

Validering av nytt HPLC-system for analyse av biogene aminer (BIOLAB-metode A55)

Gunnhild Hovde og Bente Asbjørnsen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1433 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Validering av nytt HPLC-system for analyse av biogene aminer (BIOLAB-metode A55)</p>	<p>ISBN 978-82-8296-657-3 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Validation of a new HPLC system for analysis of biogenic amines (BIOLAB method A55)</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 40/2020</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Gunnhild Hovde og Bente Asbjørnsen</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p> <p><i>Dato:</i> 19. november 2020</p>
<p><i>Avdeling:</i> Biolab</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 31+15</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Intern</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i></p>
<p><i>Stikkord:</i> Validering, HPLC, biogene aminer</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 11277</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Det ble validert et nytt HPLC-system for analyse av biogene aminer (BIOLAB-metode A55). Det nye instrumentet er en Agilent 1260 Infinity II, som erstatter en Perkin Elmer Series 200. Det er ingen endringer i metodens prinsippl eller prøvematiser. Riktighet, presisjon og linearitet ble vurdert, og valideringen demonstrerte at ytelsen til instrumentet er som forventet. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser fra og med 13. november 2020.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>A new HPLC system for analysis of biogenic amines was validated (BIOLAB method A55). The new instrument is an Agilent 1260 Infinity II, which replaces a Perkin Elmer Series 200. There are no changes in the method principle or sample matrices. Accuracy, precision, and linearity were assessed, and the validation demonstrated that the performance of the instrument is as expected. The report has been reviewed by Norwegian Accreditation and the instrument has been approved for accredited analyzes as of November 13th 2020.</p>	

Innhold

1	Rapportens omfang	1
2	Validering	2
2.1	Riktighet.....	2
2.1.1	Ringtestresultater.....	2
2.1.2	Kontrollprøve.....	5
2.2	Presisjon	8
2.3	Linearitet	10
2.3.1	Tyramin.....	12
2.3.2	Putrescin.....	16
2.3.3	Cadaverin.....	21
2.3.4	Histamin.....	25
2.3.5	Oppsummering.....	29
3	Konklusjon	30
4	Referanser	31
	Vedlegg 1 Valideringsplan	ii
	Vedlegg 2 Riktighet	iv
	Vedlegg 3 Presisjon	vii
	Vedlegg 4 Linearitet	xi

1 Rapportens omfang

Det ble validert et nytt HPLC-system for analysemetoden BIOLAB A55 Biogene aminer. Dette er en akkreditert analysemetode hos Nofima Biolab. De biogene aminene ekstraheres ved bruk av perklorisyre og separeres deretter i et HPLC-system ved hjelp av gradienteluering med påfølgende post-kolonnederivatisering med o-phtaldialdehyd (OPA). De derivatiserte aminene detekteres på fluorescensdetektor ved eksitasjonsbølglengde 365 nm og emisjonsbølglengde 418 nm. Det nye instrumentet er en Agilent 1260 Infinity II og erstatter et gammelt instrument (Perkin Elmer Series 200). Det er ingen endringer i metodens prinsipp eller prøvematriser.

Før et nytt instrument tas i bruk må det valideres i henhold til NMKL-prosedyre nr. 4 (2009). For en eksternt validert metode hvor det tas i bruk et nytt instrument må det gjøres en verifisering av riktighet og presisjon og eventuelt av kvantifiseringsgrense (NMKL 2009). I tillegg har instrumentets linearitet blitt undersøkt, noe som vil bekrefte om instrumentet yter godt nok i forhold til metodens kvantifiseringsgrense.

2 Validering

Valideringsplanen er vist i vedlegg 1.

2.1 Riktighet

Biolab deltar i fast ringtestprogram for biogene aminer fra LVU (Labor Vergleichs Untersuchung) og Masterlab med gode resultater. Dermed antas det at resultater produsert på den gamle HPLCen er riktige, og at en sammenligning mellom de to instrumentene vil bekrefte riktigheten av den nye HPLCen. Det ble analysert to tidligere analyserte ringtestprøver av fiskemel, men det er viktig å være klar over at over tid vil nivået av biogene aminer endre seg noe og en eksakt overensstemmelse med tidligere resultater kan ikke forventes. Den ene ringtestprøven som ble analysert på nytt instrument var fra 2019 (vårt journalnummer 2019-935-1) og ble opprinnelig analysert i mars 2019. Den andre ringtestprøven som ble analysert var fra 2020 (vårt journalnummer 2020-1617-1) og ble opprinnelig analysert i april 2020. Det forventes at den nyeste av disse to prøvene ligger nærmest tidligere resultater og SLP-arrangørens middelverdi.

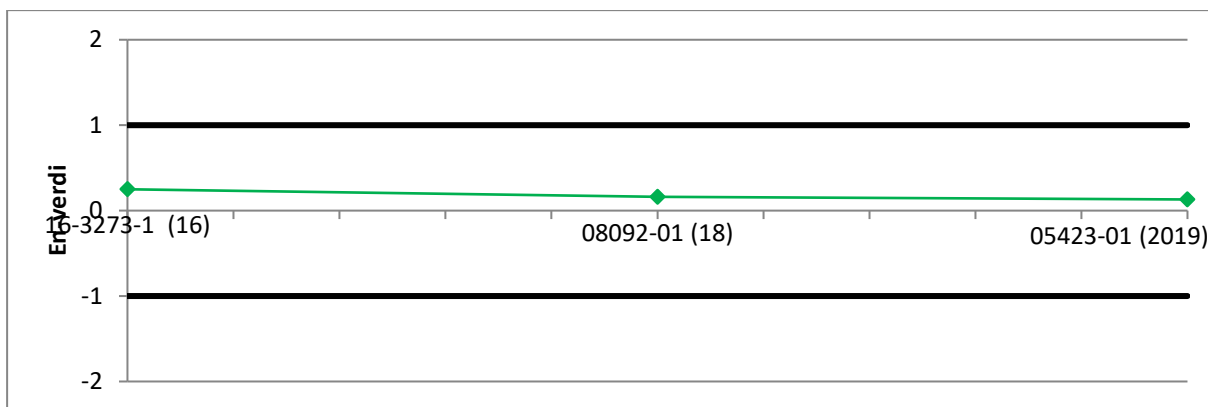
2.1.1 Ringtestresultater

For ringtestresultater beregnes det alltid en E_n -verdi («error normalized»-verdi) i henhold til formel 2.1.

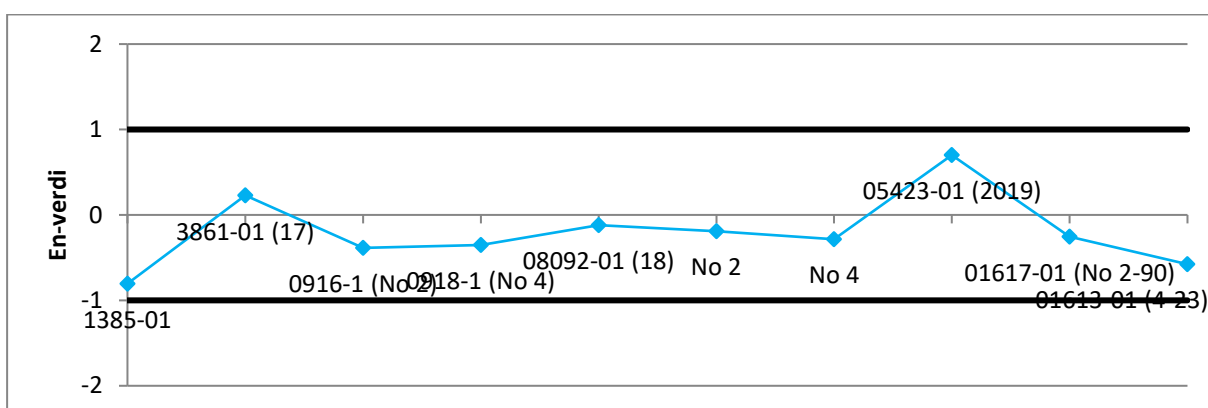
$$E_n\text{-verdi} = \frac{X - X_{SLP}}{\sqrt{(U_X)^2 + \left(\frac{U_{SLP}}{\sqrt{n}}\right)^2}} \quad (2.1)$$

X er middelverdien som ble oppnådd ved analysen, X_{SLP} er ringtestarrangørens beste estimat på sann verdi av analytten i prøven, U_X og U_{SLP} er utvidet måleusikkerhet (to ganger standardavviket, u) for henholdsvis X og X_{SLP} . n er antall laboratorier som deltok i ringtesten. Den ideelle E_n -verdien er 0. E_n -verdier mellom -1 og 1 betraktes som akseptable, E_n -verdier mellom -2 og -1 og 1 og 2 betraktes som betenkelige og E_n -verdier under/over ± 3 betraktes som ikke-akseptable (ISO 2005).

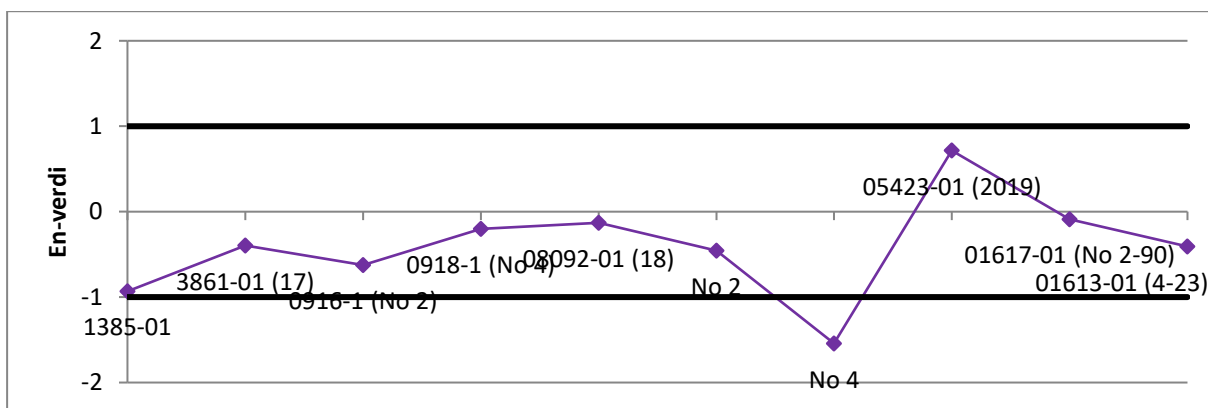
En oppsummering av de tre siste ringtestresultatene for tyramin og de ti siste ringtestresultatene for putrescin, cadaverin og histamin er vist i Tabell V. 1 til Tabell V. 4 i vedlegg 2 og i Figur 1 til Figur 4 nedenfor. Det er kun prøver fra LVU som analyseres for tyramin, derfor er ikke ringtestdeltakelsen for dette aminet like omfattende som for de andre aminene.



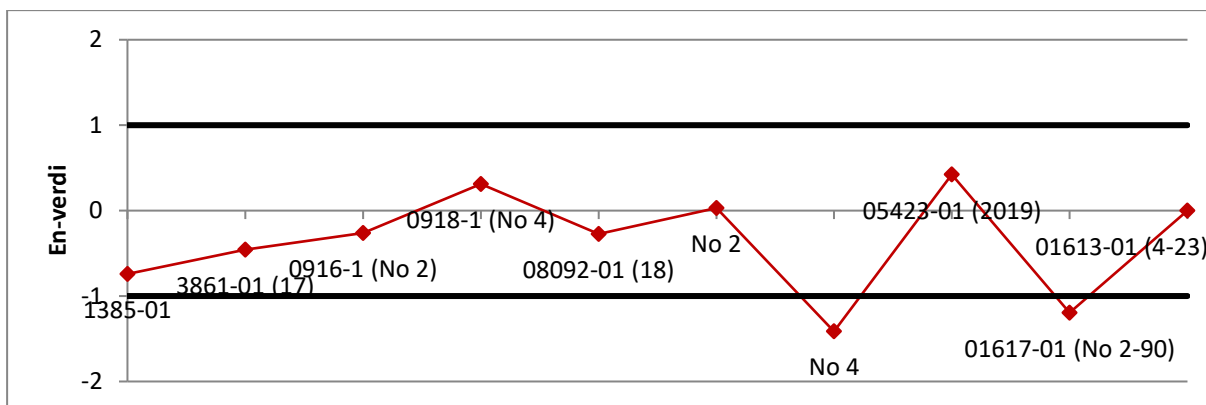
Figur 1 De tre siste ringtestresultatene (E_n -verdier) for tyramin, analysert i perioden august 2016 til september 2019.



Figur 2 De ti siste ringtestresultatene (E_n -verdier) for putrescine, analysert i perioden april 2017 til april 2020.



Figur 3 De ti siste ringtestresultatene (E_n -verdier) for cadaverin, analysert i perioden april 2017 til april 2020.



