

Validering av metoden «NS-EN 12822:2014» for bestemmelse av vitamin E med væskekromatografi (HPLC)

Måling α -, β -, γ - og δ - tokoferol (BIOLAB A121 Tokoferolprofil)

Noora Heikintalo 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 metoden «NS-EN 12822:2014» for bestemmelse av vitamin E med væskekromatografi (HPLC) Måling α-, β-, γ- og δ-tokoferol (BIOLAB A121 Tokoferolprofil)</p>	ISBN 978-82-8296-680-1 (pdf) ISSN 1890-579X
<p><i>Title:</i> Validation of the method "NS-EN 12822:2014" for the determination of vitamin E by high performance liquid chromatography (HPLC) (BIOLAB A121 Tokoferolprofil)</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 16/2021</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Noora Heikintalo og Bente Asbjørnsen</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> åpen</p>
<p><i>Avdeling:</i> Biolab</p>	<p><i>Dato:</i> 07.05.2021</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Intern</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 35 + 43</p>
<p><i>Stikkord:</i> Vitamin E, tokoferol, væskekromatografi, fluorescens og validering</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> <i>Prosjektnr.:</i> 11277</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Formålet med dette prosjektet er å validere metoden «NS-EN 12822:2014» for bestemmelse av vitamin E innhold (α-, β-, γ- og δ-tokoferoler) i fôr og fôringredienser. Tørre prøver forsåpes med kaliumhydroksid oppløst i etanol. Vitamin E ekstraheres over til heksan-etylacetat fasen som ovenføres til målekolben og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin E bestemmes ved væskekromatografi (HPLC, Agilent 1200) med fluorescensdeteksjon. Mengden av α-, β-, γ- og δ-tokoferol rapporteres. Analysemetoden heter BIOLAB A121 Tokoferolprofil i intern kvalitetssystemet.</p> <p>Fiskefôr og fôringredienser (fiskemel og oljer) ble valgt som prøvemateriale siden de er de mest etterspurte prøvetyper i forbindelse med vitamin E analyser hos Nofima Biolab. Den eksterne valideringen omfatter ikke disse prøvetyper. På grunn av at forsåpningsfunksjon i metoden er matriksavhengig, undersøkes forsåpning av fiskefôr og fôringredienser i valideringen. Det ble utført en validering av riktighet, presisjon, linearitet, måleområde og måleusikkerhet. Etter systematisk gjennomgang av resultater og ut ifra det statistiske grunnlaget anses metodens riktighet og presisjon til å være godkjent.</p> <p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>The purpose of this project was to validate the method "NS-EN 12822: 2014" for the determination of vitamin E content (α-, β-, γ- and δ-tocopherols) in feed and feed ingredients. Dry samples are saponified with potassium hydroxide dissolved in ethanol. Vitamin E is extracted into the hexane-ethyl acetate phase which is transferred to the volumetric flask and diluted to the desired concentration. Vitamin E content is determined by high-performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1200) with fluorescence detection. The amount of α-, β-, γ- and δ-tocopherol is reported. The analysis method is called as BIOLAB A121 Tokoferolprofil in the internal quality system.</p> <p>It was performed a validation of accuracy, precision, linearity, measurement range and measurement uncertainit. Fish feed and feed ingredients (fish meal and oils) were selected as test material, because they are the most requested sample material for vitamin E analyze at Nofima Biolab. After a systematic review of results, the method is considered to be approved.</p>	

Innhold

1	Innledning	1
2	Teori	2
2.1	Prinsippet i metoden	2
2.2	Grad av ekstern validering og intern verifiseringsplan	2
2.3	Optimalisering av metodeparameter	3
2.4	Tokoferolprofil i fiskefôrprøver fra Nofima Biolab.....	4
3	Materiale og metode	6
3.1	Metodeparameter	6
3.2	Avvik fra referansemetoden.....	6
3.3	Standardløsning og standardkurven	6
3.4	Beregninger av resultater	8
3.5	Prøver	8
3.6	Linearitet	9
3.7	Riktighet.....	9
3.8	Presisjon	10
3.9	Måleusikkerhet.....	11
3.10	T-test, F-test, Z-score og E_n -verdi	11
4	Valideringsplan	14
5	Resultat og diskusjon	16
5.1	Standardkurven og linearitet.....	16
5.2	Deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen	21
5.3	Måleområde	23
5.4	Riktighet.....	24
5.5	Sammenligning av ringtestresultater fra DGF, t-test	25
5.5.1	Sammenligning av ringtestresultater fra DGF, z-score og E_n -verdi	27
5.5.2	Sammenligning av ringtestresultater fra Masterlab, t-test, z-score og E_n -verdi.....	28
5.6	Presisjon	29
5.7	Måleusikkerhet.....	30
5.8	Måleusikkerhetsbidrag.....	31
6	Konklusjon	32
7	Referanser	33
Vedlegg 1	biolab a 121 tokoferolprofilen	i
Vedlegg 2	Kontrollkort for kontrollprøve fiskemel (2020-7919-1)	i
Vedlegg 3	Data av standardkurv	iii
Vedlegg 4	Data fra ringtest arrangør DGF og Masterlab	v

Vedlegg 5	Data av prøveresultatene Nofima Biolab	vi
Vedlegg 6	Area (LU*min) av blank-prøver	ix
Vedlegg 7	Statistiske testresultater.....	x
Vedlegg 8	Presisjon	xvii
Vedlegg 9	Måleusikkerhet	xxi
Vedlegg 10	Kontrollkort for ringtest, E_n-verdi.....	xxvi

1 Innledning

Vitamin E har to funksjoner i fôr. Vitamin E brukes som et tilsetningsstoff for fôr fordi det er et næringstilsetningsstoff for alle dyrearter. I tillegg brukes vitamin E som antioksidant i fôr for å hindre at fettene i fôret harskner. Noen vanlige antioksidanter i fiskefôr er ethoxyquin, butylhydroksytoluen (BHT), vitamin E og vitamin C.

I Nofima Biolab har det vært økt etterspørsel for vitamin E analyser. Formålet med dette prosjektet er å validere metoden «NS-EN 12822:2014» for bestemmelse av vitamin E innhold (α -, β -, γ - og δ - tokoferoler) i fôr og fôringredienser. Analysemetoden heter BIOLAB A121 Tokoferolprofil i intern kvalitetssystemet.

Fiskefôr og fôringredienser er de mest etterspurte prøvetypene i forbindelse med vitamin E analyser og derfor ble de valgt som prøvemateriale for validering. I metoden forsåpes tørre prøver med kaliumhydroksid oppløst i etanol. Vitamin E ekstraheres over til heksan-etylacetat fasen som ovenføres til målekolben og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Innholdet av vitamin E bestemmes ved væskrokromatografi (HPLC, Agilent 1200) med fluorescensdeteksjon. Mengden av α -, β -, γ - og δ - tokoferol rapporteres. I forbindelse med validering ble det utført en nedskalering av metoden for å minske forbruket av kjemikalier.

2 Teori

Dette kapitlet beskrives metoden, graden av validering og forventinger for metoden. Forkortelser for tokoferolene brukt i rapporten er alfatokoferol (α -tokoferol eller alfa), betatokoferol (β -tokoferol eller beta), gammatokoferol (γ -tokoferol eller gamma) og deltatokoferol (δ -tokoferol eller delta).

2.1 Prinsippet i metoden

Tørre prøver forsåpes med kaliumhydroksid oppløst i etanol eller metanol i 15-40 minutter ved 80 °C -100 °C temperatur. Uforsåpbare materialet, inkludert Vitamin E, ekstraheres over til løsemidler som overføres til målekolben og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Oljeprøver kan ekstraheres direkte uten forsåpning. Innholdet av vitamin E bestemmes ved væskechromatografi (HPLC) med fluorescensdeteksjon.

Mengden av α -, β -, γ - og δ -tokoferol beregnes ved hjelp av standardkurve og rapporteres. Metoden skal kunne anvendes til fiskefôr og fôringredienser: fiskemel og oljer. På grunn av forsåpningsfunksjon i metoden er matriksavhengig, undersøkes forsåpning av fiskefôr og fôringredienser i validering.

2.2 Grad av ekstern validering og intern verifiseringsplan

NMKL-prosedyre nr. 4 (2009) angir hva som anbefalt av intern verifisering som gjøres lokalt på laboratoriet avhengig av hvor grundig metoden er validert eksternt. Vitamin E metoden som brukes i denne valideringen er eksternt validert i en kollaborativ metodeavprøving. For en eksternt validert metode i en kollaborativ metodeavprøving hvor det tas i bruk en ny prøvematrikse eller et nytt instrument, må det gjøres en verifisering av riktighet og presisjon og eventuelt av kvantifiseringsgrense (NMKL-prosedyre nr. 4, 2009).

Den eksterne valideringen er ikke omfattet fiskefôr og fôringredienser. Det egnede konsentrasjonsområdet for prøvemateriale er derfor en viktig del av analysemetodens validering (NMKL, 2009). Etersom metoden ble validert eksternt, er denne rapporten begrenset til intern validering, verifisering av linearitet, riktighet, nøyaktighet, presisjon og måleområde samt beregning av total måleusikkerhet (NMKL, 2009). Presisjon inndeles i repeterbarhet, intern reproducerbarhet og reproducerbarhet. Standardkurven brukes for beregningen av linearitet, deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen.

Presisjonsdata fra forskjellige HPLC metoder for bestemmelse av α -tokoferol i margarin og melkepulver ble etablert i 1994 som ekstern internasjonal kollaborativ metodeavprøving og den ble organisert av European Commission's Standards, Measurements and Testing Programme (NS-EN 12822:2014). Presisjonsdata fra melkepulver og havrepulver ble etablert i 1993 som kollaborativ metodeavprøving ifølge ISO 5725:1986 og den ble organisert av Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Food Chemistry Department, Berlin, Tyskland (NS-EN 12822:2014).

Dataene som er fått fra disse sammenligningsstudiene, er kanskje ikke anvendelige for analytt, konsentrasjonsområder og andre matriser enn de som er analysert (NS-EN 12822:2014). I validering vurderes det om resultater fra analyserte prøvemateriale fiskefôr og fôringredienser (fiskemel og oljer) er sammenlignbar med de som er gitt i tabell 1.

