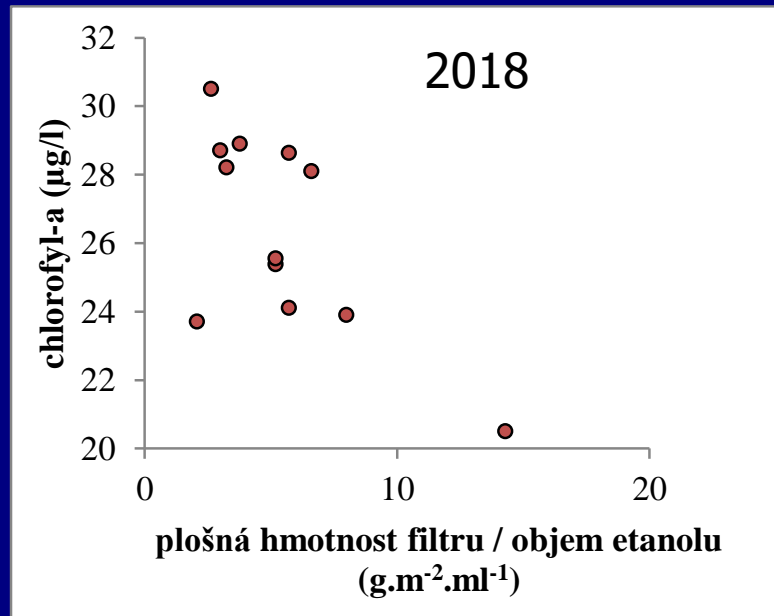
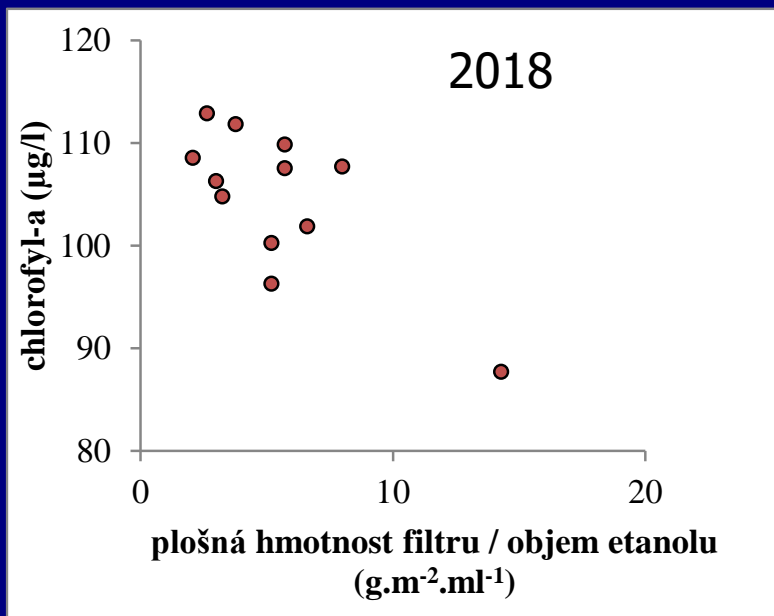
Objem vzorku

- jediná část postupu, kterou je nutno „expertně“ posoudit s každým vzorkem
- podle normy se má pohybovat mezi 0,1 – 2 litry (v programech zkoušení způsobilosti je však maximum 1 litr – dvoulitrová vzorkovnice, paralelní stanovení)
- někteří účastníci použili zbytečně nízké objemy (jen desítky ml - většinou se jednalo o nezkušené laboratoře v prvních kolech programu)
- i v současnosti však některé laboratoře volí sice objemy větší než 0,1 litru, avšak příliš nízké k dosažení vhodné „vhodné“ absorbance
- obecně čím větší objem vzorku, tím menší nejistota jeho měření (ale závisí na tom, zda vždy používají odměrné válce stejné velikosti – tento údaj od účastníků nesbíráme)