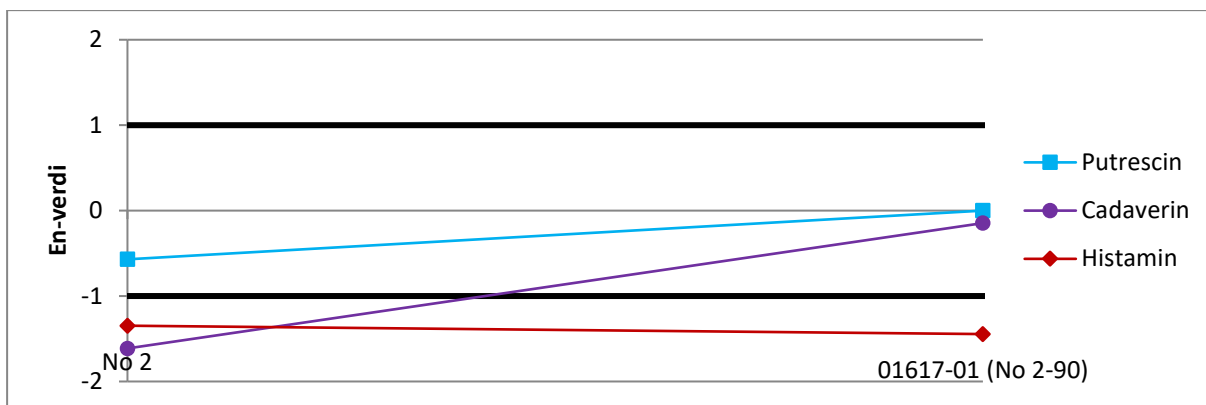
Figur 4 De ti siste ringtestresultatene (E_n -verdier) for histamin, analysert i perioden april 2017 til april 2020.

Resultatene for ringtestene er gode og de fleste E_n -verdiene i perioden ligger i det godkjente området. Cadaverin har en verdi i det betenkelige området (nedre alarmområde), mens histamin har to. Den ene prøven (No 4) var under kvantifiseringsgrensen til metoden (prøve av fisk som knapt inneholdt biogene aminer), mens for prøve 01617-01 (No 2-90) er det benyttet mange ulike metoder og u_{SLP} er noe høyt, noe som bidrar til en litt lav E_n -verdi for histamin.

To av ringtestprøvene ble analysert på nytt på ny HPLC. Det kunne ikke analyseres flere prøver fordi det kun var to prøver av fiskemel som var tilgjengelige på prøvelageret. Disse er varmebehandlet og er mest stabile over tid. Resultatene er vist i Tabell 1 og Figur 5. Fiskemelet kommer fra Masterlab og er derfor ikke analysert for tyramin.

Tabell 1 Oppsummering av reanalyse av to ringtester fra Masterlab.

	Amin	Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Ringtestarrangør	Masterlab	Masterlab	Masterlab	Masterlab	Masterlab	Masterlab
	Vårt journalnummer	2019-935-1	2020-1617-1	2019-935-1	2020-1617-1	2019-935-1	2020-1617-1
	Prøvenummer	No 2	01617-01 (No 2-90)	No 2	01617-01 (No 2-90)	No 2	01617-01 (No 2-90)
	Prøvetype	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel
	Middelverdi	1026	255	1806	495	482	59
	Antall deltakere	7	14	7	14	9	16
HPLC-system	u_{SLP}	84	77	187	137	47	42
	Resultat	995	241	1675	486	485	32
Gammel HPLC	u_{Nofima}	75	18	126	36	49	4
	E_n -verdi	-0,19	-0,26	-0,45	-0,09	0,03	-1,20
	Resultat	938	255	1398	480	373	27
Ny HPLC	u_{Nofima}	70	19	105	36	37	4
	E_n -verdi	-0,57	0,00	-1,61	-0,15	-1,35	-1,45

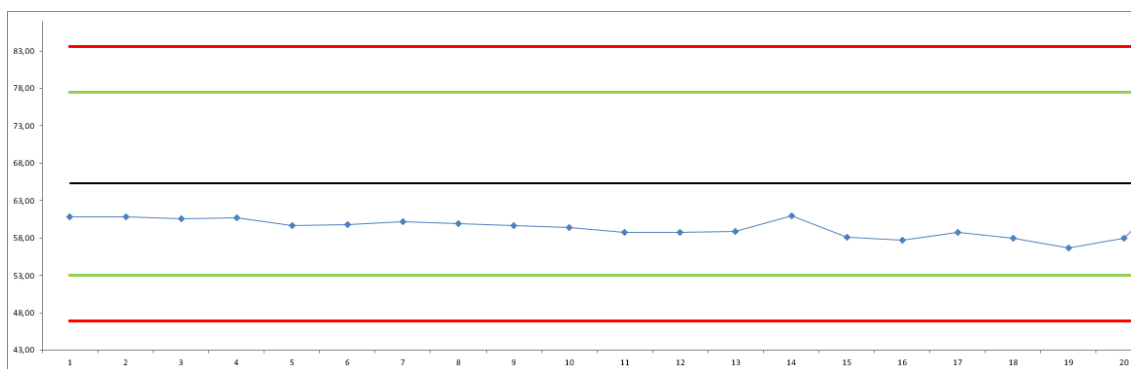


Figur 5 E_n -verdier for reanalyse av ringtester.

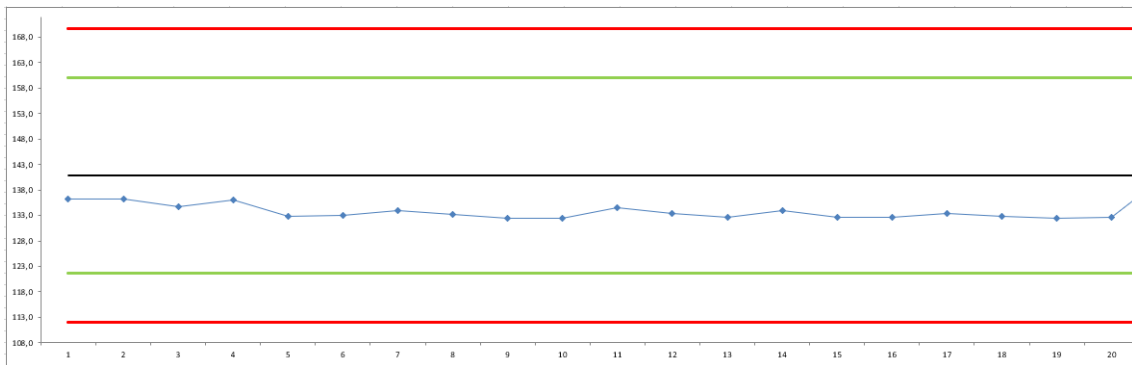
Som vist er resultatene noe lavere enn opprinnelig resultat med unntak av putrescin i prøve 01617-01 (No 2), men det er som nevnt forventet at nivået av biogene aminer over tid vil synke noe også i varmebehandlede prøver. Det er minst forskjell for den nyeste prøven (01617-01 (No 2)) der ingen av resultatene ville blitt betegnet som uteliggere av arrangør. Alle E_n -verdiene er innenfor det godkjente eller det betenkelige området.

2.1.2 Kontrollprøve

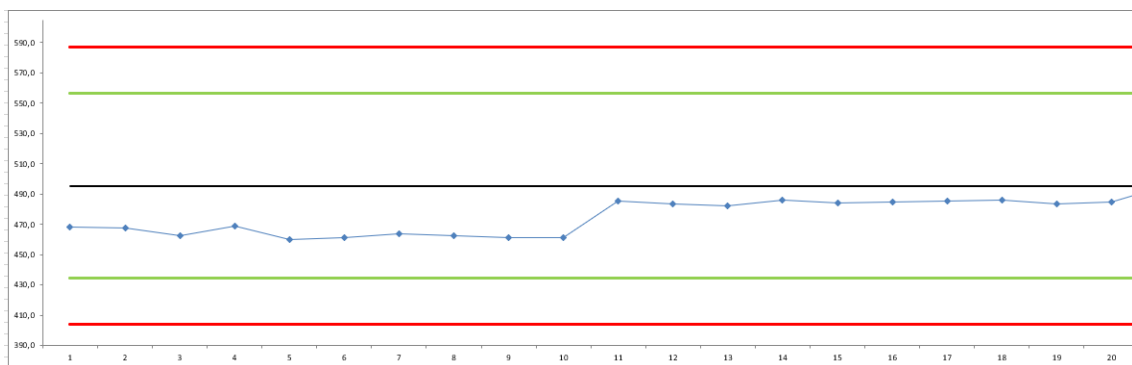
Kontrollprøven ble analysert på det nye instrumentet for å undersøke om resultatene ligger i det godkjente området av kontrollkortet. Ved godkjente verdier antas det at riktigheten er god siden prestasjonen i ringtest som nevnt er god, og dermed at det gamle instrumentet produserer riktige resultater. Kontrollkortet er basert på analyse på det gamle instrumentet. Kontrollprøven ble analysert på to forskjellige dager med ti paralleller hver gang. Resultatene er vist i Tabell V. 5, vedlegg 2 og i Figur 6 til Figur 9.



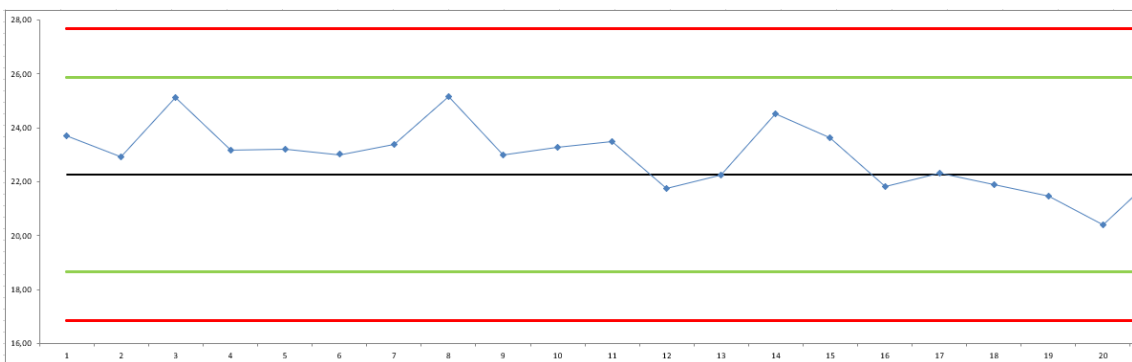
Figur 6 Kontrollkort for tyramin der 20 verdier fra analyse på ny HPLC er plottet.



Figur 7 Kontrollkort for putrescin der 20 verdier fra analyse på ny HPLC er plottet.



Figur 8 Kontrollkort for cadaverin der 20 verdier fra analyse på ny HPLC er plottet.



Figur 9 Kontrollkort for histamin der 20 verdier fra analyse på ny HPLC er plottet.

Som vist er alle resultatene i det godkjente området av kontrollkortet.

Det ble benyttet F-test for å undersøke om det er signifikant forskjell på varians for de 20 siste verdiene av KP (på gammel HPLC) og de 20 verdiene analysert over. Resultatene av F-testen er vist i Tabell 2.

Tabell 2 F-test for å undersøke om det er signifikant forskjell på varians for det gamle og det nye HPLC-systemet.

Amin	Tyramin		Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt	58,08	59,32	136,34	133,63	495,52	474,12	19,89	22,98
Standardavvik	3,30	1,21	3,44	1,30	9,89	11,04	1,01	1,20
Varians	10,91	1,48	11,84	1,69	97,74	121,92	1,02	1,43
Antall observasjoner (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Frihetsgrader	19	19	19	19	19	19	19	19
F-verdi (beregnet)	7,392		7,026		1,247		1,396	
F-verdi (kritisk), 2-sidig	2,526		2,526		2,526		2,526	
p-verdi (1-sidig)	0,00003		0,00004		0,31742		0,23722	
p-verdi (2-sidig)	0,00006		0,00009		0,63485		0,47445	

Beregnet F-verdi er høyere enn kritisk F-verdi for tyramin og putrescin, og p-verdien er $<0,05$. Det vil si at det er signifikant forskjell på variansen for tyramin og putrescin, men det er ikke helt uventet da tallmaterialet for gammel HPLC er analysert over ti forskjellige dager i perioden fra 18. juni til 17. august, mens for ny HPLC er det bare analysert over to dager og variansen er veldig lav. For cadaverin og histamin er F-verdien lavere enn kritisk F-verdi og p-verdien er $>0,05$, det vil si at det ikke er signifikant forskjell på variansen, men disse aminene hadde også en noe større spredning ved analyse på ny HPLC.

Det ble videre benyttet t-test for å undersøke om det var forskjeller mellom gjennomsnittet av kontrollprøven analysert på de to instrumentene. Igjen ble det benyttet de 20 siste verdiene for gammel HPLC. T-testene ble utført i Excel og det ble valgt «to utvalg med antatt ulike varianser» for tyramin og putrescin og «to utvalg med antatt like varianser» for cadaverin og histamin. Resultatene er vist i Tabell 3 og Tabell 4.

Tabell 3 t-test for gjennomsnittet av kontrollprøven for tyramin og putrescin (beregnet i Excel ved bruk av "to utvalg med antatt ulike varianser").

Amin	Tyramin		Putrescin	
	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt	58,08	59,32	136,34	133,63
Antall observasjoner (n)	20	20	20	20
Frihetsgrader	24		24	
t (beregnet)	-1,574		3,302	
t kritisk (tosidig)	2,064		2,064	
p-verdi (tosidig)	0,129		0,003	

Tabell 4 t-test for gjennomsnittet av kontrollprøven for cadaverin og histamin (beregnet i Excel ved bruk av "to utvalg med antatt like varianser").