Tabell 1a og 1b Prøvetype, tokoferol analytt, antall deltagere, antall prøver og replikater og relativ standard avvik for repeterbarhet, RSD_r, % og relativ standard avvik for reprodusebarhet RSD_R, % fra European Commission's Standards, Measurements and Testing Programme (i 1994) og Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Food Chemistry Department, Berlin, Tyskland (NS-EN 12822:2014).

Tabell 1a

Ringtestprogram	Margarine (CRM 122)	Melkepulver (CRM 421)	Melkepulver	Havremel
År	1994	1994	1993	1993
Tokoferol	α- tokoferol			
Antall deltagere	9	10	13	13
Antall prøver	1	1	5	5
Antall replikater	45	50	66	70
Snittverdi (mg/kg)	240,9	98,9	102	2,79
RSD _r , %	4,1	4,0	3,0	9,0
RSD _R , %	6,1	7,0	12,8	16,8

Tabell 1b

Ringtestprogram	Melkepulver			Havremel
År	1993			1993
Tokoferol	β-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol	β-tokoferol
Antall deltagere	12	13	10	13
Antall prøver	5	5	5	5
Antall replikater	51	65	40	64
Snittverdi (mg/kg)	0,81	19,89	2,80	0,57
RSD _r , %	11,1	5,5	10,4	10,5
RSD _R , %	19,8	17,4	16,8	19,3

2.3 Optimalisering av metodeparameter

Referansemetoden NS-EN 12822:2014 er veldig fleksible i forhold til kjemikaliebruk og gir flere alternativer for å bruke ulike metodeparameter. Referansemetoden presenterer også mange eksempler og anbefalinger for å gjennomføre analysen ved bruk av ulike kromatografiske betingelser basert på EUR-Rapport 18039 (Finglas mfl. 1997). For å finne passende metodeparametere for å utføre analysen har det blitt sammenlignet ulike E vitamin publikasjoner i tabell 2.

I følge Ryyänen mfl. (2004) har forsåpningstid og mengden av KOH en signifikant påvirkning for tokoferol verdier. I tillegg fant Ryyänen mfl. (2014) ut at forsåpningstemperatur ikke var en særlig viktig faktor. I følge Ryyänen mfl. (2014) mindre mengder av KOH (fra 3 ml til 0,25 ml KOH) tilsatt i prøven i forsåpning ga høyere utbytt av total tokoferol verdien. Forsåpningstid hadde mindre påvirkning enn KOH mengden. Etter analysens optimaliseringsforsøk gjennomførte Ryyänen mfl. (2014) final E vitamin analysene med mest optimalisk oppsetningen: 0,5 ml KOH og forsåpning i 25 minutter ved 100 C° temperatur.

Polar modifikasjon av ekstraksjonsmidler gav høyere gjenvinning av tokoferol i rugmel (Ryyänen mfl. 2014). Derfor valgte Ryyänen et al (2014) å bruke 20 % etylacetat i n-heksan i stedet for rent n-heksan

som ekstraksjonsmidler. I tidligere forskningsprosjekt hadde 10 % etylacetat i n-heksan -løsning blitt vurdert å være mest gunstig (Ueda og Igarashi, 1987).

Tabell 2 Brukte parameter i ulike vitamin E analyser.

Referanse	Trial/lab kode	Prøve mengde (g)	KOH %	EtOH (ml)	Forsåpnings-tid (min)	Forsåpnings-temperatur (C°)	KOH mengde (ml)
NS-EN 12822:2014		2-10	33-38	50-100	15-40	80-100	5-20
Intern metode 1998		0,1-1	20	4	20	100	0,5
Ryynänen mfl. 2014		1	33	5	25	100	0,5
Finglas mfl. 1997.	4	5-10	38	100	30	80	
Finglas mfl. 1997.	15	2	33	55	30	90	
Finglas mfl. 1997.	16	5-10	38	40	15	100	

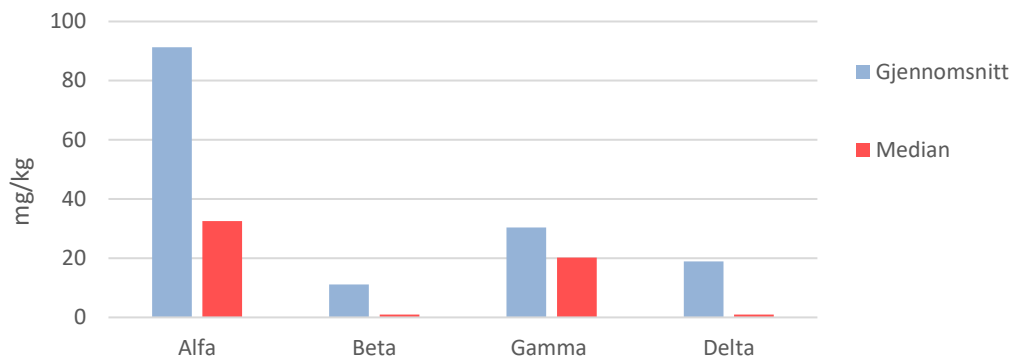
2.4 Tokoferolprofil i fiskefôrprøver fra Nofima Biolab

For å få bedre oversikt av hvilke vitamin E konsentrasjonsområder fiskefôr og fôringredienser har, ble det gjort gjennomgang av tidligere analysert prøver utført av et eksternt laboratorium. Resultatene fra denne gjennomgangen ble hentet fra Nofima Biolab internt datasystem WilabLIMS og de ble brukt til å velge testprøver til valideringen. Det ble valgt prøver som representerer godt hele konsentrasjonsområdet for de enkelte tokoferolene.

I periode 6.1-6.3.2020 har Nofima Biolab mottatt cirka 250 prøver som har blitt analysert for vitamin E ved et eksternt laboratorium. I tabell 3 og diagram 1 vises gjennomsnitt og median for vitamin E resultater av disse analyserte prøvene. De fleste alfatokoferolresultater er cirka 30 mg/kg og konsentrasjonsområde for alfatokoferol resultater er fra 8 til 805 mg/kg. Beta- og deltatokoferol har de laveste resultatene og de fleste av de ligger under 5 mg/kg. Det største resultatet for deltatokoferol er cirka 50 mg/kg. De fleste resultatene for gammatokoferol ligger mellom 10-30 mg/kg og konsentrasjonsområde er fra 5 til 200 mg/kg.

Tabell 3 Konsentrasjon av tokoferolene i typiske prøvemateriale (fiskemel, fôr og oljer) i Biolab.

Tokoferol	Alfa mg/kg	Beta mg/kg	Gamma mg/kg	Delta mg/kg
Gjennomsnitt	90	<5	30	20
Median	30	<5	20	<5



Figur 1 Gjennomsnitt og median av vitamin E (α -, β -, γ - og δ -tokoferoler og total vitamin E) i analyserte prøver i Nofima Biolab i 6.1-6.3.2020.

3 Materiale og metode

3.1 Metodeparameter

Ut fra opplysninger fra optimalisering av analyseparameter i kapitel 2.3 ble parameter som vises i tabell 4 valgt for validering. Tørre prøver (0,5-1 g) forsåpes med 20 % kaliumhydroksid (0,5 ml) oppløst i etanol (4 ml) i 30 minutter ved 80 °C temperatur. Uforsåpbar materiale, inkludert Vitamin E, ekstraheres over til heksan-etylacetat (9:1) fasen som ovenføres til målekolben og fortynnes om nødvendig til ønsket konsentrasjon. Ut fra tidligere erfaring ble det valgt 5 % tetrahydrofuran i heksan som eluent i mobil fasen. Hele metodebeskrivelsen er beskrevet i vedlegg 1.

Tabell 4 Metodeparameter for validering.

E vitamin analyse	Prøve mengde (g)	KOH %	EtOH (ml)	Forsåpningstid (min)	Forsåpnings-temperatur (C°)	KOH mengde (ml)
Nofima Biolab	0,5	20	4	30	80	0,5

3.2 Avvik fra referansemetoden

I valideringen ble det utført en nedskalering av referansemetoden (NS-EN 12822:2014) for å minske forbruket av kjemikalier. Det ble også undersøkt hvor mange standardløsninger for beregningen av resultater som er nødvendig å benytte. Det ble også undersøkt om det var mulig å forenkle enkelte trinn i metodebeskrivelsen. For eksempel i stedet for evaporasjon ble ekstrakt direkte fortynnet til ønsket konsentrasjon.

3.3 Standardløsning og standardkurven

Det ble laget en stamløsning av hvert enkelt tokoferol med en konsentrasjon lik 500 mg/l. Ampulle (50 mg av hver tokoferol) av α -, β -, γ - og δ -tokoferol ble løst med litt etanol (0,40 ml) og overført til 100 ml målekolber og fylt opp til merket med heksan.

Det ble overført 2 ml fra hver av stamløsningene til hvert sitt 10 ml reagensrør. Løsningene ble dampet inn til tørrhet på varmeblokk ved temperatur mindre enn 50 grader med nitrogenblåsing. Gjenværende ble løst opp i 5 ml metanol. Metanol ble brukt som blank. Absorbansen av hver tokoferolstamløsning ble bestemt ved UV spektrofotometer for å måle nøyaktige konsentrasjoner i tabell 5-7.

Tabell 5 Absorbansen avlesing av tokoferoler lest av spektrofotometer.

Tokoferol	Dato	292nm (Abs)	296nm (Abs)	298nm (Abs)	255nm (Abs)	alfatokoferol ratio (1) 255/292nm <0,18
Alfa	12.11.2020	1,331			0,147	0,11
Beta	12.11.2020		1,904			
Gamma	12.11.2020			2,097		
Delta	12.11.2020			1,856		

Ifølge referansemetoden må alfatokoferol absorptans ratio E_{255}/E_{292} være mindre enn 0,18.

Konsentrasjonene (mg/l) av hver tokoferol ble beregnet ifølge formelen 1.

Formel 1

$$\rho = \frac{A \times M \times 1000}{\epsilon}$$

A Absorptansverdien av hver tokoferol i den respektive stamløsningen i metanol

M Molar mass $g \times mol^{-1}$ av hver tokoferol beskrevet i Tabell

ϵ Molar absorptans koeffisient in metanol in $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$

ρ Konsentrasjon av α -, β -, γ - og δ -tokoferol i den respektive stamløsningen i metanol mg/l

Tabell 6 Mass konsentrasjon (ρ) av hver tokoferol i mg/l i metanol.