Zbytková voda ve filtru

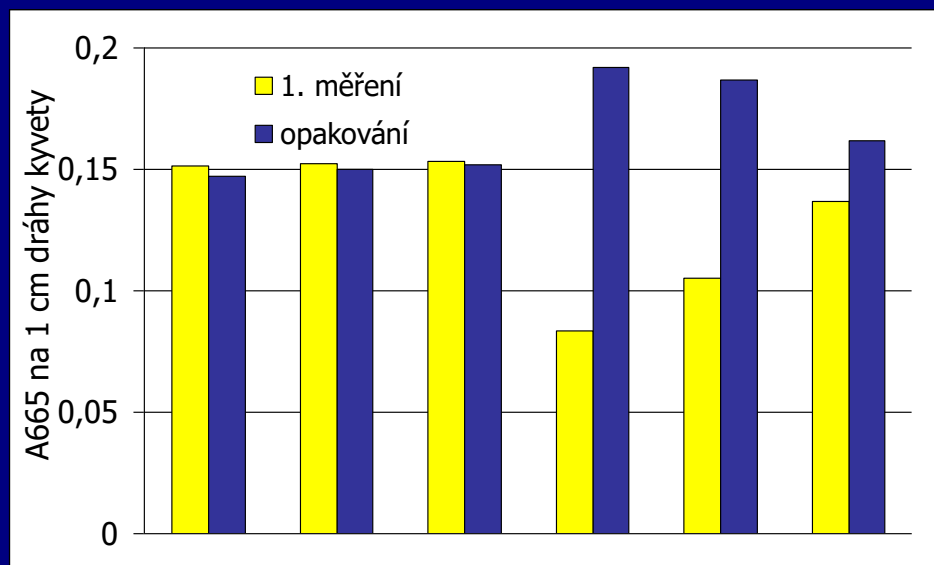
- extrakční varianta B
- naředí extrakt – u filtru Whatman GF/B (47 mm průměr) při objemu etanolu 10 ml – 12 % konečného objemu extraktu (Vodárenská biologie 2011)
- sníží koncentraci etanolu – nižší účinnost extrakce ?



Čas mezi extrakcí a vyčištěním extraktu

- norma pro variantu A uvádí alespoň 3 minuty, ale pak dále píše „obvykle o několika hodinách“ a připouští i dny
- pro variantu B alespoň 15 minut, kdy se extrakt nechá po vyjmutí z vodní lázně chladnout na laboratorní teplotu
 - nemusí být dostatečné – viz graf níže
- v některých kolech patrné nižší hodnoty absorbance při 665 nm (či chl-a) při časech kratších než hodina
- materiál extrakční nádoby – extrakt se hůře prohřívá v plastových nádobách (viz Vodárenská biologie 2011)

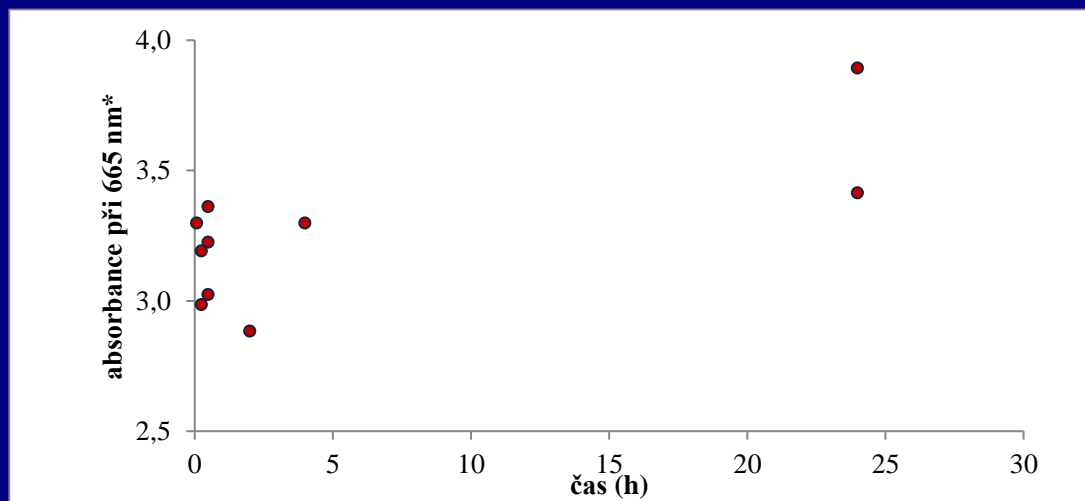
Nezamýšlený experiment při zácviku nové pracovnice – stanovení opakovatelnosti – 6 paralelních stanovení (Vodárenská biologie 2011)