Amin	Cadaverin		Histamin	
	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC
HPLC-system				
Snitt	495,52	474,12	19,89	22,98
Antall observasjoner (n)	20	20	20	20
Frihetsgrader	38		38	
t (beregnet)	6,458		-8,820	
t kritisk (tosidig)	2,024		2,024	
p-verdi (tosidig)	0,000		0,000	

Det er signifikant forskjell på datasettene for alle aminene med unntak av tyramin. Det vil si at den beregnede t-verdien (absoluttverdien) er høyere enn kritisk t-verdi, og p-verdien er <0,05. Igjen må det nevnes at datagrunnlaget for ny HPLC er noe snevert og kun analysert over to dager. Forskjellene blir derfor akseptert siden alle resultater av kontrollprøven på ny HPLC ligger i det godkjente området av kontrollkortet.

2.2 Presisjon

Presisjon beskriver overensstemmelsen mellom uavhengige resultater oppnådd på nøyaktig samme måte under spesifikke forhold. Presisjon uttrykkes vanligvis ved standardavvik. Metodens presisjon kan bestemmes som enten repeterbarhet eller reproducerbarhet. Repeterbarhet vil si at analysemetoden benyttes på identiske prøver på samme laboratorium med samme utstyr i løpet av en kort tidsperiode. Reproducerbarhet vil si at analysemetoden brukes på identiske prøver på forskjellige laboratorier med forskjellig utstyr (Douglas A. Skoog 2004, NMKL 2009). En mellomting mellom repeterbarhet og reproducerbarhet kalles gjerne «intermediate precision». Et eksempel er at en identisk prøve analyseres på samme laboratorium, men med til dels forskjellig utstyr og forskjellige analytikere. Dette er ofte tilfellet for kontrollprøven. Betingelsene for presisjonsberegningen som er brukt i denne rapporten er vist i Tabell 5.

Tabell 5 Betingelser for beregning av presisjon på de to instrumentene.

Betingelse	Gammel HPLC	Ny HPLC
Samme prøve	Ja	Ja
Samme analytiker	Nei	Ja
Samme utstyr	Delvis	Delvis
Tidsperiode	10 dager	2 dager

For beregning av presisjon ble beregning som for repeterbarhetsgrense benyttet. Repeterbarhetsgrensen (r) er et uttrykk for den absolutte forskjellen med 95 % konfidensintervall mellom to uavhengige testresultater oppnådd ved betingelsene nevnt om repeterbarhet i avsnittet over (ISO 1994). Slike testresultater kalles dobbeltbestemmelser (NMKL 2009). r beregnes som vist i formel 2.2.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r \quad (2.2)$$

t er den tosidige t -verdien ved 95 % konfidensintervall og S_r er standardavviket til repeterbarheten (ISO 1994). S_r beregnes her som standardavviket av målingene.

Som regel antas det at antall frihetsgrader går mot uendelig og at $t=1,96$. Ved disse betingelsene beregnes r som vist i formel 2.3.

$$r = 2,8 \times S_r \quad (2.3)$$

Krav til presisjon på det nye instrumentet er at den er minst like god som for det gamle. Siden det sammenlignes prøver over et mindre tidsrom for det nye instrumentet forventes det at presisjonen for det nye instrumentet er noe bedre enn for det gamle. En oppsummering av presisjonen er vist i Tabell 6. Fullstendig datamateriale er vist i Tabell V. 6 til Tabell V. 13 i vedlegg 3.

Tabell 6 En oppsummering av presisjonen (beregnet som standardavviket til repeterbarheten og repeterbarhetsgrense) for nytt og gammelt instrument.

Amin	Tyramin		Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt	58,08	59,32	136,34	133,63	495,52	474,12	19,89	22,98
S_r	3,30	1,21	3,44	1,30	9,89	11,04	1,01	1,20
r	9,25	3,40	9,64	3,64	27,68	30,92	2,83	3,35

Det er bedre presisjon for ny HPLC enn for den gamle for tyramin og putrescin. For cadaverin og histamin er presisjonen noe bedre for gammel HPLC enn for ny HPLC. For cadaverin er det litt forskjell på de to dagene på ny HPLC som gjør at presisjonen blir noe dårligere enn for gammel HPLC. For histamin er spredningen noe høyere enn for de andre aminene på grunn av at toppen er liten i kromatogrammet og det skal mindre variasjon i integreringen til før resultatet påvirkes. Presisjonen på ny HPLC vurderes som god nok. For de andre aminene er presisjonen som forventet bedre for ny HPLC på grunn av kort tidsintervall for analysene. Over tid forventes det at presisjonen på gammel og ny HPLC vil være omtrent den samme.

2.3 Linearitet

Linearitet ble undersøkt ved å fortynne standardløsning til ulike konsentrasjoner og hver standardløsning ble injisert to ganger. Måleområdet skulle dekke minst det akkrediterte måleområdet til metoden, derfor ble det akkrediterte måleområdet omregnet til injisert mengde på instrumentet. Metodens nedre akkrediterte måleområde er 2,0-100 mg/kg og metodens øvre akkrediterte måleområde er 100-3000 mg/kg. Tabell 7 og Tabell 8 viser det akkrediterte måleområdet omregnet til mg/l injisert på HPLC for ulike prøvetyper.

Tabell 7 Det nedre akkrediterte måleområdet omregnet til mg/l injisert på HPLC.

Prøvetype	Nedre måleområde (mg/kg)	Øvre måleområde (mg/kg)	Innveiting (g)	Fortynning (ml)	Nedre måleområde (mg/l)	Øvre måleområde (mg/l)
Fiskemel og fôr	2,0	100	5	250	0,04	2,0
Krillmel	2,0	100	10	250	0,08	4,0
Fisk	2,0	100	20	250	0,16	8,0
Ensilasje	2,0	100	10	250	0,08	4,0

Tabell 8 Det øvre akkrediterte måleområdet omregnet til mg/l injisert på HPLC.

Prøvetype	Nedre måleområde (mg/kg)	Øvre måleområde (mg/kg)	Innveiting (g)	Fortynning (ml)	Nedre måleområde (mg/l)	Øvre måleområde (mg/l)
Fiskemel og fôr	100	3000	5	250	2,0	60,0
Krillmel	100	3000	10	250	4,0	120,0
Fisk	100	3000	20	250	8,0	240,0
Ensilasje	100	3000	10	250	4,0	120,0

For biogene aminer er det slik at nivåene vil variere etter prøvetype. Det er mest biogene aminer (og da særlig cadaverin) i fiskemel, mens det er minst i fisk og krillmel. Derfor vurderes det slik at måleområdet mellom 0,08 og 60,0 mg/l injisert på HPLC dekker alle reelle prøver. I Commission Regulation (EC) No 2073/2005 er det angitt tillatte grenser for histamin i næringsmidler. For fisk kan 2 av 9 prøver ha verdier mellom 100 og 200 mg/kg, og for fiskeprodukter som har undergått enzymmodning i saltlake kan 2 av 9 prøver ha verdier mellom 200 og 400 mg/kg. Verdier over dette vil være svært sjeldne, i og med at råstoffet da ikke er godkjent i henhold til gjeldende regelverk. Det finnes ikke noe tilsvarende regelverk for de andre aminene.

For å undersøke lineariteten til instrumentet ble det laget løsninger som dekket både det nedre og det øvre akkrediterte måleområdet. Det ble laget til seks standarder per måleområde pluss blankløsning. Det undersøkte måleområdet dekket konsentrasjonene i mg/l injisert som vist i Tabell 7 og Tabell 8, pluss/minus 10 %.

For å lage standardløsninger til nedre måleområde ble det laget en stamløsning med alle fire aminene med en konsentrasjon på 10 mg/l (fri base). Denne løsningen ble fortynnet som vist i Tabell 9.

Tabell 9 Tillaging av standardløsninger for undersøkelse av linearitet i nedre måleområde.

Standard nr.	Tatt ut (ml)	Fortynnet til (ml)	Konsentrasjon (mg/l)
0 (blank)	-	-	0
1	0,25	25	0,10
2	0,7	5	1,40
3	1,5	5	3,00
4	2,2	5	4,40
5	3,1	5	6,20
6	4	5	8,00

For å lage standardløsninger til øvre måleområde ble det laget en stamløsning med alle fire aminene med en konsentrasjon på 1000 mg/l (fri base). Denne løsningen ble fortynnet som vist i Tabell 10.

Tabell 10 Tillaging av standardløsninger for undersøkelse av linearitet i øvre måleområde.

Standard nr.	Tatt ut (ml)	Fortynnet til (ml)	Konsentrasjon (mg/l)
0 (blank)	-	-	0
1	0,1	50	2,00
2	0,8	50	16,00
3	1,5	50	30,00
4	2,1	50	42,00
5	2,7	50	54,00
6	3,3	50	66,00

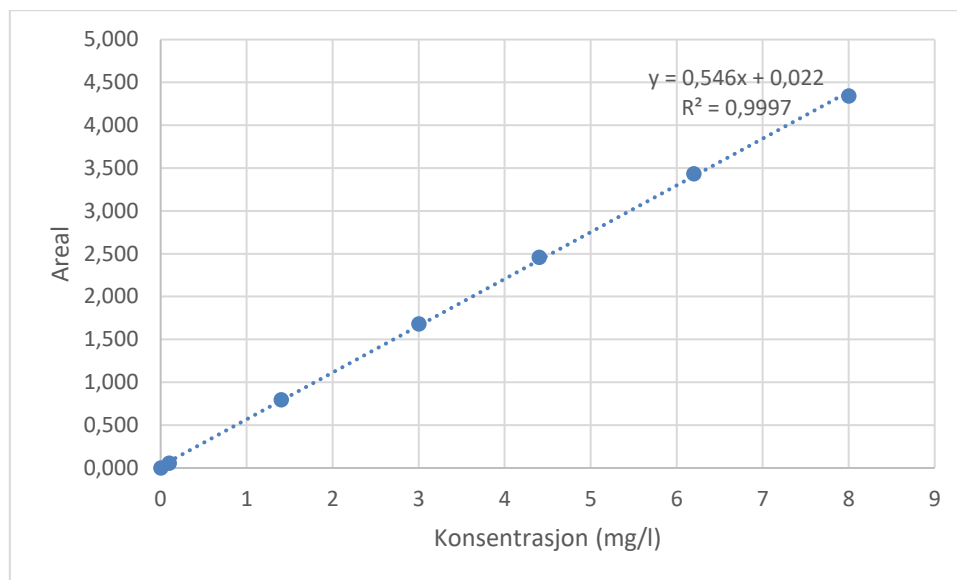
Det ble passet på at det var god spredning mellom standardene. Blankløsningen bestod av ekstraksjonsmiddelet (perklorsyre).

Hver standard ble injisert to ganger. De tilhørende arealene for hver standard er vist i Tabell V. 14 til Tabell V. 21 i vedlegg 4. Oppsummeringer, figurer og statistikk fra regresjonsanalysene er vist i hvert sitt underkapittel for de enkelte aminene nedenfor.

2.3.1 Tyramin

Nedre måleområde

Figur 10 viser regresjonslinjen for tyramin i nedre måleområde.



Figur 10 Regresjonslinje for tyramin (nedre måleområde).

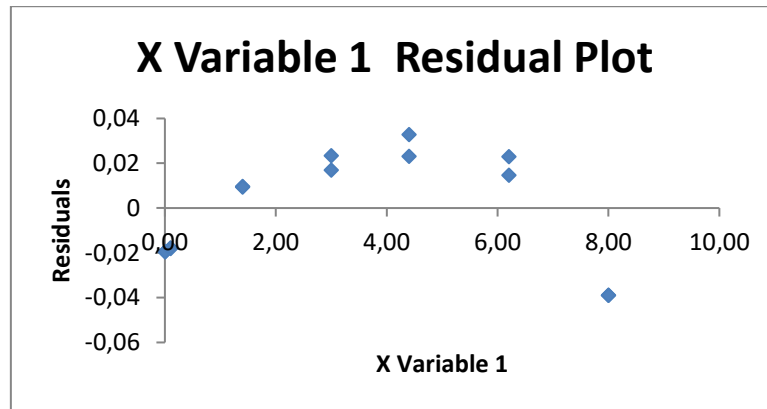
Regresjonslinjen har en korrelasjonskoeffisient (R^2 -verdi) nær 1, nærmere bestemt 0,9997. Signifikanstester bør vise at stigningstallet er forskjellig fra null, mens skjæringen med y-aksen ikke bør være forskjellig fra null. Til dette ble dataanalyseverktøyet i Excel benyttet. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 11.

Tabell 11 Regresjonsstatistikk for tyramin (nedre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9997		
F-verdi	52141		
t-verdi		1,872	228,3
p-verdi		0,086	$3,35 \times 10^{-23}$
Nedre 95 % konfidensintervall		-0,003	0,542
Øvre 95 % konfidensintervall		0,042	0,553

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=228,3$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 1,872 og p-verdien på 0,086 at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (-0,003 til 0,042) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (52141) styrker også argumentet om at regresjonen er berettiget.

Det ble laget residualplott for å undersøke om regresjonen virkelig er lineær, eller om det ser ut til at kurven bøyer av. Et residual er forskjellen mellom den observerte responsen og den forutsagt fra regresjonslinjen. Residualene bør, når plottet mot x-variabelen, ha en tilfeldig distribusjon. Residualplottet er vist i Figur 11.