Tokoferol	A absorptansen	$E^{1\%}_{1cm}$	M $g \times mol^{-1}$	ϵ $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$	ρ mg/l i metanol
Alfa	1,331	76	430,7	3273,3	175,13
Beta	1,904	89	416,7	3708,6	213,93
Gamma	2,097	91	416,7	3782	231,05
Delta	1,856	87	402,6	3502,6	213,33

Tabell 7 Mass konsentrasjon (ρ) av hver tokoferol omregnet til konsentrasjon (ρ) mg/l i stamløsning.

Tokoferol	ρ mg/l i metanol	Tatt ut fra stamløsningen (ml)	Fortynnet i metanol (ml)	ρ mg/l i stamløsning
Alfa	175,13	2	5	438
Beta	213,93	2	5	535
Gamma	231,05	2	5	578
Delta	213,33	2	5	533

Det ble laget en standardløsning med alle fire tokoferolstamløsninger med en konsentrasjon på 80-120 mg/l (tabell 8) Siden responsen av betatokoferol i HPCL er sterkere enn responsen av de andre tokoferolene ble den tilsatt mindre i blandingen. Standardløsninger ble fortynnet som vist i tabell 9.

Det ble passet på at det var god spredning mellom standardene. Blank bestod av eluenten, 5 % tetrahydrofuran i heptan.

Tabell 8 Tillaging av standardløsning for å lage standardserien.

Tokoferol ID	ρ mg/l i stamløsning	Tatt ut (ml)	Fortynnet heksan (ml)	ρ mg/l i standardløsning
Alfa	438	10,0		87,566
Beta	535	8,0		85,574
Gamma	578	10,0	50	115,524
Delta	533	10,0		106,667

Tabell 9 Tillaging av standardløsning for å undersøke lineariteten.

Standardløsningsnivåer	Ut pipetering (ml)	Målekolbe (ml)	Konsentrasjon cirka µg/ml = mg/l
LEVEL 11	Standardløsning	50	80-100
LEVEL 10	5	10	50
LEVEL 9	3	10	30
LEVEL 8	3,00	25	12
LEVEL 7	2,00	25	8
LEVEL 6	3,00	100	3
LEVEL 5	1,00	100	1
LEVEL 4	3,00	25	0,4
LEVEL 3	1,00	50	0,06
LEVEL 2	0,50	100	0,01
LEVEL 1	0,15	100	0,004
BLANK	-	-	0

3.4 Beregninger av resultater

Basert på kalkulasjon av standardkurve og integreringsprogram (Chromeleon), kalkuleres massefraksjon, w , av α -, β -, γ - og δ - tokoferol i mg/kg i prøven ved bruk av formelen 2.

Formel 2

$$w = \frac{A_s \times \rho \times V \times V_{ST}}{A_{ST} \times m \times V_s \times 1000} \times 1000$$

A_s	Areal av α -, β -, γ - og δ - tokoferol analysert i prøven
A_{ST}	Areal av topp av α -, β -, γ - og δ - tokoferol analysert i standardløsning
V	Total volum av prøveløsning i milliliter (ml)
ρ	Konsentrasjon av α -, β -, γ - og δ - tokoferol analysert i standardløsning mikrogram per milliliter (µg/ml)
m	Innveid prøve, i gram (g)
V_{ST}	Injeksjonsvolum av standard løsning i mikroliters (µl)
V_s	Injeksjonsvolum av prøven i mikroliters (µl)
1000	Konversjon faktor for mikrogramms to milligrams (µg/mg)
1000	Konversjon faktor for massefraksjon per 1000 g = 1 kg

3.5 Prøver

På tabellen 10 er det gitt informasjon om de 12 prøver som ble brukt under validering. Det var 6 fiskemelprøver, 3 fiskefôrprøver og 3 oljeprøver. Alle tørre prøvene ble lagret mørkt og i romtemperatur. DGF ringtestprøver 26 A, blanding av plant oil/marine oil (2020-7743-1) og 26 B olive oil (2020-7743-2) ble lagret i kjøleskap cirka ved ca. + 6 °C grader. Alle analysene for valideringen ble gjennomført i løpet av kort tidsrom i 11.11-26.11.2020.

Tabell 10 Prøver som brukes i metodevalideringen. Tokoferolresultater oppgitt er enten fra ringtestsarrangør eller et akkreditert eksternt oppdragslaboratorium.

Wilab-nummer	Prøvetype	Alfa (mg/kg)	Beta (mg/kg)	Gamma (mg/kg)	Delta (mg/kg)	Total (mg/kg)
2020-1619-1 Masterlab ringtest	Fiskefôr	330,70 (as acetate)	-	-	-	330,70
2020-7743-1 DGF Ringtest	Olje plante- og fiskeolje	994,33	71,08	2057,89	581,13	
2020-7743-2 DGF Ringtest	Olje Olive olje	376,14	37,05	1337,72	403,87	
2020-7919-1	Fiskemel kontrollprøve (KP)	27,1	<5	29,2	11,6	68,0
2020-6325-1	Fiskemel	13,3	<5	29,7	15,8	58,9
2020-6324-1	Fiskemel	15,5	<5	37,7	19,0	72,2
2020-5672-1	Fiskefôr	566	<5	86,0	23,6	675
2020-0725-1	Fiskemel	10	<5	27,1	15,5	52,6
2020-0610-1	Fiskeolje	596	11,0	41,3	15,4	664
2019-7340-1	Fiskemel	12,0	<5	44,6	28,9	85,5
2019-4210-1	Fiskemel	22,4	6,19	47,6	31,5	108
2019-3352-3	Fiskefôr	388	8,51	51,8	7,28	455

3.6 Linearitet

Ifølge referansemetoden lages en standardløsning med alle fire tokoferolene med konsentrasjon mellom 1-10 mg/l av hver tokoferol og ekstrakt fra prøven fortynnes slik at sluttkonsentrasjon ligger i samme måleområdet som standardløsningen mellom 1-10 mg/kg for hver tokoferol. Siden bare et kalibreringspunkt er beskrevet i metoden og lineariteten har ikke blitt vurdert i metodereferansen, antas at standardkurven er linear ($R^2 = 1$).

Under validering ble linearitet undersøkt ved å fortynne standardløsning til ulike konsentrasjoner og hver standardløsning ble injisert to ganger. Resultatene presenteres grafisk og ligningen for den lineære regresjonen samt korrelasjonskoeffisienten oppgis for hvert av disse forsøkene (NMKL, 2009). Det ble undersøkt konsentrasjonsområdet, måleområde, deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen ved bruk av standardløsning til ulike konsentrasjoner. Måleområdet er det området hvor metoden er validert og gir akseptabelt riktighet og presisjon (NMKL, 2009).

3.7 Riktighet

Riktighet er graden av overenstemmelse mellom en prøves sanne innhold av en bestemt analytt og resultatet av en analyse. Det er viktig å være klar over at en prøves sanne innhold av en analytt alltid er en ukjent størrelse. For å vurdere metodens riktighet må man derfor ty til aksepterte resultater som sertifisert innhold i et referansemateriale, resultat fra en kollaborativ avprøvd analysemetode og/eller resultat fra en sammenliknende laboratorieprøving (NMKL 2009).

Det ble brukt DGF (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V.) ringtestprøver (plante- og fiskeoljer) fra 26th DGF Proficiency Test for å undersøke riktigheten i tillegg til Masterlab ringtestprøve

(fiskefôr) fra våren 2020 og prøver (fiskefôr og fiskemel) som var analysert med akkreditert metode hos et eksternt akkreditert laboratorium. Vitamin E mengden kan tapes ved lagring, som vi må ta hensyn under validering.

3.8 Presisjon

Presisjon er graden av overensstemmelse mellom uavhengige analyseresultater framkommet under spesifikke forhold (NMKL, 2009). Presisjonen uttrykkes vanligvis som resultatenes standardavvik (NMKL, 2009). Presisjonen inndeles for repeterbarhetsforhold og reproduserbarhetsforhold. Reproduserbarhet kan evalueres både intern og eksternt.

Repeterbarhet (s_r) betyr at analyseresultater er framskaffet på bakgrunn av å anvende analysemetoden på identiske prøver på samme laboratorium med samme utstyr i løpet av en kort tidsperiode. Intern reproduserbarhet (s_{Ri}) betyr at analysen gjøres på samme laboratorium, men i forskjellige tidspunkt, av forskjellige personer og forskjellige kjemikalier.

Eksternt reproduserbarhet betyr at resultatene er framkommet ved anvende analysemetoden på identiske prøver i forskjellige laboratorier (NMKL, 2009). S_r er standardavviket til repeterbarheten som beregnes ved hjelp av formel 3. x_i og y_i er de målingene i en dobbeltbestemmelse og n er antall par av dobbeltbestemmelser (NMKL, 2009).

Formel 3 Repeterbarhet

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}}$$

Formel 4 Reproduserbarhet

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}}$$

Formel 5 Repeterbarhetsgrense

$$r = 2,8 \times S_r$$

- s_r repeterbarhets standardavvik av en måling (beregnet fra en serie av dobbeltanalyser)
- s_R reproduserbarhets standardavvik til en måling (beregnet fra data fra sammenlignende laboratorieprøvninger (slp))
- r repeterbarhetsgrense, den absolutte forskjell mellom to enkeltresultater for en analysemetode, når måleresultatene oppnås under repeterbare betingelser

3.9 Måleusikkerhet

Metodens ekspandert kombinert måleusikkerhet (U) beregnes fra kombinert måleusikkerhet (U_c) av den erfarte spredningen med repeterte analyser og differansen mellom interne og eksterne resultater, og det er benyttet en dekningsfaktor (k) på 2 for å oppnå omtrent 95 % konfidensnivå.