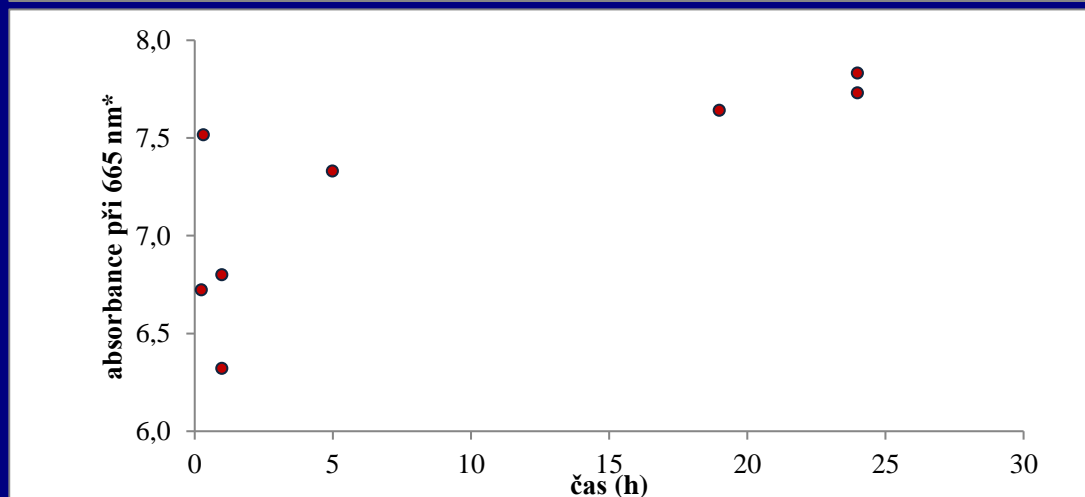
Čas mezi extrakcí a vyčištěním extraktu

vybrané „povedené“ vzorky

2019



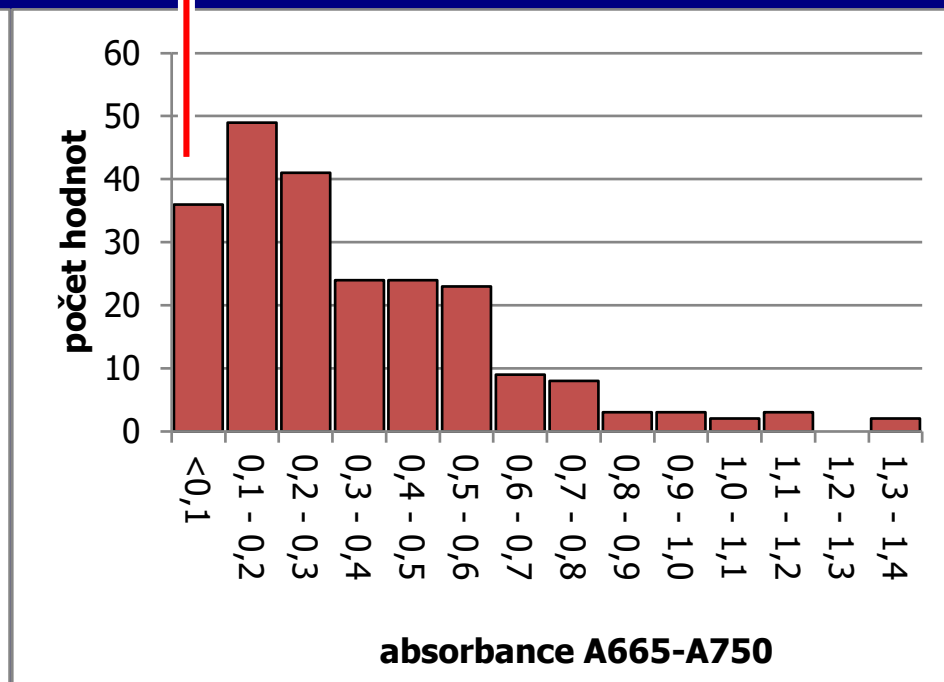
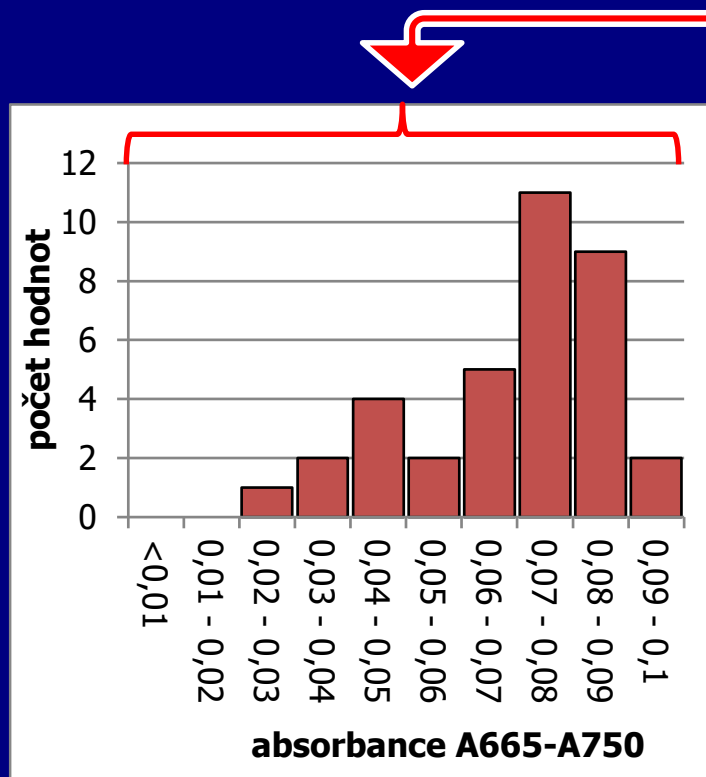
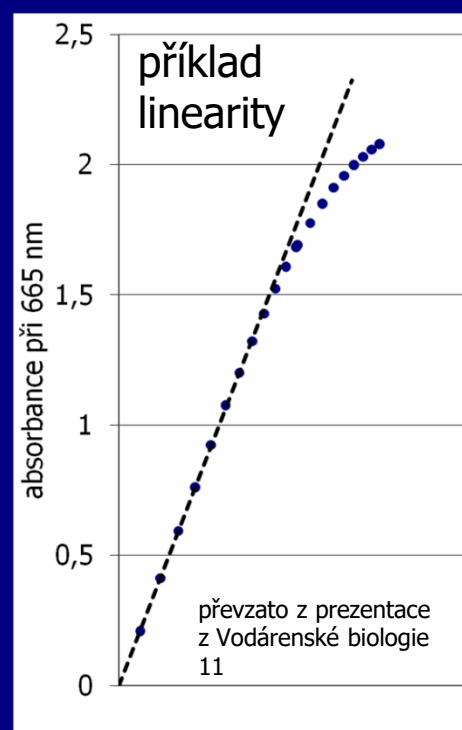
2013



*rozdíl absorbancí při 665 nm a 750 nm převeden na hodnotu odpovídající 1 cm optické dráhy kyvety, 1 ml etanolu a 1000 ml filtrovaného vzorku

Měření absorbance

- absorbance by měla být v intervalu 0,01 - 0,8
 - 0,01 je ale strašně málo – malá změna absorbance způsobí velkou změnu výsledku
 - lépe více než 0,1
- vhodné rozmezí - úpravou objemu vzorku (především), objemu extrakčního činidla a optické dráhy kyvety, možné i ředění extraktu



Špatné (nedostatečné) okyselení extraktu

- po změření absorbancí se část extraktu okyselí 3 M HCl (10 μ l na 10 ml extraktu) – převedení chlorofylu na jeho rozkladné produkty
- některé laboratoře v tom evidentně alespoň občas chybní

vz.	absorbance					chlorofyl-a (μ g/l)		feopigmenty (μ g/l)		feo/chl-a	
	A ₆₆₅	A ₇₅₀	A _{k665}	MA _{k665}	A _{k750}	původní	úprava	původní	úprava	původní	úprava
A	0,6161	0,0015	0,5574	0,4100	0,0039	22,6	77,2	121	28,4	5,36	0,37
	0,6161	0,0018	0,5618	0,4080	0,0016	20,0	77,0	126	28,7	6,27	0,37
B	0,2355	0,0015	0,2074	0,1550	-0,0003	8,7	25,9	39,3	10,0	4,55	0,39
	0,2565	0,0024	0,2297	0,1710	0,0022	8,8	28,1	43,8	10,9	5,01	0,39