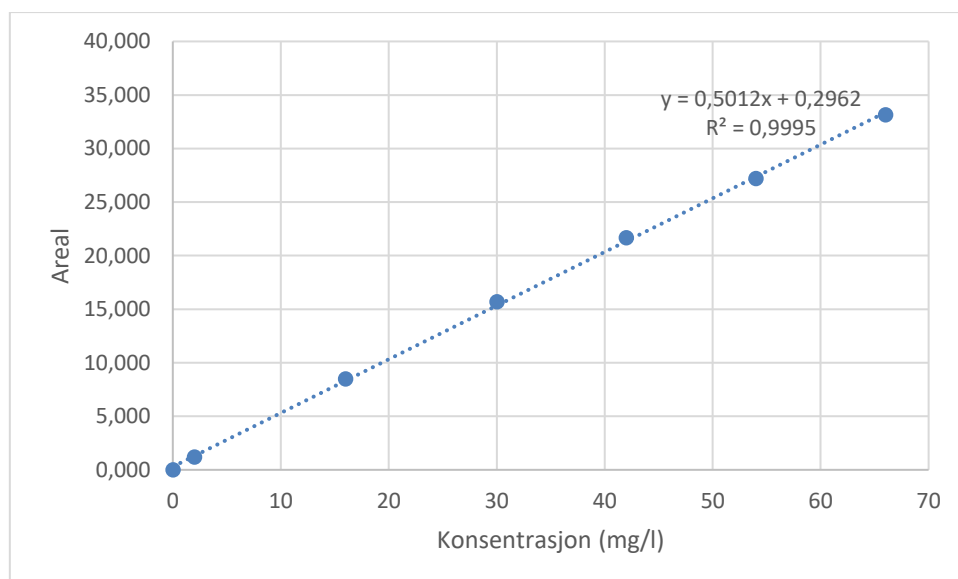


Figur 11 Residualplott for tyramin (nedre måleområde).

Residualplottet viser at det er noe grunn til å anta at det er avvik fra linearitet, og at kalibreringskurven har en kurvet respons. Det samme ser man for de andre aminene. Dette er diskutert mer i detalj i kapittel 2.3.5.

Øvre måleområde

Figur 12 viser regresjonslinjen for tyramin i øvre måleområde.



Figur 12 Regresjonslinje for tyramin (øvre måleområde).

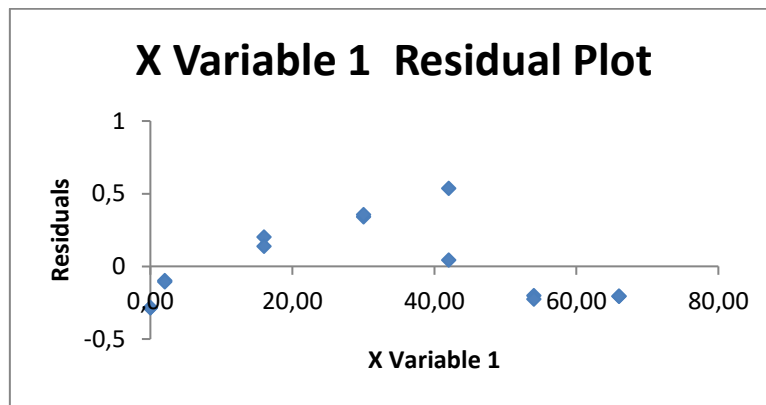
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9995. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 12.

Tabell 12 Regresjonsstatistikk for tyramin (øvre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R ² -verdi	0,9995		
F-verdi	24664		
t-verdi		2,343	157,0
p-verdi		0,037	2,98×10 ⁻²¹
Nedre 95 % konfidensintervall		0,020	0,495
Øvre 95 % konfidensintervall		0,552	0,509

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=157,0$ og $p\lll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 2,343 og p-verdien på 0,037 at skjæringspunktet også er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,020 til 0,552) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (24664) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

Residualplottet er vist i Figur 13.

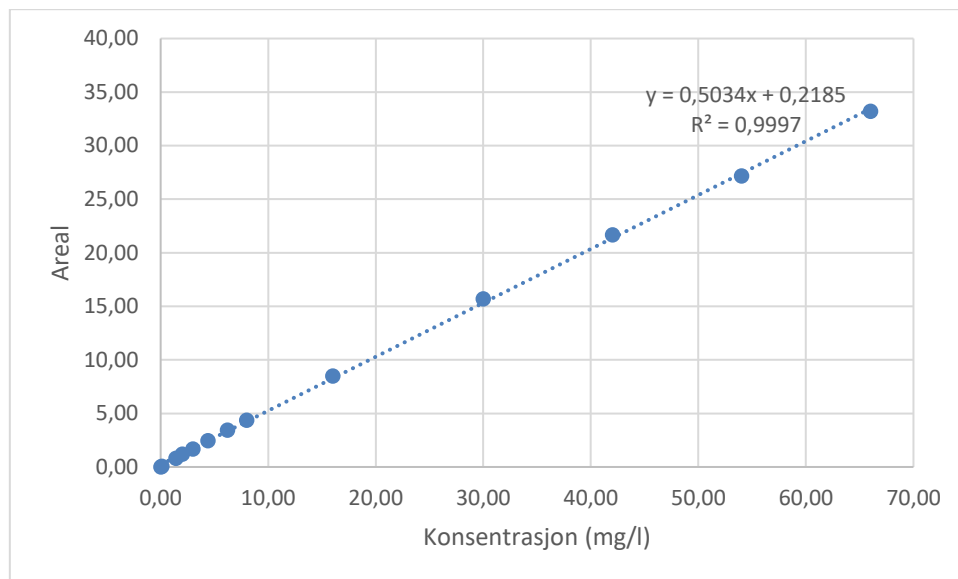


Figur 13 Residualplott for tyramin (øvre måleområde).

Som for nedre måleområde viser residualplottet antydning til en ikke-lineær respons. Dette er som nevnt diskutert videre i kapittel 2.3.5.

Hele måleområdet

Figur 14 viser regresjonslinjen for tyramin i hele måleområdet.



Figur 14 Regresjonslinje for tyramin (hele måleområdet).

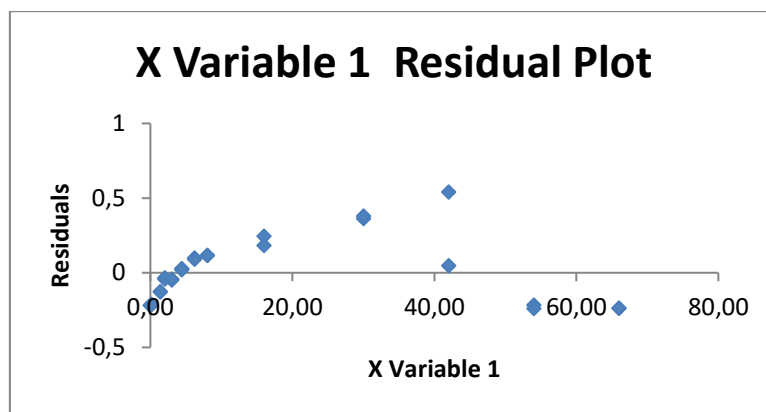
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9997. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 13.

Tabell 13 Regresjonsstatistikk for tyramin (hele måleområdet).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	26		
R^2 -verdi	0,9997		
F-verdi	64925		
t-verdi		3,924	254,8
p-verdi		0,001	$1,04 \times 10^{-42}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,104	0,499
Øvre 95 % konfidensintervall		0,333	0,507

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=254,8$ og $p \lll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 3,924 og p-verdien på 0,001 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,104 til 0,333) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (64925) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

Residualplottet er vist i Figur 15.

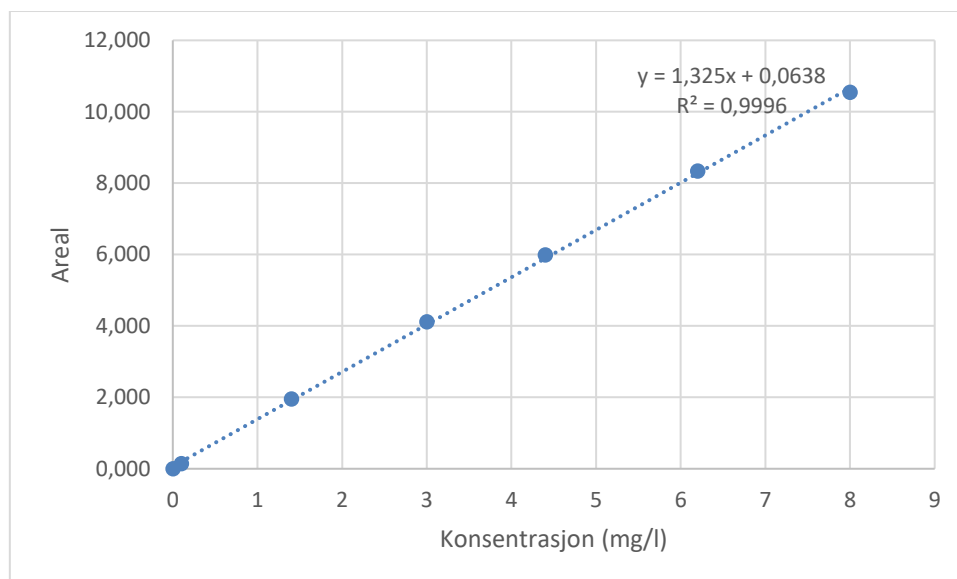


Figur 15 Residualplott for tyramin (hele måleområdet).

2.3.2 Putrescin

Nedre måleområde

Figur 16 viser regresjonslinjen for putrescin i nedre måleområde.



Figur 16 Regresjonslinje for putrescin (nedre måleområde).

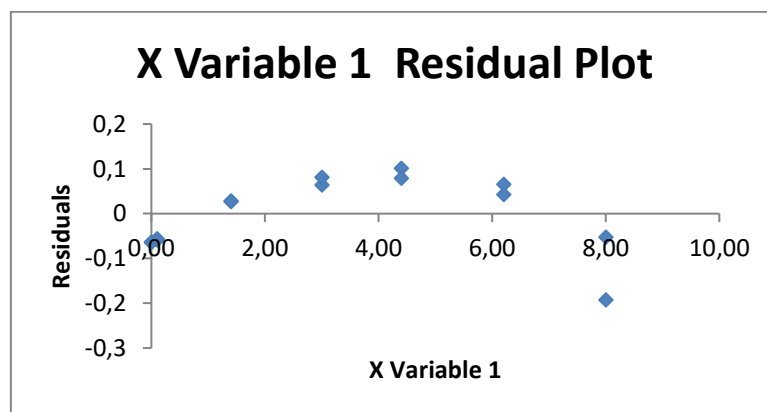
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9996. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 14.

Tabell 14 Regresjonsstatistikk for putrescin (nedre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9996		
F-verdi	26688		
t-verdi		1,807	163,4
p-verdi		0,096	$1,86 \times 10^{-21}$
Nedre 95 % konfidensintervall		-0,013	1,307
Øvre 95 % konfidensintervall		0,141	1,343

Stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=163,4$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 1,807 og p-verdien på 0,096 at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (-0,013 til 0,141) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (26688) styrker argumentet om at regresjonen er berettiget.

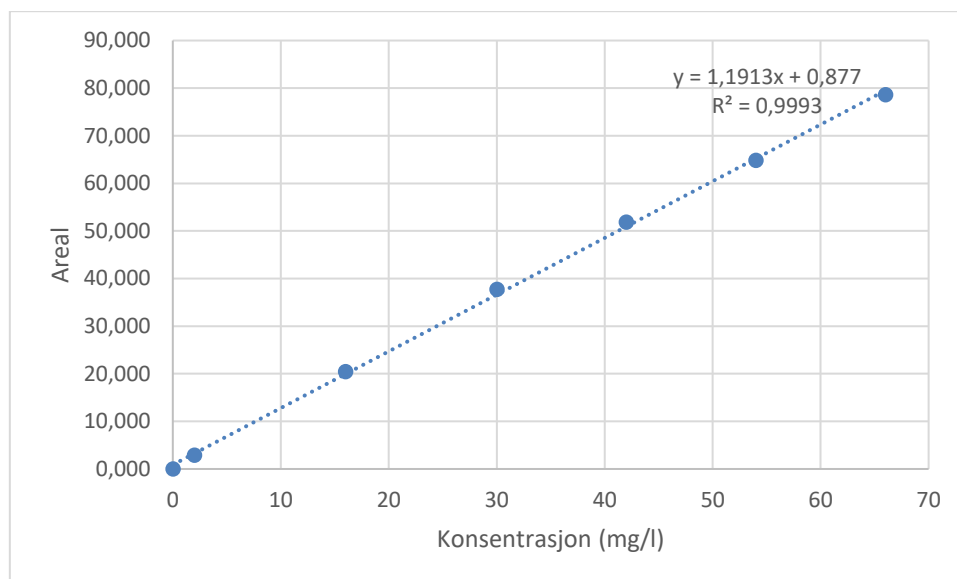
Residualplottet for putrescin er vist i Figur 17.



Figur 17 Residualplott for putrescin (nedre måleområde).

Øvre måleområde

Figur 18 viser regresjonslinjen for putrescin i øvre måleområde.



Figur 18 Regresjonslinje for putrescin (øvre måleområde).

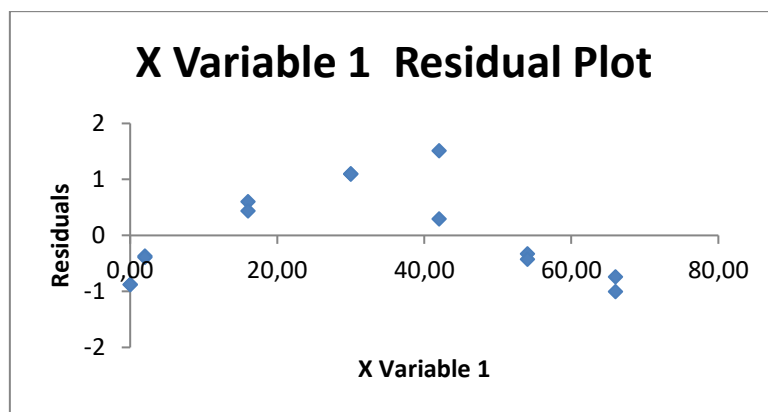
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9995. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 15.