Formel 6 Ekspandert kombinert måleusikkerheten

$$U = k \times U_c = k \times \sqrt{(u_{Nofima}^2 + u_{Nofima-\bar{x}}^2)}$$

Formel 7 Kombinert måleusikkerheten

$$U_c = \sqrt{(u_{Nofima}^2 + u_{Nofima-\bar{x}}^2)}$$

Formel 8 Vår usikkerhet i forhold til våre avvik fra gjennomsnittsverdiene i de ringtestene

$$u_{Nofima-\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(Nofima - \bar{x})^2}{2d}}$$

U ekspandert kombinert måleusikkerhet ved ca. 95 % konfidensnivå

k dekningsfaktor på 2 for å oppnå omtrent 95 % konfidensnivå

U_{Nofima} er her vårt interne standardavvik for repeterbarhet (RDS_r %). Verdien er bestemt ut fra differanser mellom dobbeltbestemmelser i våre vanligste prøvematerialer med resultater i «normalområdet».

$U_{Nofima-\bar{x}}$ er vår usikkerhet i forhold til våre avvik fra gjennomsnittsverdiene i de ringtestene som vi deltar i for den enkelte analyse. Denne usikkerheten beregner vi etter formel 8.

d antall dobbeltbestemmelser

3.10 T-test, F-test, Z-score og E_n -verdi

T-testen gir et mål for om det er signifikant forskjell mellom gjennomsnitt i de to datasettene. Når en ny metode skal valideres er det vanlig å sammenligne et resultatsett fra kollaborative ringtest mot den som har blitt analysert med ny metoden under validering, for å se om det er signifikante forskjeller mellom datasettene. Ved å beregne t-verdien (t-stat) for datasettene og sammenligne denne verdien mot en tabellverdi for t (t-kritisk) kan det bestemmes om datasettene har signifikant forskjell.

Tabellverdien for t avhenger av valgt konfidensintervall og antall frihetsgrader. For at t-testen skal godkjennes må den beregnede t-verdien (absolutt verdien) være lavere enn tabellverdien. Siden antall av observasjoner mellom de to datasettene varierer, beregnes antall av frihetsgrader etter formelen 11.

Formel 9 T-test (t-stat)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\text{Var}(\bar{x}_1)}{n_1} + \frac{\text{Var}(\bar{x}_2)}{n_2}}}$$

Formel 10 Varians

$$\text{Var}(X) = s_X^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

Formel 11 Antall av frihetsgrader

$$df = v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}}$$

t t-test
VAR (X) varians
df antall av frihetsgrader, ifølge Welch-Satterhwaite formel

\bar{x}_1 snitt fra datasett 1
 \bar{x}_2 snitt fra datasett 2
 s_1 standardavvik fra datasett 1
 s_2 standardavvik fra datasett 2
Var (\bar{x}_1) varians fra datasett 1
Var (\bar{x}_2) varians fra datasett 1
 n_1 antall datapunkter i datasett 1
 n_2 antall datapunkter i datasett 2

En f-test oppgir om det er signifikant forskjell mellom variansene til de to datasettene (formel 12). Ved å beregne f-verdien for datasettene og sammenligne denne verdien mot en tabellverdi for f (f-kritisk) kan det bestemmes om datasettene har signifikant forskjell. Tabellverdien for f avhenger av valgt konfidensintervall og antall frihetsgrader. F-testresultater bestemmer om t-test analyseres med ulike eller like varianser.

Formel 12 F-test

$$F = \frac{VAR(Xi)}{VAR(Yi)}$$

Z-poengsummen (Z-score) er det signerte antall standardavvik som datapunktene verdi er over middelveien til den som blir målt (formel 13). Beregn z-score på en verdi, gitt at dataene normalt distribueres og også gitt gjennomsnitt og standardavvik. Under validering vurderes z-score verdier mellom -2 og 2 å være godkjente.

Formel 13 Z-score

$$Z - score = \frac{(x_{funnet} - x_{referanse})}{S_{abs}}$$

For ringtestresultater beregnes det alltid en E_n -verdi («error normalized»-verdi) i henhold til formel 14. 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).

Formel 14 E_n -verdi

$$E_n - verdi = \frac{\bar{x}_{Nofima} - \bar{x}_{SLP}}{\sqrt{(2 \times U_c)^2 + \left(\frac{U_{SLP}}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

\bar{x}_{Nofima}	gjennomsnittverdien som ble oppnådd ved analysen
\bar{x}_{SLP}	ringtestarrangørens beste estimat på sann verdi av analytten i prøven (gjennomsnitt)
U_c	vår kombinert måleusikkerheten
U_{SLP}	ringtestarrangørens standardavvik for datasett
n	antall laboratorier som deltok i ringtesten

4 Valideringsplan

Analysemetode	Vitamin E - Bestemmelse av vitamin E med væskekromatografi (HPLC). Måling av α -, β -, γ - og δ -tokoferol (BIOLAB A121 Tokoferolprofil)			
Metode nr.:	BIOLAB A121 Tokoferolprofil			
Metodereferanse	Norsk Standard NS-EN 12822:2014, Næringsmidler. Bestemmelse av vitamin E med væskekromatografi (HPLC). Måling av α -, β -, γ - og δ -tokoferol			
Metodeansvarlig	Noora Heikintalo			
Grad av ekstern validering	Metoden er eksternt validert i en kollaborativ metodeavprøving, men det anvendes en annen matriks.			
Prøvetype (matriks)	Fôr og fôringredienser; fiskemel og oljer			
Intern validering	Validering av riktighet og presisjon ved bruk av ny prøvematriks			
Avvik fra metodereferansen	<p>Det er ingen avvik fra metodereferansen når det gjelder prøveopparbeiding eller kjemikalietyper, men i valideringen vil følgende undersøkes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En nedskalering av referansemetoden for å minske forbruket av kjemikalier. • Referansemetoden angir bruk av et kalibreringspunkt ved lineær kalibrering. Under validering testes det nødvendige mengde av kalibreringspunktene. • Det ble også undersøkt om det var mulig å forenkle enkelte arbeidstrinn. For eksempel i stedet for evaporasjon ble ekstrakt direkte fortynnet til ønsket konsentrasjon. 			
Validering punkter:	Aktivitet og krav	Utføres av	Tidsplan	
0	Litteratur gjennomgang	Referanser, vitenskapelige tidsskrifter og litteratur	NOHE	2016-2019
0	Optimalisering	Utvikling av metoden, kalibrering og optimalisering, valg av kolonner og løsemidler og bruk av dataprogram Chromeleon.	NOHE, BA	2019-2020
1	Standardkurve Linearitet	Det antas at standardkurven er linear siden bare et kalibreringspunkt er beskrevet i metoden. Standardkurven bestemmes to ganger. Linearitet vurderes med hjelp av regresjonsanalysen og residualplottene.	NOHE	2020
2	Deteksjonsgrense (LoD) Kvantifiseringsgrense (LoQ)	LoD og LoQ beregnes fra standardkurven og fra kromatogrammer av blank-prøver.	NOHE	2021
3	Måleområde	Det nedre måleområdet beregnes fra kvantifiseringsgrensen (LoQ)	NOHE	2021
4	Riktighet	Det brukes ringtestprøver fra DGF (plante- og fiskeoljer) og Masterlab (fiskefôr) for å undersøke riktigheten. I tillegg brukes det prøver (fiskefôr og fiskemel) som har blitt analysert i et eksternt akkreditert laboratorium før. Påvirkning av forsåpningen bestemmes.	NOHE	2021

		Riktigheten vurderes med hjelp av t-testen, z-score og E_n -verdien		
5	Presisjon Bestemmelse av repeterbarheten	<p>Repeterbarhet betyr at analyseresultater er framskaffet på bakgrunn av å anvende analysemetoden på identiske prøver på samme laboratorium under anvendelse av samme utstyr innenfor et kort tidsrom.</p> <p>Presisjonen er undersøkt i metodereferansen for margarinene, melkepulver og havrepulver.</p> <p>5 prøver analysert i 4-6 dager (minst en fra hver prøvetype fôr, mel og olje)</p> <p>Presisjon presenteres som relativ standard avvik for repeterbarhet, RSDr,%</p>	NOHE	2021
6	Måleusikkerhet	Ekspandert kombinert måleusikkerheten (U) og usikkerhetsbidragene bestemmes	NOHE	2021
7	Valideringsrapport	Ferdig	NOHE	Mai 2021
8	Varsle NA	Ferdig	JW	Mars 2021

5 Resultat og diskusjon

5.1 Standardkurven og linearitet

Linearitet ble undersøkt ved å fortynde standardløsning til ulike konsentrasjoner og hver standardløsning ble injisert to ganger. Måleområdet skulle minimum dekke det akkrediterte måleområdet til metoden, derfor ble det akkrediterte måleområdet (mg/kg) omregnet fra injisert mengde (mg/l) på instrumentet.

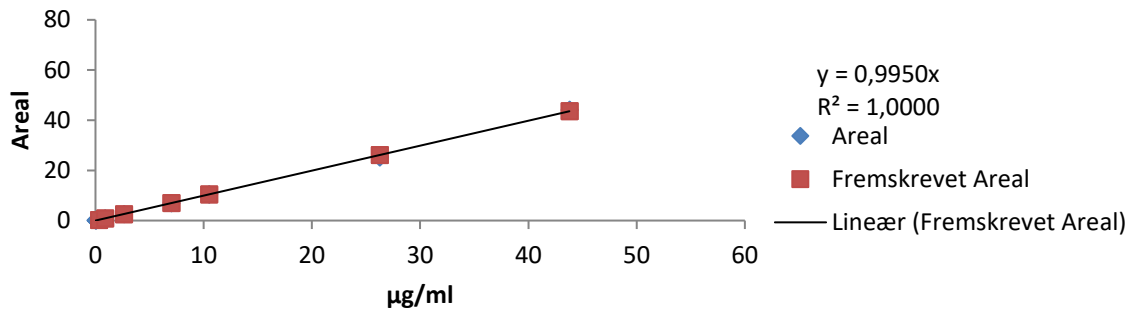
Ifølge regresjonsanalysen er det en kraftig signifikant sammenheng mellom areal og konsentrasjon for hver tokoferol. Resultatene for regresjonsanalysen ligger i vedlegg 7. Korrelasjon mellom konsentrasjon og areal er linear basert på regresjon data-analyse, linjetilpasnings- og residualplottene.

Linjetilpasningsplottene er plottet areal av toppene mot konsentrasjonen av standardløsningen (diagrammer 2a-d). R^2 og helningskoeffisientene er presentert i tabell 11. Det er beregnet konfidensintervall for skjæringen, som inneholder koordinatene 0.0. Dvs. standardkurven går gjennom null.