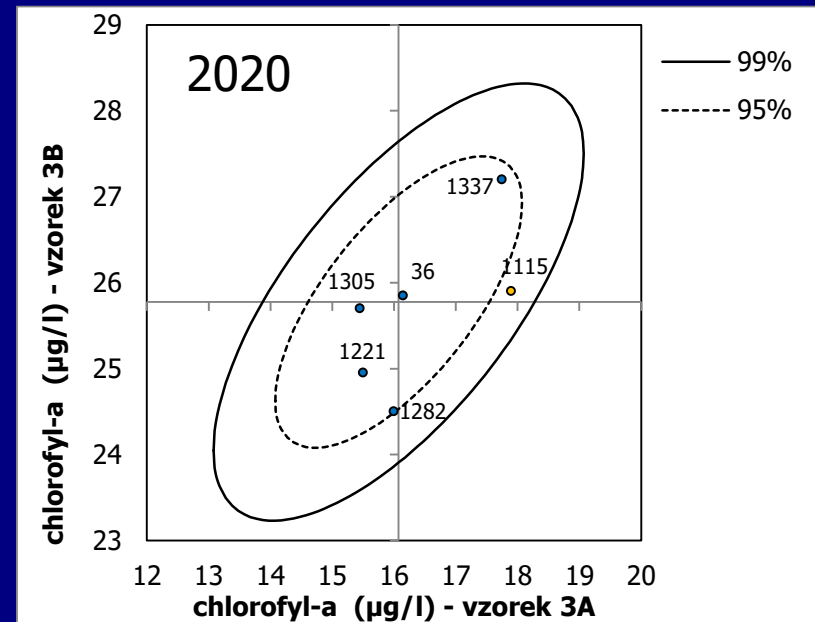
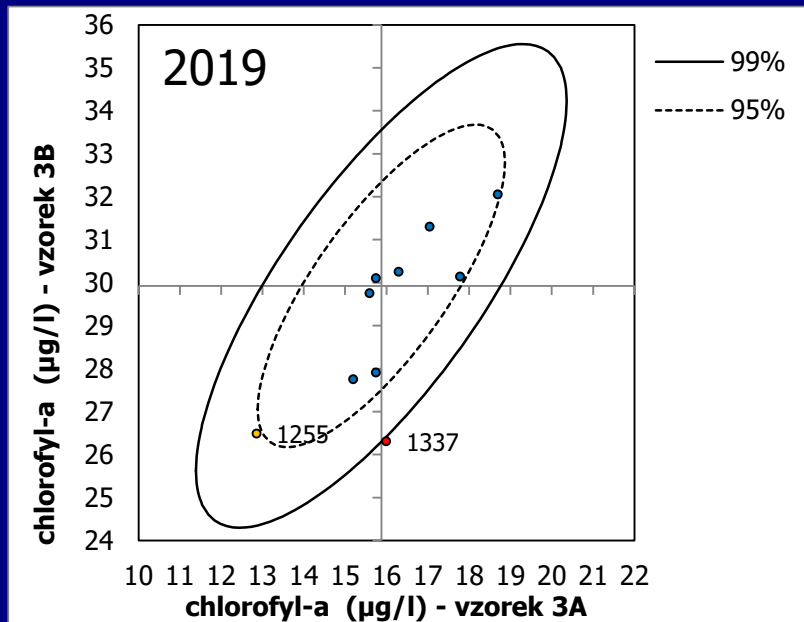
- opomíjený význam feopigmentů a jejich poměru k chlorofylu-a pro kvalitu práce
- občas „záporné“ feopigmenty – ???