Tabell 15 Regresjonsstatistikk for putrescin (øvre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9993		
F-verdi	14718		
t-verdi		2,340	121,3
p-verdi		0,037	$6,60 \times 10^{-20}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,060	1,170
Øvre 95 % konfidensintervall		1,693	1,213

Som vist er stigningstallet signifikant forskjellig fra null med $t=121,3$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 2,340 og p-verdien på 0,037 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,060 til 1,693) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (14718) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

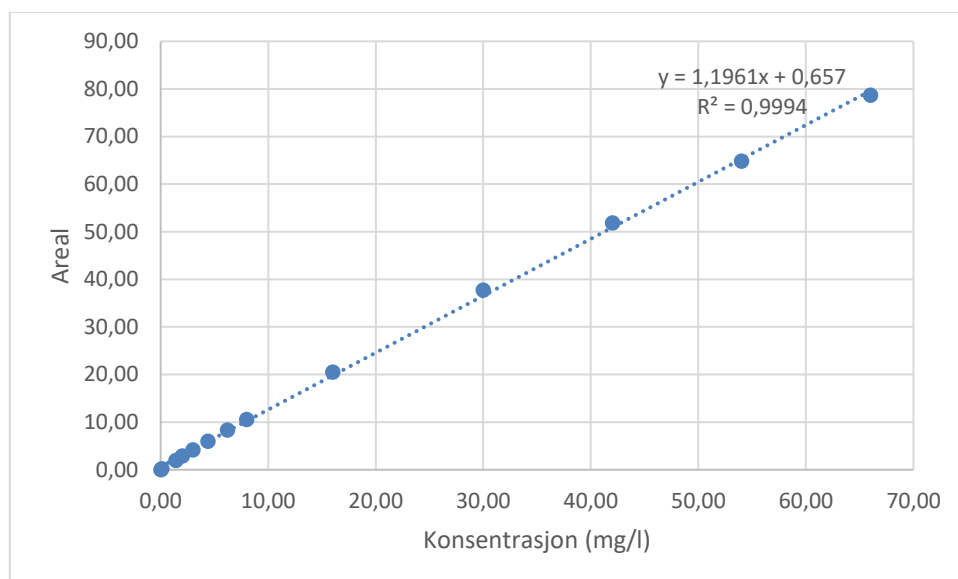
Residualplottet er vist i Figur 19.



Figur 19 Residualplott for putrescin (høyt nivå).

Hele måleområdet

Figur 20 viser regresjonslinjen for putrescin i hele måleområdet.



Figur 20 Regresjonslinje for putrescin (hele måleområdet).

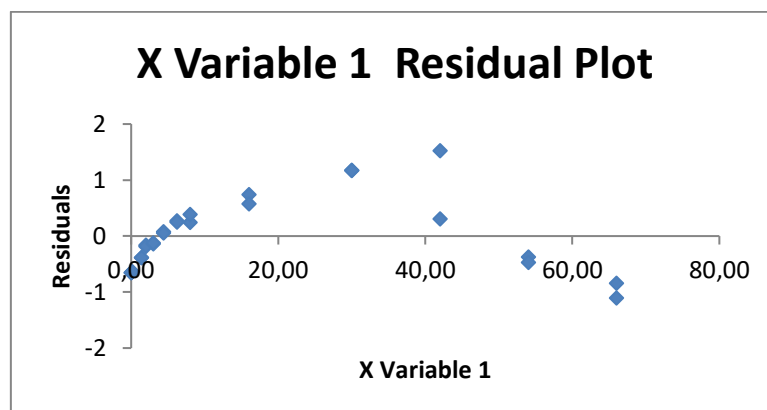
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9994. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 16.

Tabell 16 Regresjonsstatistikk for putrescin (hele måleområdet).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	26		
R^2 -verdi	0,9994		
F-verdi	39190		
t-verdi		3,858	198,0
p-verdi		0,001	$4,45 \times 10^{-40}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,306	1,184
Øvre 95 % konfidensintervall		1,009	1,209

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=198,0$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 3,858 og p-verdien på 0,001 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,306 til 1,009) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (39190) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

Residualplottet er vist i Figur 21.

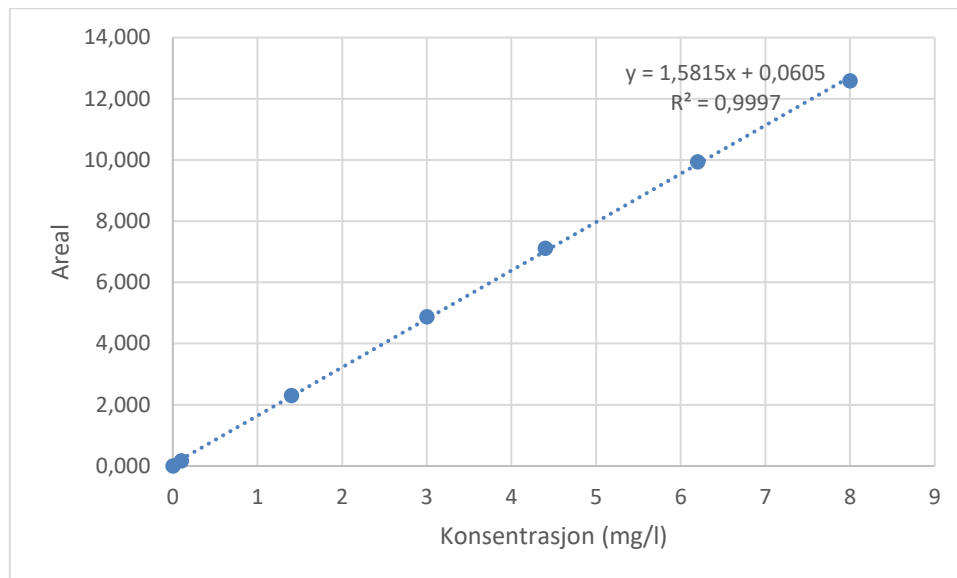


Figur 21 Residualplott for putrescin (hele måleområdet).

2.3.3 Cadaverin

Nedre måleområde

Figur 22 viser regresjonslinjen for cadaverin i nedre måleområde.



Figur 22 Regresjonslinje for cadaverin (nedre måleområde).

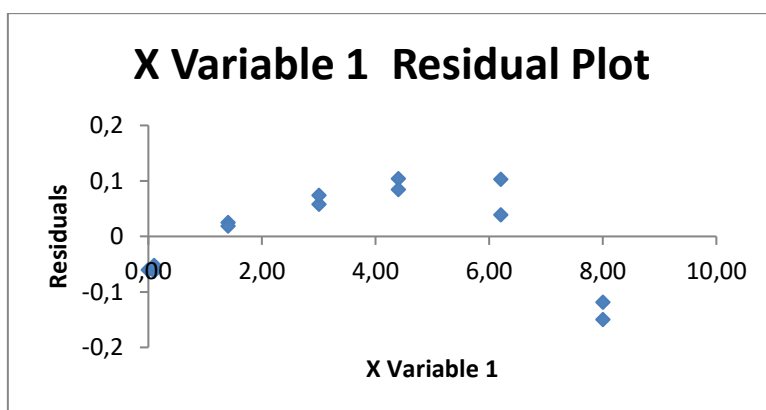
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9997. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 17.

Tabell 17 Regresjonsstatistikk for cadaverin (nedre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9997		
F-verdi	37620		
t-verdi		1,704	194,0
p-verdi		0,114	$2,37 \times 10^{-22}$
Nedre 95 % konfidensintervall		-0,017	1,564
Øvre 95 % konfidensintervall		0,138	1,599

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=194,0$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 1,704 og p-verdien på 0,114 at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet -0,017 til 0,138) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (37620) styrker også argumentet om at regresjonen er berettiget.

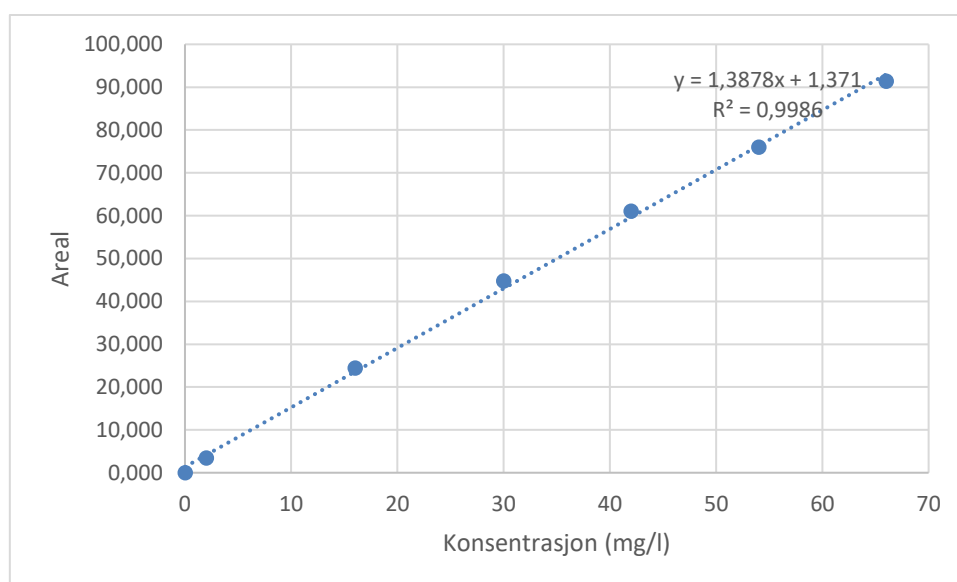
Residualplottet for cadaverin er vist i Figur 23.



Figur 23 Residualplott for cadaverin (lavt nivå).

Øvre måleområde

Figur 24 viser regresjonslinjen for cadaverin i øvre måleområde.



Figur 24 Regresjonslinje for cadaverin (øvre måleområde).

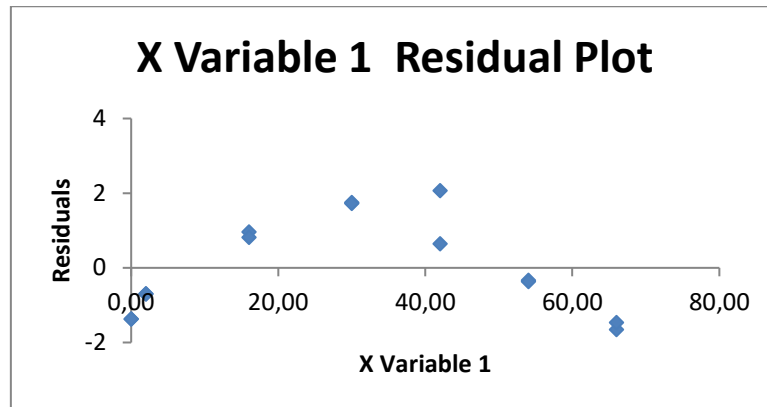
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9986. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 18.

Tabell 18 Regresjonsstatistikken for cadaverin (øvre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9986		
F-verdi	8120		
t-verdi		2,333	90,1
p-verdi		0,037	$2,33 \times 10^{-18}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,090	1,354
Øvre 95 % konfidensintervall		2,652	1,421

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=90,1$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t -verdien på 2,333 og p -verdien på 0,037 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,090 til 2,652) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F -verdi (8120) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

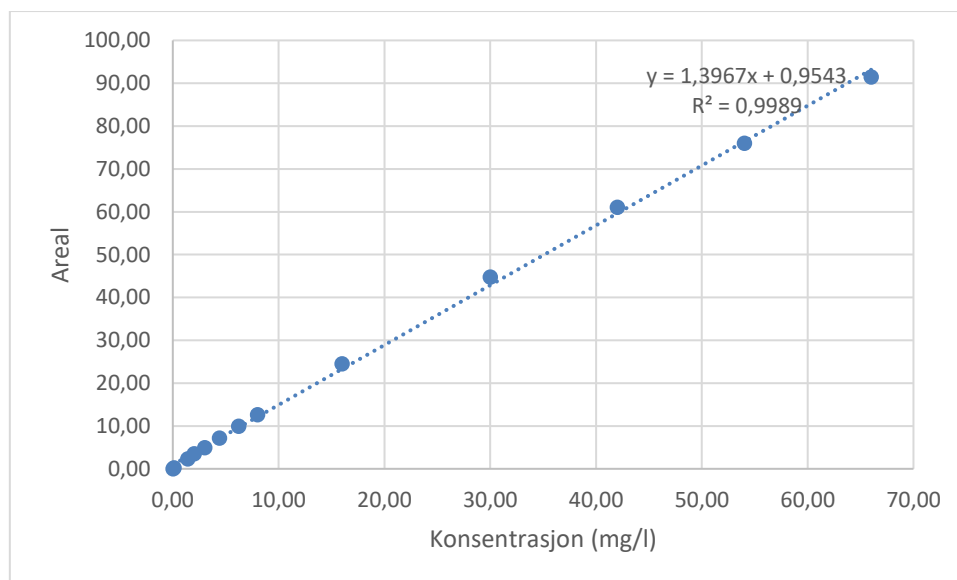
Residualplottet for cadaverin er vist i Figur 25.