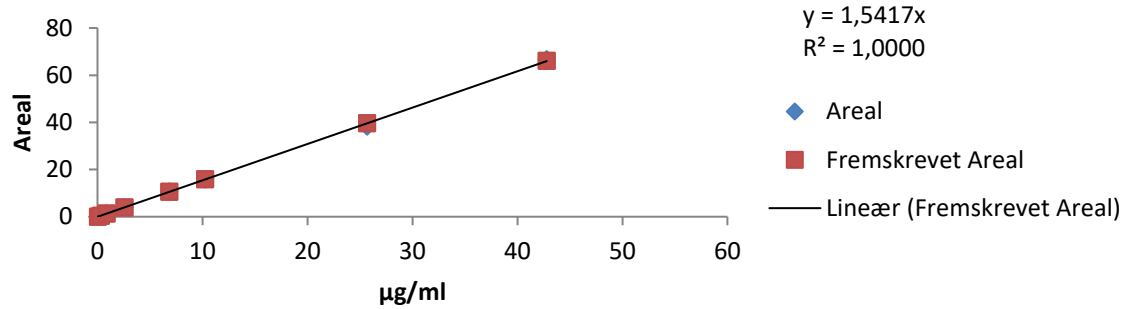
Tabell 11 R^2 og helningskoeffisientene for hver tokoferol fra standardkurven.

Tokoferol	Alfa	Beta	Gamma	Delta
R^2	1,000	1,000	1,000	1,000
Helningskoeffisienten (a)	0,9950	1,5417	1,5476	1,6468
Høyde LU (luminans)	0,02-287	0,04-348	0,03-387	0,03-270

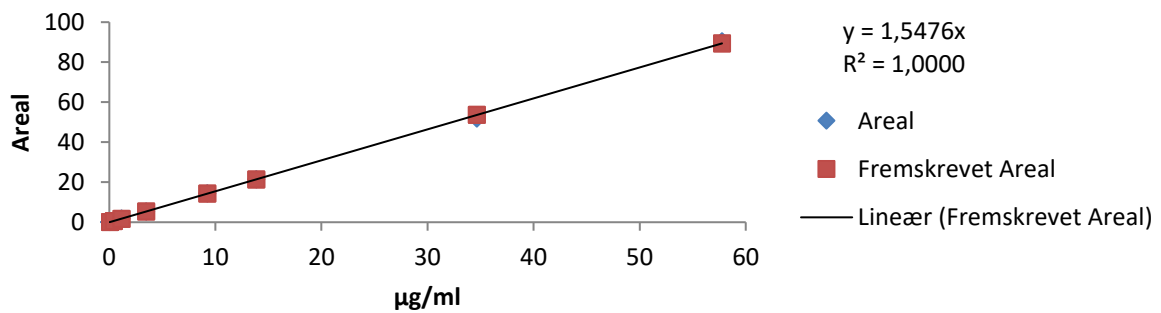
2a. Linjetilpasningsplot alfatokoferol



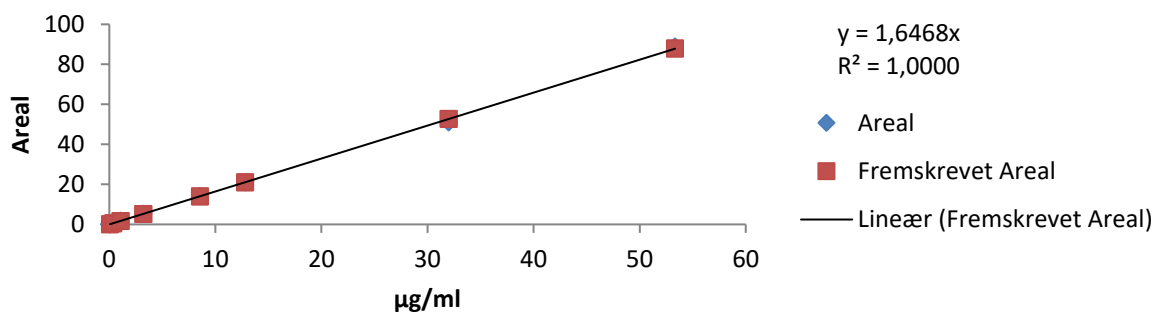
2b. Linjetilpasningsplot betatokoferol



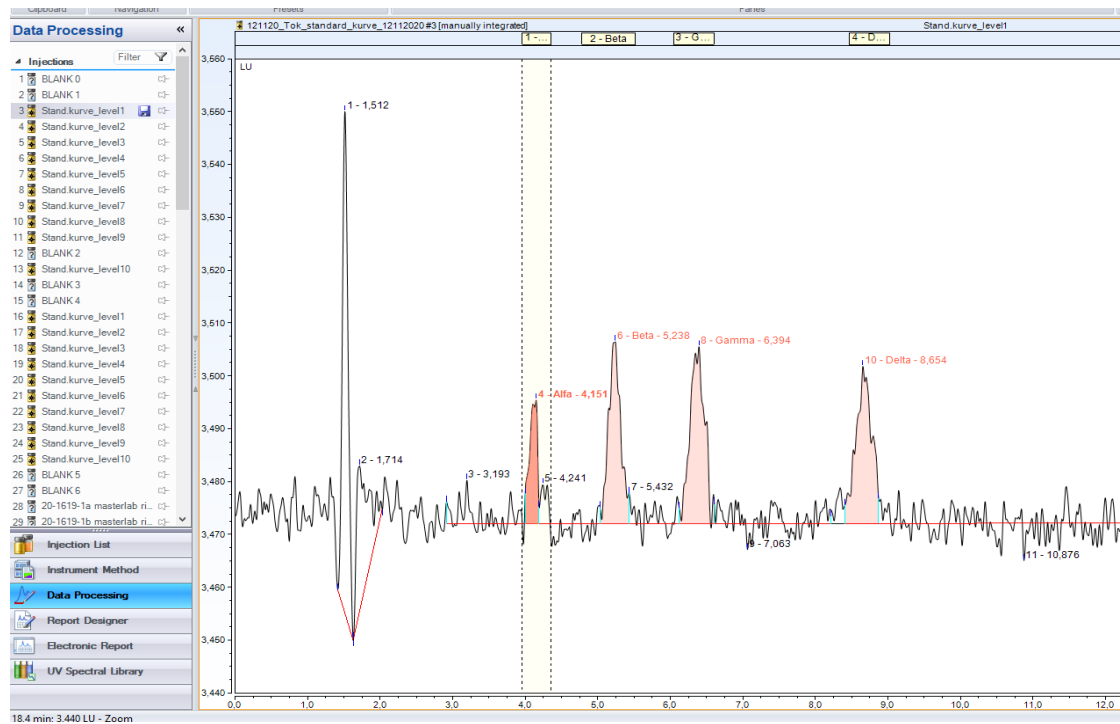
2c. Linjetilpasningsplot gammatokoferol



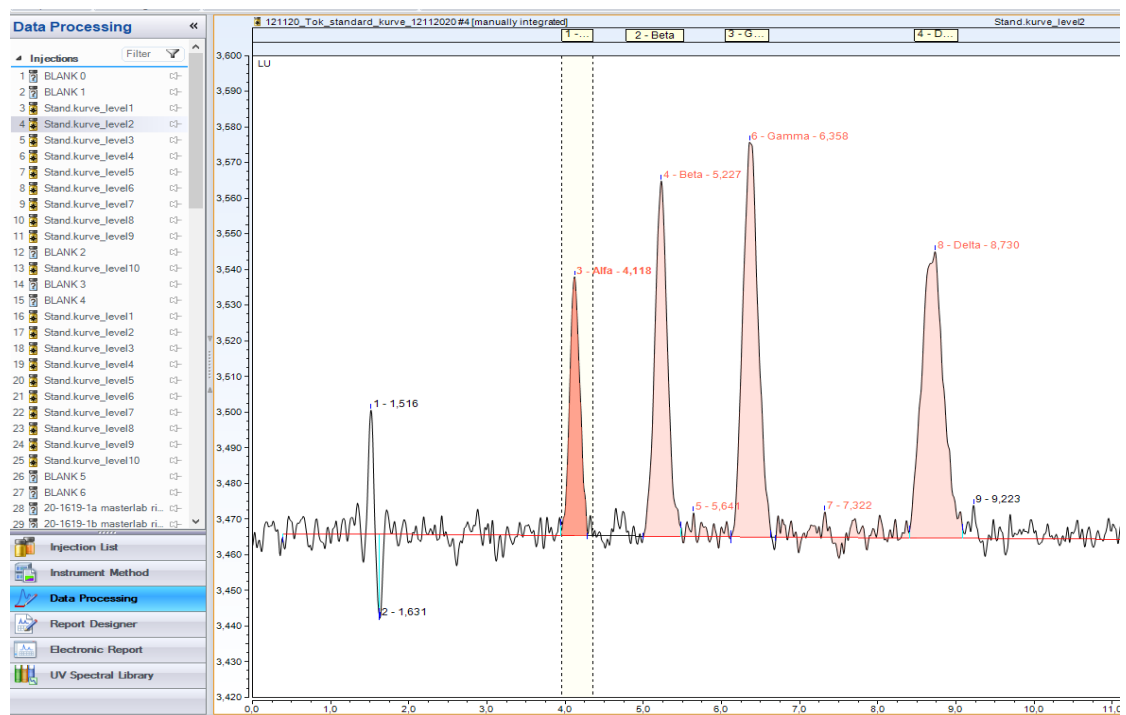
2d. Linjetilpasningsplot deltatokoferol



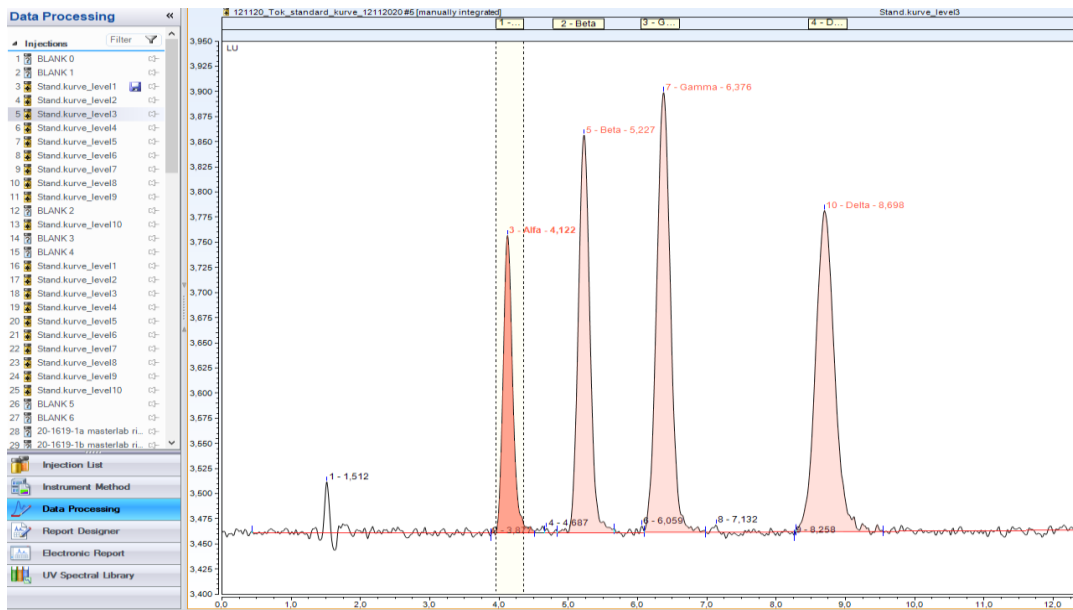
Figur 2a, 2b, 2c og 2d Linjetilpasningsplottene for α -, β -, γ - og δ -tokoferoler analysert 12.11.2020.