Falzifikace výsledků

- vzhledem ke sbíraným údajům, lze odhalit snáze falzifikaci výsledků, pokud si falzifikace chtivý účastník nedá práci je zamaskovat dobře vymyšlenými údaji (ale takoví zase obvykle nemusí falzifikovat)
- nutno odlišit od překlepů
- poslední dobou jsme žádné případy neodhalili (u chlorofylu-a – v jiných programech bohužel ano)

Systematické chyby

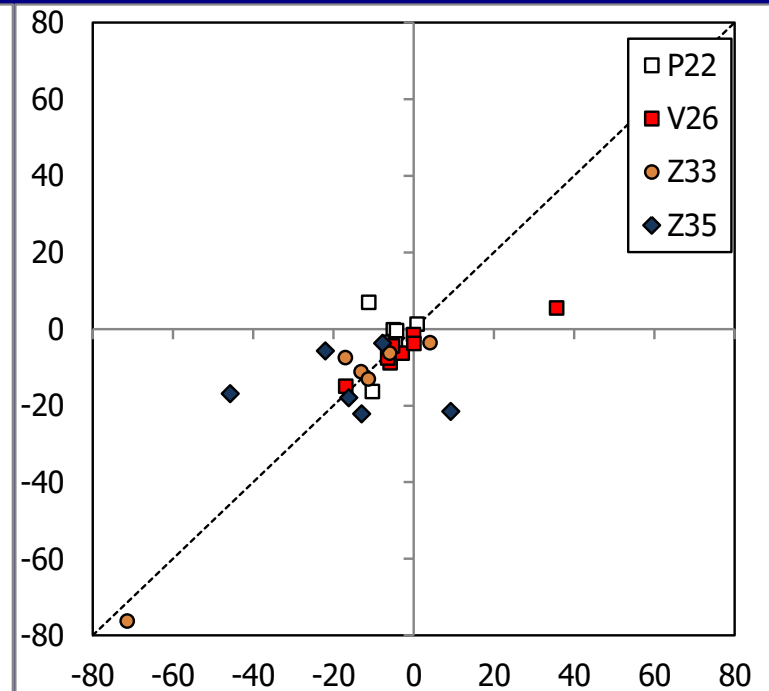
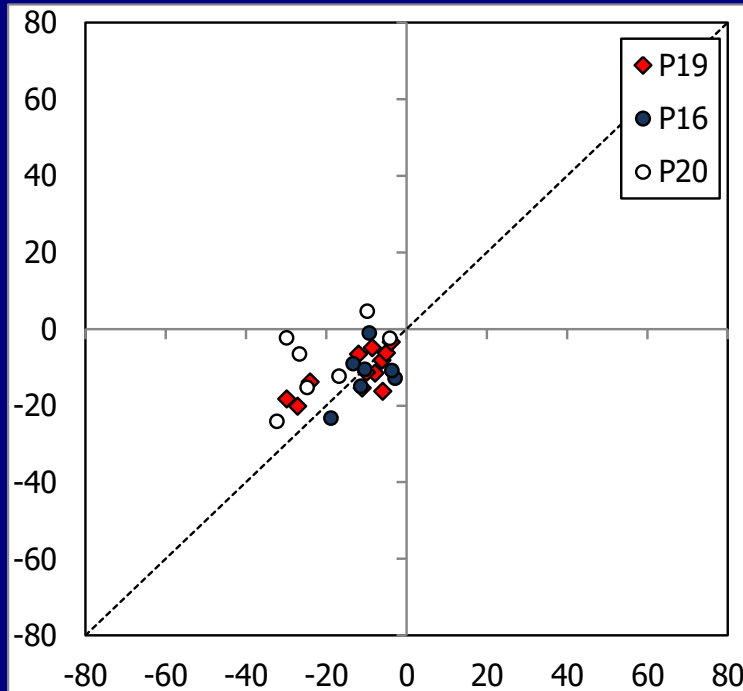
- v rámci jednotlivých kol používáme tzv. Youdenovy grafy



Systematické chyby

- problém při zobrazení více kol – nutnost „referenční“ hodnoty
 - z-skore není zcela vhodné - závislé na zúčastněných laboratořích
 - použít relativní rozdíl ve srovnání s laboratoří SZU

Sedm nejčastějších účastníků v období 2009 - 2020



Závěry

- za hlavní zdroj systematické chyby při stanovení podle ČSN ISO považujeme typ filtru v kombinaci s objemem použitého etanolu (resp. relativní množství zbytkové vody ve filtrech)
- hrubé chyby – část z nich by mohla být odhalena analytikem při důsledném používání feopigmentů a jejich relativnímu množství k chlorofylu-a

A co dál?

- v plánu máme systematičtější zpracování dat z tohoto programu, než bylo představeno v rámci dnešního příspěvku včetně statistických metod
- zařazení některých doplňujících otázek do sbíraných údajů o metodě

Děkujeme za pozornost

Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330).