Figur 25 Residualplott for cadaverin (øvre måleområde).

Hele måleområdet

Figur 26 viser regresjonslinjen for cadaverin i hele måleområdet.



Figur 26 Regresjonslinje for cadaverin (hele måleområdet).

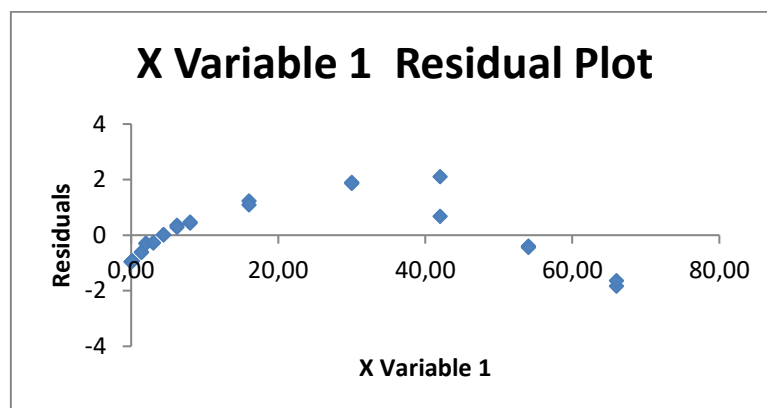
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9989. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 19.

Tabell 19 Regresjonsstatistikk for cadaverin (hele måleområdet).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	26		
R^2 -verdi	0,9989		
F-verdi	21838		
t-verdi		3,582	147,8
p-verdi		0,002	$4,94 \times 10^{-37}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,404	1,378
Øvre 95 % konfidensintervall		1,504	1,416

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=147,8$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 3,582 og p-verdien på 0,002 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,404 til 1,504) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (21838) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

Residualplottet er vist i Figur 27.

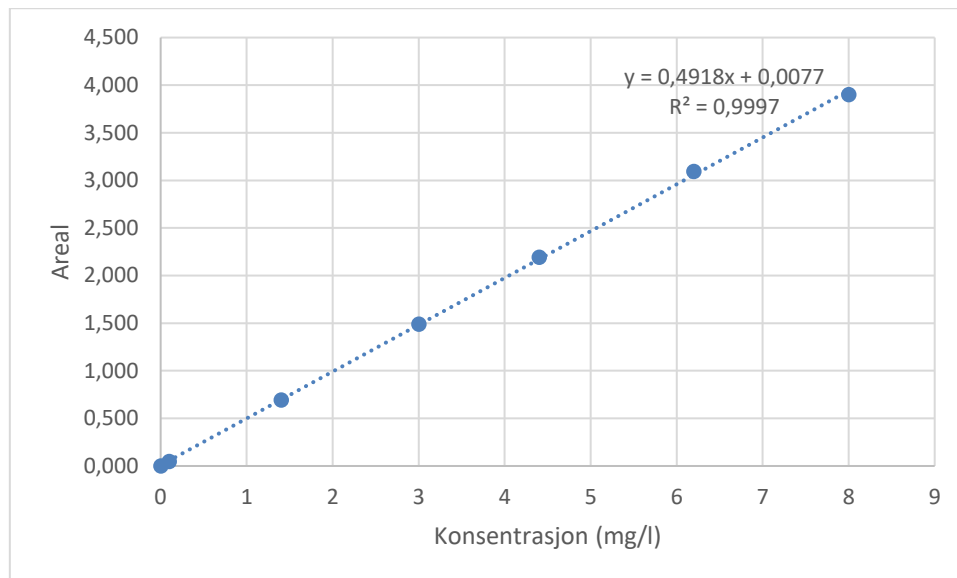


Figur 27 Residualplott for cadaverin (hele måleområdet).

2.3.4 Histamin

Nedre måleområde

Figur 28 viser regresjonslinjen for histamin i nedre måleområde.



Figur 28 Regresjonslinje for histamin (nedre måleområde).

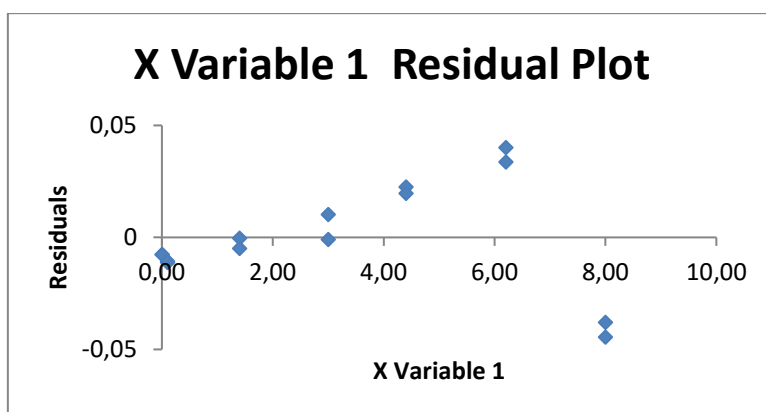
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9997. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 20.

Tabell 20 Regresjonsstatistikken for histamin (nedre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9997		
F-verdi	43600		
t-verdi		0,746	208,8
p-verdi		0,470	$9,79 \times 10^{-23}$
Nedre 95 % konfidensintervall		-0,015	0,487
Øvre 95 % konfidensintervall		0,030	0,497

Stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=208,8$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 0,746 og p-verdien på 0,470 at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (-0,015 til 0,030) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (43600) styrker argumentet om at regresjonen er berettiget.

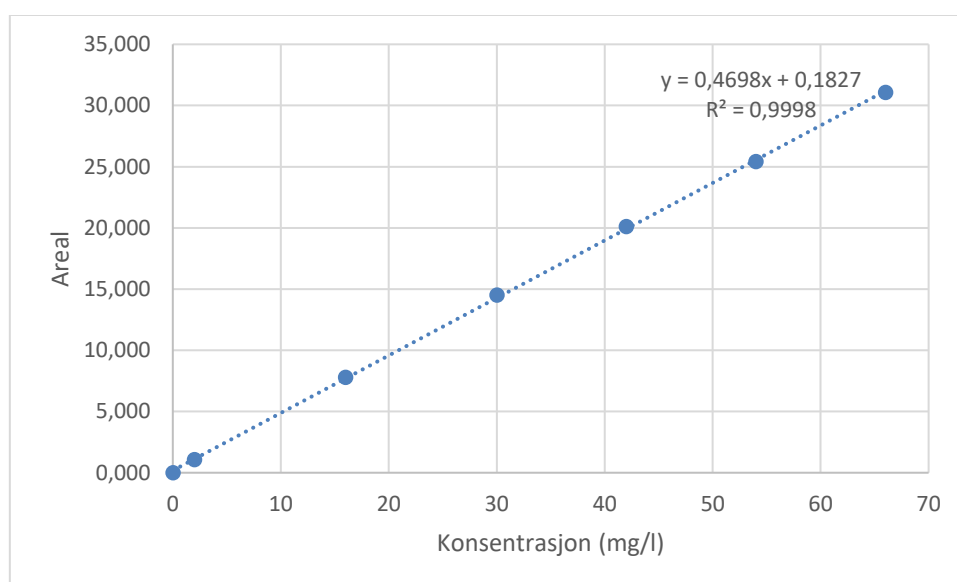
Residualplottet for cadaverin er vist i Figur 29.



Figur 29 Residualplott for histamin (lavt nivå).

Øvre måleområde

Figur 30 viser regresjonslinjen for histamin i øvre måleområde.



Figur 30 Regresjonslinje for histamin (øvre måleområde).

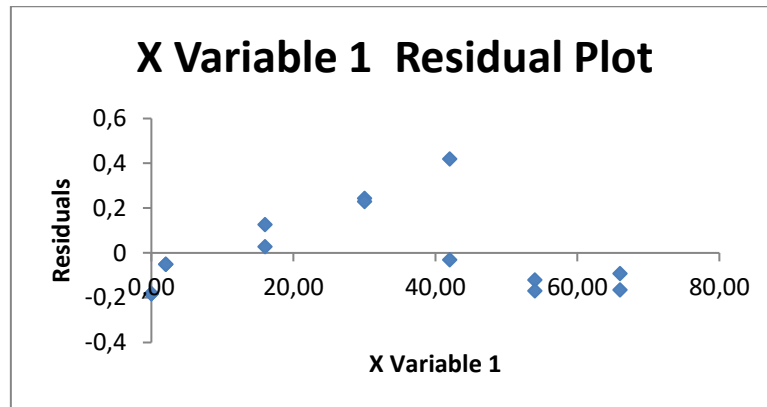
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9998. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 21.

Tabell 21 Regresjonsstatistikken for histamin (øvre måleområde).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	14		
R^2 -verdi	0,9998		
F-verdi	45257		
t-verdi		2,167	212,7
p-verdi		0,051	$7,83 \times 10^{-23}$
Nedre 95 % konfidensintervall		-0,001	0,465
Øvre 95 % konfidensintervall		0,366	0,475

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=212,7$ og $p\lll 0,05$. For skjæringspunktet viser t -verdien på $2,167$ og p -verdien på $0,051$ at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet $-0,001$ til $0,366$) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F -verdi (45257) styrker også argumentet om at regresjonen er berettiget.

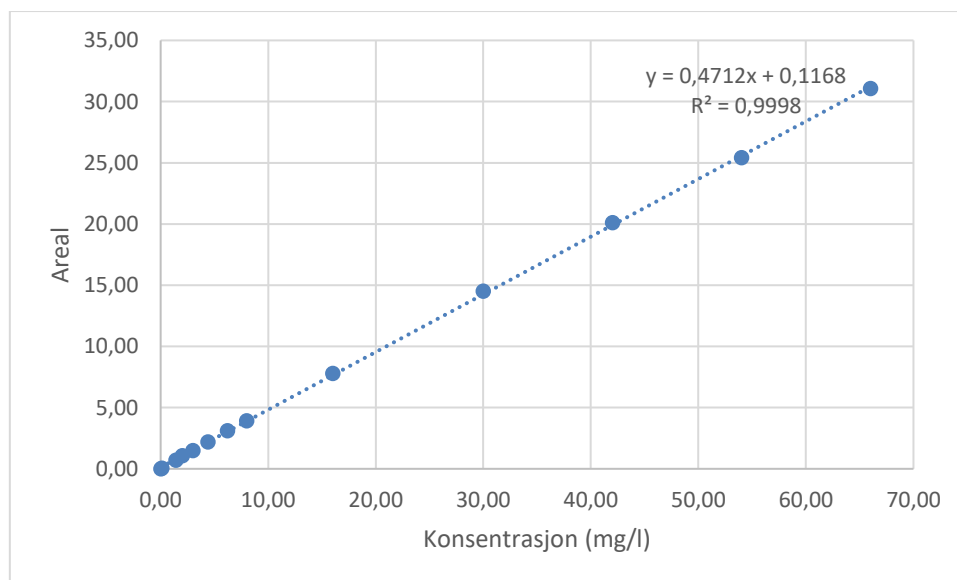
Residualplottet for histamin er vist i Figur 31.



Figur 31 Residualplott for histamin (øvre måleområde).

Hele måleområdet

Figur 32 viser regresjonslinjen for histamin i hele måleområdet.



Figur 32 Regresjonslinje for histamin (hele måleområdet).

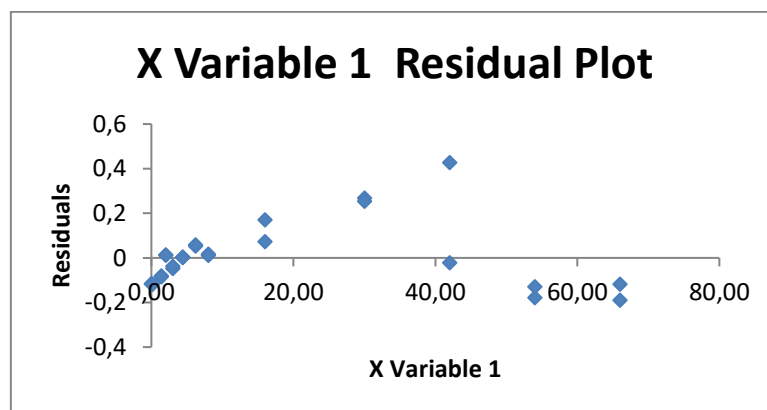
Regresjonslinjen har en R^2 -verdi på 0,9998. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 22.

Tabell 22 Regresjonsstatistikk for histamin (hele måleområdet).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	26		
R^2 -verdi	0,9998		
F-verdi	123371		
t-verdi		3,088	351,2
p-verdi		0,005	$4,72 \times 10^{-46}$
Nedre 95 % konfidensintervall		0,039	0,468
Øvre 95 % konfidensintervall		0,195	0,474

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med $t=351,2$ og $p \ll 0,05$. For skjæringspunktet viser t-verdien på 3,088 og p-verdien på 0,005 at skjæringspunktet er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet (0,039 til 0,195) ser man at null ikke er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi (123371) styrker derimot argumentet om at regresjonen er berettiget.

Residualplottet er vist i Figur 33.



Figur 33 Residualplott for histamin (hele måleområdet).