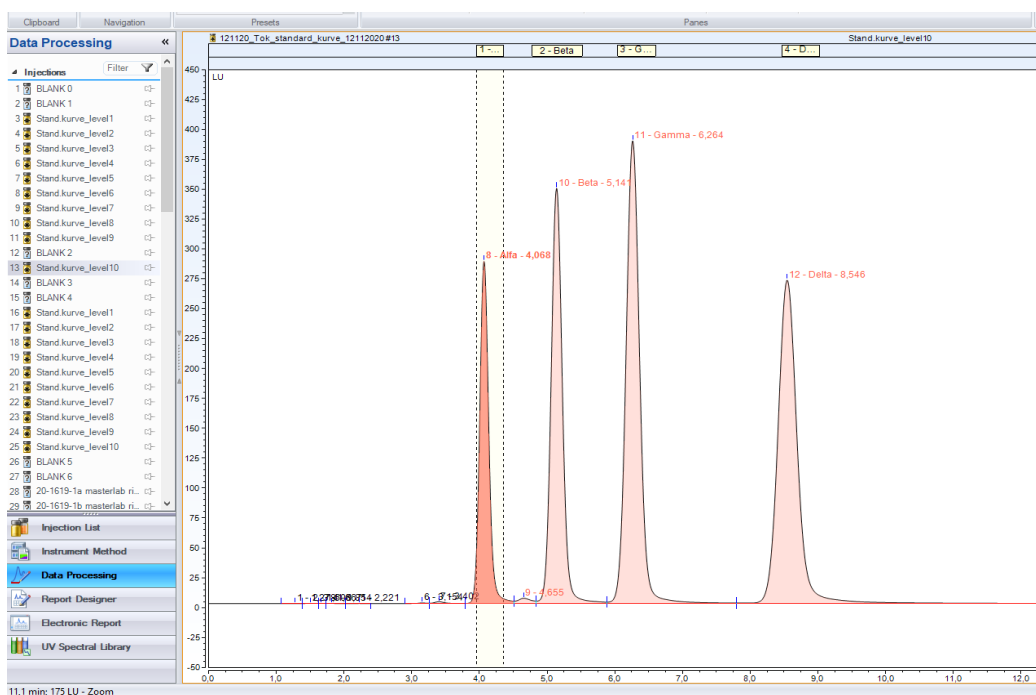
Bilde 1 Kromatogram for standardløsning level 1, cirka 0,004-0,005 mg/l konsentrasjon injisert i HPLC.



Bilde 2 Kromatogram for standardløsning level 2, cirka 0,01-0,02 mg/l konsentrasjon injisert i HPLC.

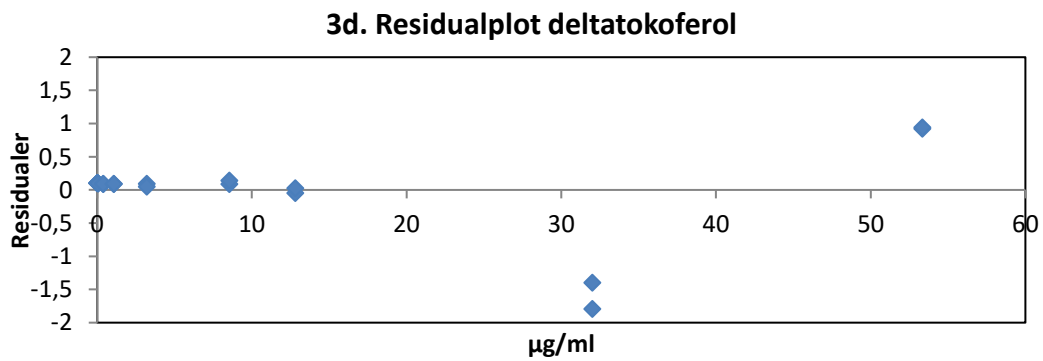
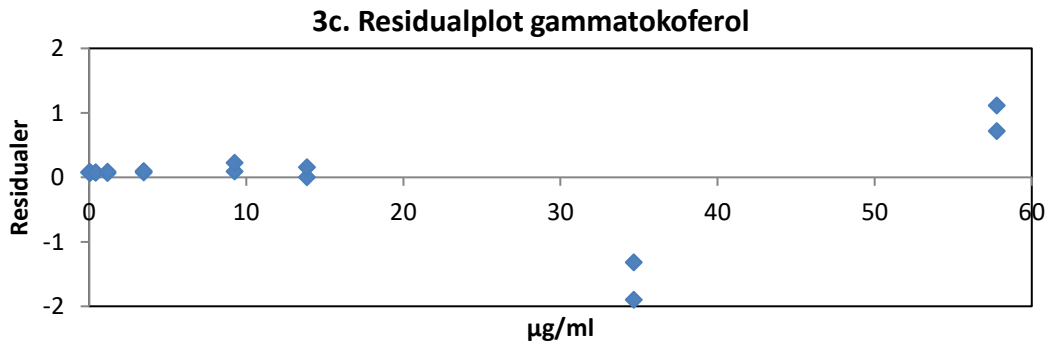
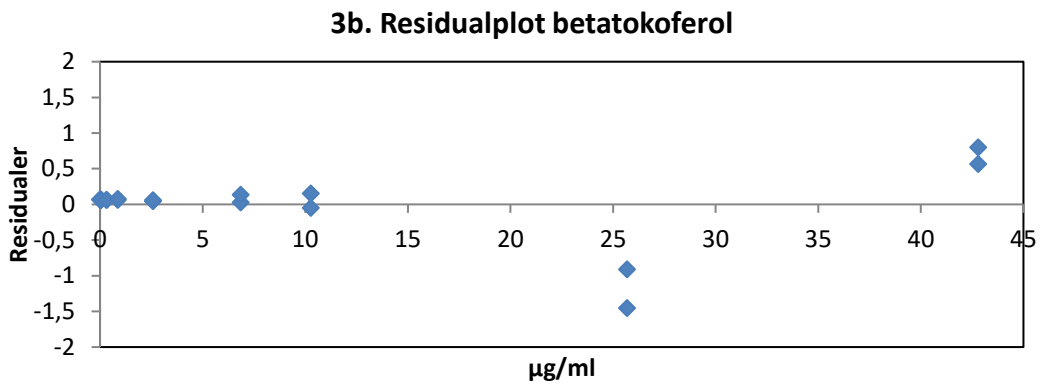
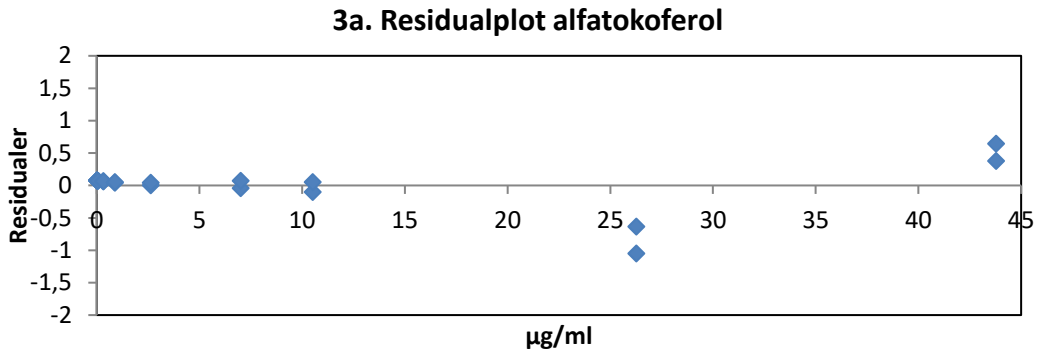


Bilde 3 Kromatogram for standardløsning level 3, cirka 0,05-0,07 mg/l konsentrasjon injisert i HPLC.



Bilde 4 Kromatogram for standardløsning level 10, cirka 40-60 mg/l konsentrasjon injisert i HPLC for enkle tokoferoler.

Residualene (forskjellen mellom observert og forventet (DA: forutsagt y-verdi) er plottet mot konsentrasjonen. Figurene 3a-d er fine og viser at punktene fordeler seg tilfeldig rundt x-aksen (null-verdien), hvilket et tegn på at kurven er lineær. Siden kurven er lineær, velger vi for praktisk bruk   bruke bare 5 standardkurvepunkter i metoden A121 Tokoferolprofilen.



Figur 3a, 3b, 3c og 3d Residualplottene for α -, β -, γ - og δ -tokoferoler analysert 12.11.2020.