2.3.5 Oppsummering

Punktene fra residualplottene er ikke tilfeldig fordelt rundt x-aksen, og dette indikerer en ikke-lineær respons. Størrelsen på residualene er derimot små, relativt til presisjonen for metoden. Residualet for standarden på 42,0 mg/l er noe høyere enn for de andre, men det er ingen observasjoner i kromatogrammet eller lignende som forklarer hvorfor dette residualet er høyere, og det er ikke grunnlag for å utelate noen av parallellene. Basert på at residualene er så små, velger vi å se bort fra ikke-linearitet, fordi eventuelle korrigeringer som gjøres ved for eksempel å bruke polynom kalibreringskurve ikke vil påvirke resultatene nevneverdig.

For nedre måleområde støtter regresjonsstatistikken en lineær respons. Her er det bare residualplottet som viser et ikke-lineært utseende. For øvre måleområde samt hele måleområdet sett under ett taler både noe av regresjonsstatistikken og residualplottene for at det kanskje er en ikke-lineær respons. Dersom man beregner avviket (i %) fra standardkonsentrasjonen og konsentrasjonen beregnet fra kalibreringskurvene i de foregående figurene ser man at avvikene er svært små. Dette er vist i Tabell V. 22 og Tabell V. 23, vedlegg 4. Avviket er 0 til 2 % for konsentrasjonene mellom 1,40 og 8,00 mg/l. For konsentrasjonene mellom 16,00 og 66,00 mg/l er avviket på 0 til 4 %. Hvis man ser på hele måleområdet under ett, som vist i Tabell V. 24, så er avviket 0 til 7 % for konsentrasjonene mellom 3,0 og 66,0 mg/l. Avviket er naturlig nok noe høyere når konsentrasjonen nærmer seg null. Dette viser at selv om kurvene skulle ha en ikke-lineær respons, så ville det utgjøre svært lite for den endelige konsentrasjonen i prøven, og det har liten betydning for riktigheten av analysen.

Det skal også nevnes at når man gjør regresjonsanalyse og regresjonsstatistikk så antar man at konsentrasjonen i løsningen er korrekt. Man tar altså ikke hensyn til måleusikkerheten i tillagingen av standardløsningene, selv om man benytter både pipetter og målekolber til fortykning. Det kan også nevnes at metoden ikke bruker ekstern kalibreringskurve, men intern standard med beregning av responsfaktor. Det tilsettes 1 ml intern standard (100 mg/ml) i alle prøvetyper bortsett fra fisk, der tilsettes det 0,25 ml. Disse små avvikene fra linearitet som er observert vil derfor ikke påvirke riktigheten av analysen i nevneverdig grad. Det konkluderes med at lineariteten til instrumentet/metoden er god nok.

3 Konklusjon

Basert på denne valideringen, de statistiske beregninger som er foretatt og de vurderinger som er gjort er instrumentet godkjent for bruk til analyse av biogene aminer (BIOLAB-metode A55). Analyse av to tidligere analyserte ringtestprøver viste at forskjellene mellom nytt og gammelt instrument var små, og ikke mer enn man kan forvente at analytter som endrer seg noe over tid. Analyse av kontrollprøven viste at alle verdiene lå i det godkjente området av kontrollkortet. Det var noe forskjell på variansen mellom nytt og gammelt instrument for tyramin og putrescin, men dette er som forventet da resultatene på ny HPLC var analysert over kun to dager, og viste svært liten spredning. Presisjonen var som antatt bedre for det nye instrumentet med unntak av for cadaverin og histamin. For cadaverin er det litt forskjell på de to dagene på ny HPLC som gjør at presisjonen blir noe dårligere enn for gammel HPLC. Litt dårligere presisjon for histamin skyldes nok at dette er den minste toppen i kromatogrammet og at variasjonen i integrering er noe større for dette aminet. Over tid forventes det at presisjonen er omtrent som for det gamle instrumentet siden det var noe ulike betingelser for presisjonsberegningene. Lineariteten viser tegn til ikke-lineær respons, særlig i det øvre måleområdet. Avviket fra linearitet er derimot så lite at lineariteten vurderes som god nok. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser fra og med 13. november 2020.

4 Referanser

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance), Official Journal of the European Union L 338/1, 22.12.2005, p. 1-26

Douglas A. Skoog, D. M. W., F. James Holler, Stanley R. Crouch (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry. USA, Thomson Learning, Inc.

ISO (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 6: Use in practice of accuracy values (ISO 5725-6), ISO (International Organization for Standardization): 41.

ISO (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons (ISO 13528), ISO (International Organization for Standardization): 66.

NMKL (2009). NMKL-Prosedyre nr. 4 - Validering av kjemiske analysemetoder, NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler): 46.

VEDLEGG

Vedlegg 1 - Valideringsplan	ii
Vedlegg 2 – Riktighet	iv
Vedlegg 3 – Presisjon	vii
Vedlegg 4 – Linearitet	xi

Vedlegg 1 Valideringsplan

<p>Nytt HPLC instrumentet fra Agilent erstatter et HPLC system fra Perkin Elmer (Series 200), som frem til nå har vært brukt til metode A55 Biogene aminer.</p>	
Analysemetode	A 55 Biogene aminer
Metodeansvarlig	Bente Asbjørnsen
Metodereferanse	Intern metode, basert på IFOMA (RESEARCH REPORT NUMBER: 2000-3 September 2000) NMKL 200 Histamin. HPLC-bestemmelse med post-kolonne derivatisering og fluorescensdeteksjon i fisk og fiskeprodukter.
Prøvetype (matrise)	Fôr, fisk og fôringredienser.
Måleområde	2,0-100 mg/kg (fisk) 100-3000 mg/kg (fôr, fôringredienser)
Grad av ekstern validering	Metoden er eksternt validert i en kollaborativ metodeavprøving
Valideringsomfang	Verifisering av riktighet og presisjon til nytt HPLC system for analyse av biogene aminer.
Bakgrunn	<p>I dag brukes et Perkin Elmer Series 200 HPLC-system til analyse av biogene aminer. Det er en metode der fire ulike biogene aminer separeres på en C18-kolonne og detekteres med fluorescensdeteksjon. Systemet har to pumper, der den ene brukes til å pumpe derivatiseringsreagens inn på en T-kobling etter kolonnen (post-kolonne derivatisering).</p> <p>Det er en internstandard metode.</p> <p>HPLC-systemet er gammelt, og det finnes begrenset med reservedeler. I tillegg har det vært mye tekniske problemer med utstyret de siste månedene. Det har gjort at prøveserier har blitt avbrutt pga. kommunikasjonsproblemer mellom HPLC og Chromeleon. I tillegg har det vært problemer med autosampleren.</p> <p>Dette er bakgrunnen for at Biolab nå kjøper en ny HPLC som skal brukes til denne analysen.</p> <p>Den nye HPLC-systemet er fra Agilent og er levert av Matriks. Biolab har tre HPLC'er fra Agilent allerede.</p>
Risikovurdering. Hvordan vil bytte av HPLC påvirke analysemetoden.	<p>Metoden er en internstandardmetode. Dette gjør metoden robust. Prøveopparbeidingen skal ikke endres. I tillegg skal kolonnen, der separasjonen av aminene foregår, ikke byttes. Softwaren, Chromeleon, der alle beregninger utføres, skal heller ikke byttes. Pumpen som pumper derivatiseringsreagens skal også være som i dag.</p> <p><u>1. Ny autosampler.</u> Volumet av injisert prøve skal ikke endres (20 µl). Allikevel vil ikke to ulike autosamlere være 100 % identiske. Dette påvirker ikke analysemetoden, siden standard og prøver er tilsatt intern standard.</p> <p><u>2. Ny pumpe.</u> Pumpen skal pumpe eluentene gjennom systemet. Det er et gradientprogram med tre ulike eluenter. Gradientprogrammet ligger i Chromeleon og skal ikke endres. Små endringer i blanding av eluenter og flow pga. ny pumpe, kan endre separasjonen av toppene. Det er i dag god separasjon av de ulike aminene og intern standarden, så dette burde ikke bli et problem. Dette må uansett observeres og vurderes.</p> <p><u>3. Ny fluorescensdetektor</u> Emisjons- og eksitasjonsbølgelengden skal ikke endres. Lampeintensiteten i gammel og ny detektor vil være ulike. Siden prøvene er tilsatt intern standard, vil ikke dette ha noen betydning.</p>

		En serviceingeniør fra Matriks skal installere HPLCen. I tillegg skal John Breidablikk fra Nerliens (leverandør av Chromeleon) bistå i arbeidet med oppkobling av HPLC systemet til Chromeleon.		
	Valideringspunkt	Aktivitet og krav	Utføres av	Tidsplan
1	Riktighet	<p>1. Analyse av kontrollprøve. Riktighet testes ved å analysere KP 20 ganger. Krav: Godkjent resultat etter vanlige regler for KP. Data brukes også til beregning av presisjon.</p> <p>2. Ringtestprøver. To tidligere ringtestprøver analyseres (kun to ringtestprøver tilgjengelig på prøvelageret). Dette er 2019-935-01 (melprøve) og 2020-1617-01 (melprøve). Krav: Godkjent E_n-verdi ved plotting i kontrollkort for ringtest. PS: Noe avvik kan forventes pga. endringer av analyttene over tid.</p>	BA	Juli 2020
2	Presisjon	<p>Analyse av KP brukes til beregning av presisjon. Siste 20 verdier av KP på gammel HPLC sammenlignes med tall fra ny HPLC. Krav: Minst like god presisjon som for gammelt instrument.</p>	BA	Juli 2020
3	Linearitet	<p>Pga. stort spenn i måleområde deles det opp i nedre og øvre måleområde ved sjekk av linearitet. Det lages 6 standarder for hvert måleområde + blank. Pga. lang run time injiseres hver standardløsning kun to ganger. Standardene må være jevnt fordelt og dekke måleområdet $\pm 10\%$. Det gjøres regresjonsanalyse og beregnes regresjonsstatistikk. Krav: Linearitet ivaretatt i hele måleområdet.</p>	BA	Sept. 2020
4	Rapport	Sammenfatte valideringsrapport	GUHO	Okt. 2020

Vedlegg 2 Riktighet

Tabell V. 1 De tre siste ringtestresultatene for tyramin (resultater i mg/kg).

Ringtestarrangør	LVU	LVU	LVU
Prøvenummer	16-3273-1 (16)	08092-01 (18)	05423-01 (2019)
Prøvetype	Fish paste	Fish paste	Fish paste
Dato	09.08.16	12.12.18	17.09.19
Analytiker	KS	KS	NOHE
Resultat, Nofima	60,25	31,70	164,00
u_{Nofima}	7,83	4,12	16,40
Middelverdi	56,3	30,3	159,6
Antall deltakere	17	20	15
u_{SLP}	4,43	6,15	14,95
Z-score	0,892	0,228	0,294
Zeta-score	0,439	0,189	0,198
E_n -verdi	0,250	0,161	0,131

Tabell V. 2 De 10 siste ringtestresultatene for putrescin (resultater i mg/kg).

Ringtestarrangør	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab
Prøvenummer	1385-01	3861-01 (17)	0916-1 (No 2)	0918-1 (No 4)	08092-01 (18)	No 2	No 4	05423-01 (2019)	01617-01 (No 2-90)	01613-01 (4-23)
Prøvetype	Fiskefilet	Fish paste	Fish meal	Fish flesh	Fish paste	Fish meal	Fisk	Fish paste	Fiskemel	Fisk
Dato	19.04.17	14-15.09.17	19.02.18	18.04.18	12.12.18	21.03.19	21.03.19	17.09.19	01.04.20	01.04.20
Analytiker	?	KS	BA	BA	KS	?	?	NOHE	?	?
Resultat, Nofima	3,14	64,45	380,00	11,00	60,25	995	5	137,5	241	29,9
u_{Nofima}	0,31	6,45	28,50	1,10	6,03	74,625	0,5	10,3125	18,075	2,99
Middelverdi	28,56	61,4	405	22	61,8	1026	7	121,2	255	34,95
Antall deltakere	6	14	6	4	20	7	3	17	14	7
u_{SLP}	38,688	6,49	38	31	10,76	84	6	22,25	77	8,46
Z-score	-0,657	0,470	-0,658	-0,355	-0,144	-0,369	-0,333	0,733	-0,182	-0,597
Zeta-score	-0,657	0,333	-0,526	-0,355	-0,126	-0,276	-0,332	0,665	-0,177	-0,563
E_n -verdi	-0,805	0,228	-0,385	-0,354	-0,119	-0,191	-0,286	0,700	-0,256	-0,577

Tabell V. 3 De ti siste ringtestresultatene for cadaverin (resultater i mg/kg).

Ringtest-arrangør	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab
Prøve-nummer	1385-01	3861-01 (17)	0916-1 (No 2)	0918-1 (No 4)	08092-01 (18)	No 2	No 4	05423-01 (2019)	01617-01 (No 2-90)	01613-01 (4-23)
Prøvetype	Fiskefilet	Fish paste	Fish meal	Fish flesh	Fish paste	Fish meal	Fisk	Fish paste	Fiskemel	Fisk
Dato	19.04.17	14-15.09.17	19.02.18	18.04.18	12.12.18	21.03.19	21.03.19	17.09.19	01.04.20	01.04.20
Analytiker	?	KS	BA	BA	KS			NOHE	?	?
Resultat, Nofima	24,18	217,50	620,00	280,00	94,40	1675	1	454	486	101,7
u _{Nofima}	2,42	16,31	46,50	21,00	9,44	125,625	0,1	34,05	36,45	7,6275
Middel-verdi	111,63	232	687	297	96,9	1806	8	403,1	495	113,09
Antall deltakere	6	17	6	4	20	7	7	17	14	7
u _{SLP}	114,85	33,91	65	73	7,94	187	6	42,4	137	30,8
Z-score	-0,761	-0,428	-1,031	-0,233	-0,315	-0,701	-1,167	1,200	-0,066	-0,370
Zeta-score	-0,761	-0,385	-0,838	-0,224	-0,203	-0,582	-1,167	0,936	-0,063	-0,359
E _n -verdi	-0,931	-0,397	-0,626	-0,202	-0,130	-0,454	-1,542	0,716	-0,087	-0,409

Tabell V. 4 De ti siste ringtestresultatene for histamin (resultater i mg/kg).