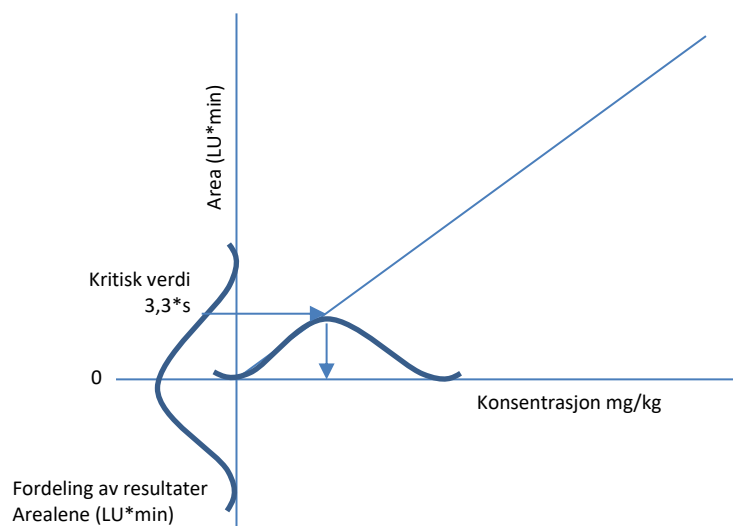
5.2 Deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen

Deteksjonsgrensen ble beregnet på slik at først ble målt arealene (LU*min) cirka 1 minutt mellomrom for hver tokoferol. Bildene 5-7 viser eksempel på beregningsmåte for deteksjonsgrensen. Det ble tatt med 29 blankprøver (n=29) fra 7 forskjellige batcher. Rådata for blankprøver ligger i vedlegg 6 og standardavvik (s) ble beregnet ut ifra disse målingene. Siden baselinjen ble korrigert som null av programmet, ble kritisk verdi kalkulert som $3,3*s$ (formel 15). Standardkurven ble brukt for å finne riktig konsentrasjon for deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen. Kvantifiseringsgrensen ble bestemt som $10*s$.

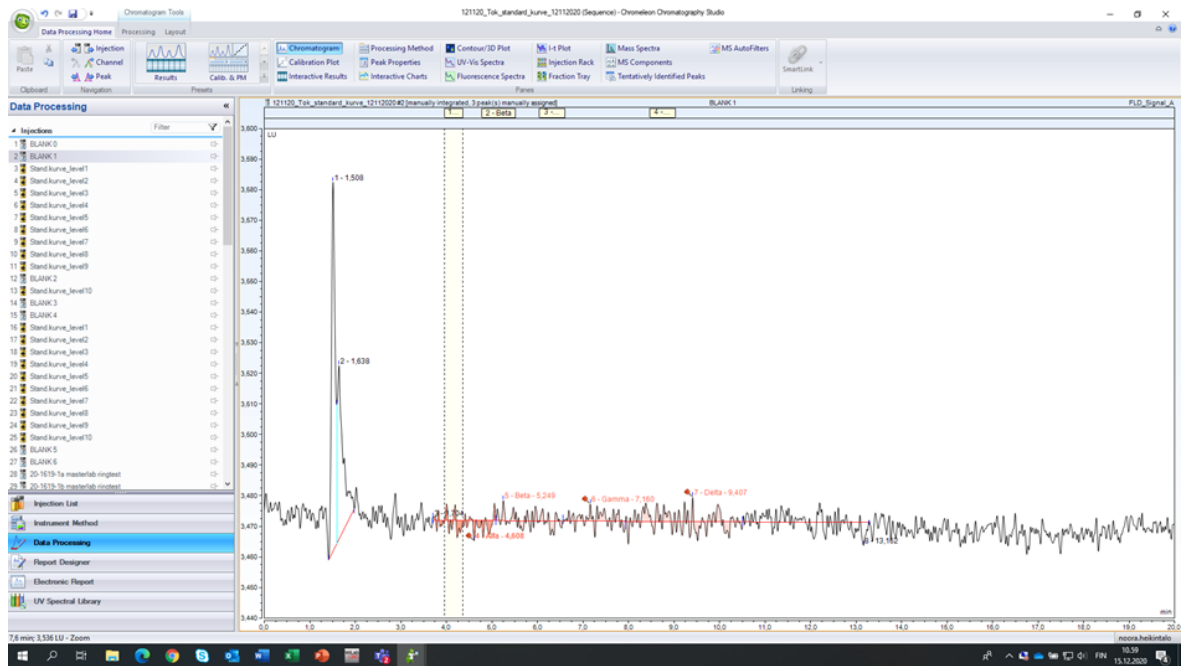
Deteksjonsgrensen ble bestemt til å være 0,01 mg/l og kvantifiseringsgrensen 0,02 mg/l for hver tokoferol injisert på HPLC (se tabell 12 og 13).

Formel 15 Deteksjonsgrense

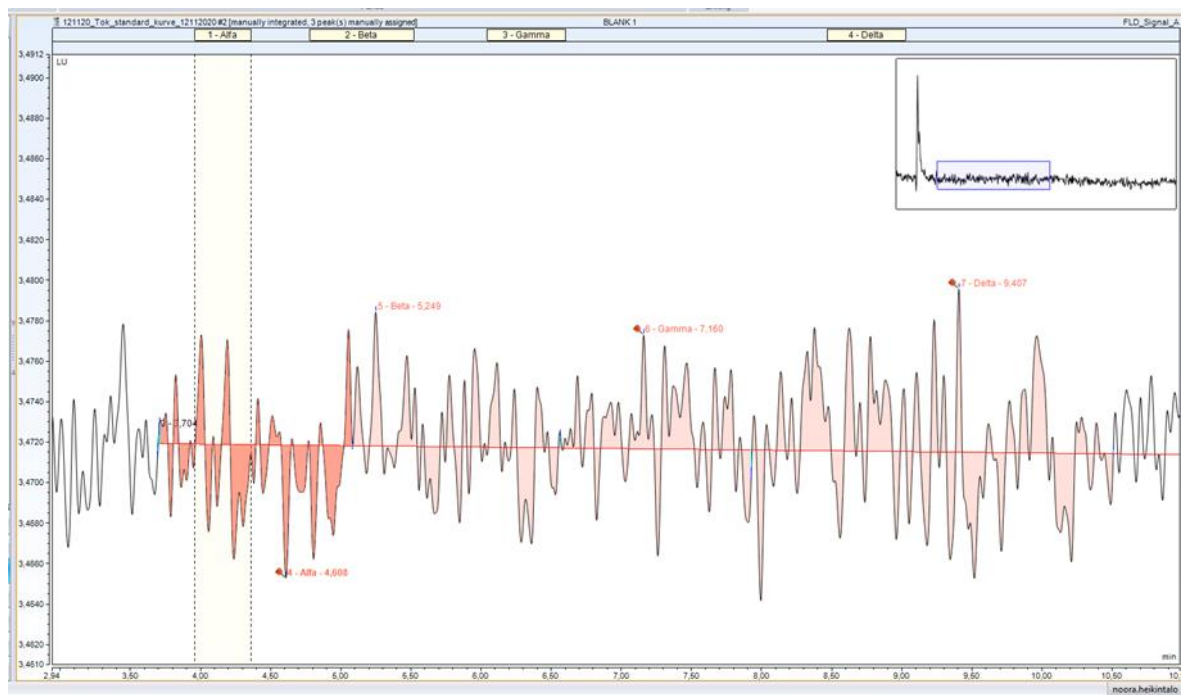
$$\text{Kritisk verdi} = \text{Deteksjonsgrense} = X_0 + (1,645 \times s + 1,645 \times s)$$



Bilde 5 Bruk av standardkurven for å beregne deteksjonsgrensen.



Bilde 6 Kromatogram for blank. (12.11.2020, blank 2).



Bilde 7 Nærbilde av kromatogram for blank (12.11.2020, blank 2) som viser hvordan arealene av tokoferolene for blankprøven ble beregnet.

Tabell 12 Gjennomsnitt \bar{x} , standardavvik s , kritisk verdi $3,3*s$ for deteksjonsgrensen og kritisk verdi $10*s$ for kvantifiseringsgrensen av areal (LU*min) for hver tokoferol i blankprøver (n=29).

Areal (LU*min)					
Blankprøver	Gjennomsnitt (n=29)	Standardavvik	Kritisk verdi (y)	Kritisk verdi (y)	Heldningskoeffisienten (a)
Tokoferol	\bar{x}	s	$3,3*s$	$10*s$	
Alfa	0,0023	0,0027	0,0088	0,0266	0,9950
Beta	0,0028	0,0037	0,0124	0,0375	1,5417
Gamma	0,0021	0,0023	0,0077	0,0233	1,5476
Delta	0,0019	0,0015	0,0050	0,0153	1,6468

Tabell 13 Beregnet og bestemt deteksjonsgrensen (mg/l) og kvantifiseringsgrensen (mg/l) til hver tokoferol med hjelp av kritiske verdier (y).

Tokoferol	Beregnet		Bestemt	
	Detekssjonsgrense (x=y/a)	Kvantifiseringsgrense (x)	Detekssjonsgrense (x=y/a)	Kvantifiseringsgrense (x)
	LoD (mg/l)	LoQ (mg/l)	LoD (mg/l)	LoQ (mg/l)
Alfa	0,0088	0,0267	0,01	0,02
Beta	0,0080	0,0243	0,01	0,02
Gamma	0,0050	0,0151	0,01	0,02
Delta	0,0031	0,0093	0,01	0,02