Ringtest-arrangør	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab	LVU	M-lab	M-lab
Prøve-nummer	1385-01	3861-01 (17)	0916-1 (No 2)	0918-1 (No 4)	08092-01 (18)	No 2	No 4	05423-01 (2019)	01617-01 (No 2-90)	01613-01 (4-23)
Prøvetype	Fiskefilet	Fish paste	Fish meal	Fish flesh	Fish paste	Fish meal	Fisk	Fish paste	Fiskemel	Fisk
Dato	19.04.17	14-15.09.17	19.02.18	18.04.18	12.12.18	21.03.19	21.03.19	17.09.19	01.04.20	01.04.20
Analytiker	?	KS	BA	BA	KS	???	??	NOHE	?	?
Resultat, Nofima	4,00	494,00	1024,00	257,00	93,10	485	0	291	32	<20
u _{Nofima}	0,52	49,40	102,40	25,70	12,10	48,5	0	29,1	4,16	
Middel-verdi	45,812	543	1079	234	100	482	6	265,8	59	<20
Antall deltakere	7	21	9	5	24	9	8	20	16	5
u _{SLP}	74,382	93,83	66	60	18,62	47	6	29,78	42	
Z-score	-0,562	-0,522	-0,833	0,383	-0,371	0,064	-1,000	0,846	-0,643	
Zeta-score	-0,562	-0,462	-0,451	0,352	-0,311	0,044	-1,000	0,605	-0,640	
E _n -verdi	-0,743	-0,458	-0,263	0,310	-0,272	0,029	-1,414	0,422	-1,195	

Tabell V. 5 Analyse av kontrollprøven på ny HPLC (resultater i mg/kg).

Dato	26.05.20										05.07.20									
Signatur	BA																			
Tyramin	60,8	60,9	60,6	60,7	59,7	59,7	60,2	59,9	59,7	59,5	58,8	58,8	58,9	61,0	58,2	57,8	58,8	58,0	56,6	58,0
Putrescin	136,3	136,3	134,7	136,0	132,9	133,0	134,0	133,2	132,5	132,5	134,5	133,4	132,7	133,9	132,7	132,7	133,4	132,8	132,4	132,6
Cadaverin	468,0	467,4	462,7	468,7	459,9	461,0	463,5	462,3	461,5	461,1	485,6	483,6	482,5	486,0	484,2	484,9	485,3	486,1	483,6	484,8
Histamin	23,7	22,9	25,1	23,2	23,2	23,0	23,4	25,2	23,0	23,3	23,5	21,8	22,3	24,5	23,6	21,8	22,3	21,9	21,5	20,4

Vedlegg 3 Presisjon

Tabell V. 6 Beregning av presisjon for tyramin på gammel HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
18.06.2020	58,570	58,660
22.06.2020	57,411	56,260
28.06.2020	57,297	58,518
01.07.2020	58,474	58,379
06.07.2020	55,921	54,490
10.07.2020	57,586	56,485
21.07.2020	56,678	56,053
03.08.2020	65,911	67,377
04.08.2020	59,859	58,543
17.08.2020	54,620	54,570

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	58,08	S_r (standardavvik)	1,01
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	2,83

Tabell V. 7 Beregning av presisjon for putrescin på gammel HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
18.06.2020	135,345	134,850
22.06.2020	134,130	131,949
28.06.2020	136,846	139,268
01.07.2020	139,487	136,756
06.07.2020	136,286	135,318
10.07.2020	142,001	138,153
21.07.2020	139,265	137,852
03.08.2020	132,939	130,866
04.08.2020	141,741	140,458
17.08.2020	131,520	131,800

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	136,34	S_r (standardavvik)	3,44
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	9,64

Tabell V. 8 Beregning av presisjon for cadaverin på gammel HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
18.06.2020	496,750	493,700
22.06.2020	494,904	489,383
28.06.2020	493,372	492,391
01.07.2020	507,325	502,051
06.07.2020	491,994	488,807
10.07.2020	508,627	499,381
21.07.2020	500,632	497,440
03.08.2020	489,023	477,433
04.08.2020	513,440	511,197
17.08.2020	480,040	482,560

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	495,25	S_r (standardavvik)	9,89
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	27,68

Tabell V. 9 Beregning av presisjon for histamin på gammel HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
18.06.2020	21,750	22,160
22.06.2020	19,205	19,623
28.06.2020	19,920	19,327
01.07.2020	18,961	19,128
06.07.2020	19,659	19,149
10.07.2020	19,727	19,879
21.07.2020	20,473	21,029
03.08.2020	20,753	19,087
04.08.2020	19,143	18,467
17.08.2020	19,110	21,190

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	19,89	S_r (standardavvik)	1,01
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	2,83

Tabell V. 10 Beregning av presisjon for tyramin på ny HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
26.05.2020	60,826	60,879
26.05.2020	60,571	60,704
26.05.2020	59,671	59,737
26.05.2020	60,191	59,942
26.05.2020	59,689	59,453
05.07.2020	58,795	58,755
05.07.2020	58,892	60,972
05.07.2020	58,154	57,764
05.07.2020	58,803	58,036
05.07.2020	56,631	57,970

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	59,32	S_r (standardavvik)	1,21
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	3,40

Tabell V. 11 Beregning av presisjon for putrescin på ny HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
26.05.2020	136,286	136,309
26.05.2020	134,715	136,039
26.05.2020	132,868	132,966
26.05.2020	134,004	133,192
26.05.2020	132,472	132,532
05.07.2020	134,538	133,428
05.07.2020	132,685	133,902
05.07.2020	132,741	132,677
05.07.2020	133,399	132,789
05.07.2020	132,417	132,557

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	133,63	S_r (standardavvik)	1,30
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	3,64

Tabell V. 12 Beregning av presisjon for cadaverin på ny HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
26.05.2020	467,988	467,393
26.05.2020	462,731	468,671
26.05.2020	459,864	461,023
26.05.2020	463,511	462,296
26.05.2020	461,524	461,062
05.07.2020	485,568	483,557
05.07.2020	482,513	485,960
05.07.2020	484,192	484,854
05.07.2020	485,274	486,067
05.07.2020	483,607	484,768

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	474,12	S_r (standardavvik)	11,04
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	30,92

Tabell V. 13 Beregning av presisjon for histamin på ny HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat	Resultat
26.05.2020	23,697	22,922
26.05.2020	25,138	23,170
26.05.2020	23,196	23,011
26.05.2020	23,387	25,174
26.05.2020	22,984	23,280
05.07.2020	23,479	21,754
05.07.2020	22,260	24,509
05.07.2020	23,621	21,839
05.07.2020	22,304	21,899
05.07.2020	21,476	20,409

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	22,98	S_r (standardavvik)	1,20
Antall observasjoner (n):	20	$r = 2.8 * S_r$	3,35

Vedlegg 4 Linearitet

Nedre måleområde

Tabell V. 14 En oppsummering av arealer for tyramin ved analyse av standardløsning i ulike fortyninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
0,10	0,0562	0,0565	0,056	0,38
1,40	0,7958	0,7955	0,796	0,03
3,00	1,6791	1,6856	1,682	0,27
4,40	2,4616	2,4518	2,457	0,28
6,20	3,4372	3,4290	3,433	0,17
8,00	4,3235	4,3610	4,342	0,61

Tabell V. 15 En oppsummering av arealer for putrescin ved analyse av standardløsning i ulike fortyninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
0,10	0,1375	0,1402	0,139	1,38
1,40	1,9453	1,9471	1,946	0,07
3,00	4,1030	4,1201	4,112	0,29
4,40	5,9950	5,9726	5,984	0,26
6,20	8,3439	8,3215	8,333	0,19
8,00	10,4714	10,6113	10,541	0,94

Tabell V. 16 En oppsummering av arealer for cadaverin ved analyse av standardløsning i ulike fortyninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
0,10	0,1561	0,1663	0,161	4,47
1,40	2,2993	2,2932	2,296	0,19
3,00	4,8629	4,8787	4,871	0,23
4,40	7,1228	7,1034	7,113	0,19
6,20	9,9683	9,9048	9,937	0,45
8,00	12,5625	12,5937	12,578	0,18

Tabell V. 17 En oppsummering av arealer for histamin ved analyse av standardløsning i ulike fortynninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
0,10	0,0456	0,0462	0,046	0,92
1,40	0,6958	0,6912	0,694	0,47
3,00	1,4820	1,4932	1,488	0,53
4,40	2,1939	2,1911	2,193	0,09
6,20	3,0903	3,0967	3,094	0,15
8,00	3,9039	3,8974	3,901	0,12

Øvre måleområde

Tabell V. 18 En oppsummering av arealer for tyramin ved analyse av standardløsning i ulike fortynninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
2,00	1,1910	1,1827	1,187	0,49
16,00	8,5168	8,4543	8,486	0,52
30,00	15,6824	15,6990	15,691	0,07
42,00	21,9017	21,4076	21,655	1,61
54,00	27,1847	27,1607	27,173	0,06
66,00	33,0482	33,2034	33,126	0,33

Tabell V. 19 En oppsummering av arealer for putrescin ved analyse av standardløsning i ulike fortynninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
2,00	2,8871	2,8648	2,876	0,55
16,00	20,5365	20,3712	20,454	0,57
30,00	37,7169	37,7082	37,713	0,02
42,00	52,4196	51,2023	51,811	1,66
54,00	64,8729	64,7767	64,825	0,10
66,00	78,4936	78,7562	78,625	0,24

Tabell V. 20 En oppsummering av arealer for cadaverin ved analyse av standardløsning i ulike fortynninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
2,00	3,4546	3,4408	3,448	0,28
16,00	24,5331	24,3927	24,463	0,41
30,00	44,7573	44,7258	44,742	0,05
42,00	61,7279	60,2977	61,013	1,66
54,00	75,9804	75,9426	75,962	0,04
66,00	91,3096	91,5011	91,405	0,15

Tabell V. 21 En oppsummering av arealer for histamin ved analyse av standardløsning i ulike fortynninger.

Konsentrasjon (mg/l)	Areal 1	Areal 2	Areal, snitt	%RSD
0	0,0000	0,0000	0,000	0
2,00	1,0718	1,0718	1,072	0,00
16,00	7,8265	7,7281	7,777	0,89
30,00	14,5205	14,5069	14,514	0,07
42,00	20,3339	19,8849	20,109	1,58
54,00	25,4320	25,3832	25,408	0,14
66,00	31,0259	31,0984	31,062	0,17

Avvik fra observert verdi

Tabell V. 22 Avvik fra observert verdi (nedre måleområde).

Standard	Tyramin		Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)
0,00	-0,04	200	-0,05	200	-0,04	200	-0,02	200
0,10	0,06	-46	0,06	-55	0,06	-44	0,08	-25
1,40	1,42	1	1,42	1	1,41	1	1,39	0
3,00	3,04	1	3,05	2	3,04	1	3,01	0
4,40	4,46	1	4,47	2	4,46	1	4,44	1
6,20	6,25	1	6,24	1	6,24	1	6,27	1
8,00	7,91	-1	7,91	-1	7,92	-1	7,92	-1

*fra ligningen til standardkurven ($y=mx+b$)

Tabell V. 23 Avvik fra observert verdi (øvre måleområde).

Standard	Tyramin		Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)
0,00	-0,59	200	-0,74	200	-0,99	200	-0,39	200
2,00	1,78	-12	1,68	-18	1,50	-29	1,89	-6
16,00	16,34	2	16,43	3	16,64	4	16,16	1
30,00	30,72	2	30,92	3	31,25	4	30,50	2
42,00	42,62	1	42,76	2	42,98	2	42,41	1
54,00	53,63	-1	53,68	-1	53,75	0	53,69	-1
66,00	65,51	-1	65,27	-1	64,88	-2	65,73	0

*fra ligningen til standardkurven ($y=mx+b$)

Tabell V. 24 Avvik fra observert verdi (hele måleområdet).

Standard	Tyramin		Putrescin		Cadaverin		Histamin	
	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)	Beregnet kons.* (mg/l)	Avvik (%)
0,00	-0,43	200	-0,55	200	-0,68	200	-0,25	200
0,10	-0,32	380	-0,43	320	-0,57	286	-0,15	993
1,40	1,15	-20	1,08	-26	0,96	-37	1,22	-13
3,00	1,92	-4	1,86	-8	1,79	-11	2,03	1
4,40	2,91	-3	2,89	-4	2,80	-7	2,91	-3
6,20	4,45	1	4,45	1	4,41	0	4,41	0
8,00	6,39	3	6,42	3	6,43	4	6,32	2
16,00	8,23	3	8,26	3	8,32	4	8,03	0
30,00	16,42	3	16,55	3	16,83	5	16,26	2
42,00	30,74	2	30,98	3	31,35	4	30,55	2
54,00	42,58	1	42,77	2	43,00	2	42,43	1
66,00	53,55	-1	53,65	-1	53,70	-1	53,67	-1

*fra ligningen til standardkurven ($y=mx+b$)