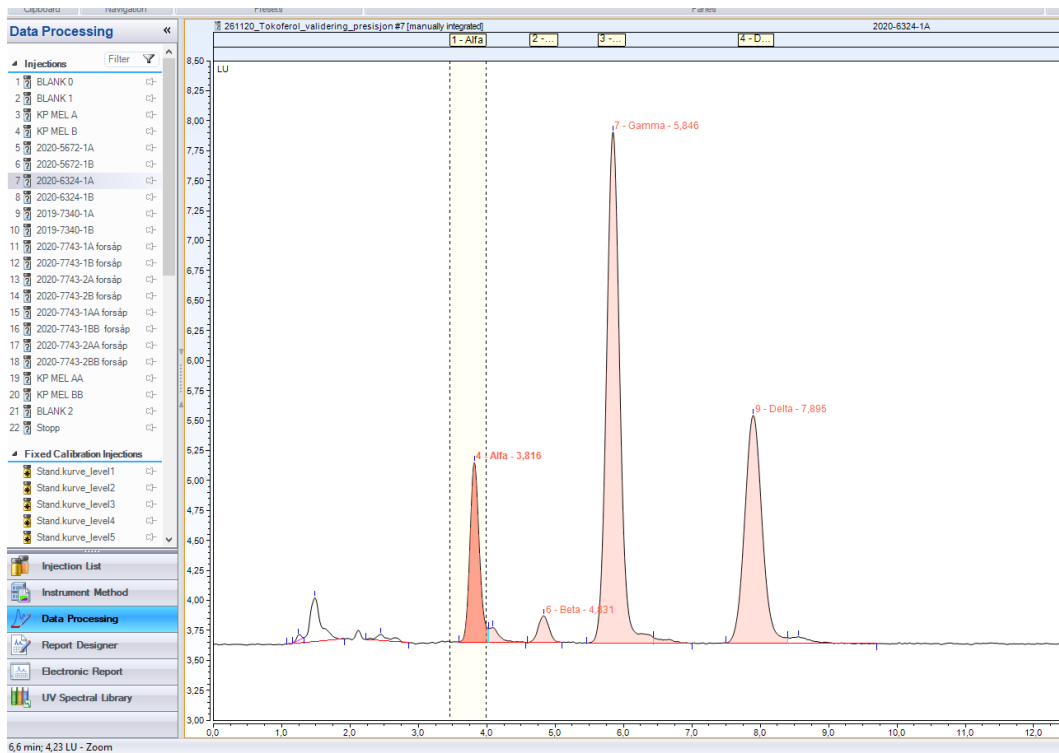
5.3 Måleområde

Etter validering av deteksjons- (LoD) og kvantifiseringsgrensen (LoQ) til metoden ble det beregnet måleområdets nedre grense ut ifra forventet innhold i ulike prøvematerialer, prøveinnveiinger og fortynninger. Nedre grensen ble bestemt 0,04 mg/l som er to ganger kvantifiseringsgrensen. Ved metodens bestemt innveiling (0,5 g) og fortynning (25 ml) beregnes nedre måleområde 2 mg tokoferol/kg. Ifølge standardkurven (bilde 6) fungerer dette konsentrasjonsnivået utmerket for fiskefôr og fôringredienser: fiskemel og oljer.

Øvre måleområde er justerbar siden høye konsentrasjoner kan fortynnes mer for eksempel i stedet for å bruke 25 ml målekolbe kan man bruke 50 ml, 100 ml eller 250 ml målekolbe for fortynningen. Øvre måleområde settes for alle praktiske hensyn til 100 000 mg/kg. Måleområdet er definert ut fra det lineare området for metoden og topphøyde i kromatogrammene. Bilde 8 viser kromatogram for fiskemel (prøve-ID 2019-6324-01) hvor konsentrasjon av betatokoferol er 3,98 mg/kg.

Tabell 14 Nedre måleområde for tokoferol innhold (mg/kg) for fiskefôr og fôringredienser; fiskemel og oljer analysert i HPLC ved bestemt innveiling og fortynning.

Prøvetype	Nedre måleområde (mg/kg)	Innveiling (g)	Fortynning (ml)	Nedre måleområde (mg/l)
Fiskefôr og fôringredienser	2	0,5	25	0,04



Bilde 8 Kromatogram for fiskemel 2019-6324-01A analysert 26.11.20. Konsentrasjon av alfatokoferol er 18,9 mg/kg, betatokoferol 4,1 mg/kg, gammatokoferol 40,1 mg/kg og deltatokoferol 23,9 mg/kg.

5.4 Riktighet

For å vurdere metodens riktighet ble det benyttet sertifiserte referansematerialer av plante- og fiskeoljer fra DGF 26. ringtesten og fiskefôr fra Masterlab ringtest 2020. Alle datasettene er ikke normalfordelt, men vi antar at med flere observasjoner, skulle observasjonene i hvert datasett være normalfordelt.

DGF ringtestprøver (2020-7743-1 og 2020-7743-2) var oljer og Masterlab var fiskefôr (2020-1619-1). Det ble utført 16 ekte paralleller på 2020-7743-1, 12 på 2020-7743-2 og 5 på 2020-1619-1. Det ble også testet om forsåpningen har påvirkningen til resultater (tabell 15). Det ble analysert 11 paralleller uten forsåpning og 5 paralleller med forsåpning (opparbeiding lik som tørrprøver) på oljeprøve 2020-7743-1. På 2020-7743-2 var det 9 paralleller som ble analysert som olje uten forsåpning og 3 paralleller som ble analysert som tørrprøve med forsåpning.

Tabell 15 Oppsummering av DGF og Masterlab sine ringtestprøver og antall av parallelle analysert i Biolab.

Ringtest Prøve ID	Prøve innhold	Nofima Biolab Journal- nummer	Prøve- type	Antall parallelle analysert i Biolab (n)	Antall parallelle uten forsåpning (n)	Antall parallelle med forsåpning (n)
DGF Sample A	Blanding av planteolje og fiskeolje	2020- 7743-1	Olje	16	11	5
DGF Sample B	Olivenolje	2020- 7743-2	Olje	12	9	3
Masterlab (Fish feed)	Fiskefôr	2020- 1619-1	Fôr	5	-	5

Siden resultater på DGF final rapport (26th DGF Proficiency Test on Fat Analysis 2020) var presentert som % (w/w), ble de omregnet som mg/kg (vedlegg 4). Resultater i Masterlab final rapport (Aquaculture ring test 2020 final report, V1) var rapportert som E-vitamin (som alfatokoferylacetat) og derfor ble resultater omregnet også som mg/kg (vedlegg 4). Gjennomsnitt, standardavvik og antall av laboratorier som deltok i DGF og Masterlab ringtest er presentert i tabell 16.

Tabell 16 Gjennomsnitt (mg/kg), standardavvik og antall av laboratorier med i DGF og Masterlab sine ringtestprøver (2020-7743-1, 2020-7743-2 og 2020-1619-1). (Informasjon hentet fra final rapport av DGF og Masterlab).

Ringtest arrangør	Prøve	Tokoferol	Gjennomsnitt mg/kg	Standardavvik mg/kg	Antall av lab (n)
DGF	2020- 7743-1	Alfa	994,33	124,48	26
		Beta	71,08	14,36	24
		Gamma	2057,89	106,43	26
		Delta	581,13	81,02	26
	2020- 7743-2	Alfa	376,14	111,59	27
		Beta	37,05	8,67	25
		Gamma	1337,72	85,58	27
		Delta	403,87	69,77	27
Masterlab	2020- 1619-1	Alfa	301,18	63,25	12

5.5 Sammenligning av ringtestresultater fra DGF, t-test

En viktig forutsetning for at en t-test skal gi et riktig resultat er at observasjonene er uavhengige og tilnærmet normalfordelte, men forutsetningen om normalfordeling trenger ikke å være eksakt oppfylt. Gjennomsnittet av uavhengige observasjoner tenderer nemlig mot å være normalfordelt selv om fordelingen til enkeltobservasjonene ikke er det. Resultatene på 2020-7743-1 og 2020-7743-2 er uavhengige, men de er ikke normalfordelte.

I tillegg ble det benyttet F-test for å undersøke om det er signifikante forskjeller mellom varianser av ringtestprøver (2020-7743-1 og 2020-7743-2) analysert på DGF og Biolab. Resultatene av F-testen er vist i vedlegg 7, vedlegg tabell 13. Det var ikke signifikant forskjell på variansen på 2020-7743-1 for

gamma- og deltatokoferol og på 2020-7743-2 for beta- og gammatokoferol. DGF hadde i høyere varians på alle tokoferoler enn Biolab bortsett på gammatokoferol, derfor aksepterer vi tallene.

T-test brukes som parametrisk metode for å undersøke om det finnes signifikante forskjeller mellom gjennomsnittet av ringtestprøver (2020-7743-1 og 2020-7743-2) på DGF og Biolab. Siden varianser på DGF og Biolab var ikke lik på alle tokoferoler, analyseres t-testen som "to utvalg med antatt ulike varianser" for alle tokoferoler. Resultatene er vist i tabell 17 og 18.

Tabell 17 Gjennomsnittet, standard avvik, varians, antall observasjoner (n) og t-test resultater (beregnet i Excel ved bruk av "to utvalg med antatt ulike varianser") for DGF ringtestprøver 2020-7743-1 og 2020-7743-2 for alfa- og betatokoferol.

Tokoferol	Alfa				Beta			
	2020-7743-1		2020-7743-2		2020-7743-1		2020-7743-2	
Prøve-ID								
Laboratorie	DGF	Biolab	DGF	Biolab	DGF	Biolab	DGF	Biolab
Gjennomsnitt (mg/kg)	1002,11	969,27	399,63	397,85	71,53	85,50	36,89	52,26
Standard avvik (mg/kg)	112,98	65,28	87,51	20,78	11,58	4,71	6,71	4,36
Varians (mg/kg)	12764,30	4260,83	7658,40	432,01	134,12	22,21	44,97	18,98
Antall observasjoner (n)*	23	16	23	12	22	16	21	12
Frihetsgrad (fg)	36		26		30		30	
t-Stat (absolutt verdi)	1,146		0,093		5,106		7,970	
T-kritisk (tosidig)	2,028		2,056		2,042		2,042	
p-verdi (tosidig)	0,259		0,927		<0,001		<0,001	

*Det er ikke tatt med DGF resultater som hadde z-score over 2,5.

Tabell 18 Gjennomsnittet, standard avvik, varians, antall observasjoner (n) og t-test resultater (beregnet i Excel ved bruk av "to utvalg med antatt ulike varianser") for DGF ringtestprøver 2020-7743-1 og 2020-7743-2 for gamma- og deltatokoferol.

Tokoferol	Gamma				Delta			
	2020-7743-1		2020-7743-2		2020-7743-1		2020-7743-2	
Prøve-ID								
Laboratorie	DGF	Biolab	DGF	Biolab	DGF	Biolab	DGF	Biolab
Gjennomsnitt (mg/kg)	2059,78	1888,54	1341,63	1407,07	573,97	571,23	402,95	462,22
Standard avvik (mg/kg)	117,61	147,02	90,93	94,29	60,25	46,28	65,25	39,90
Varians (mg/kg)	13831,89	21614,92	8268,91	8890,00	3630,53	2141,86	4257,93	1591,85
Antall observasjoner (n)*	23	16	24	12	22	16	23	12
Frihetsgrad (fg)	28		21		37		32	
t-Stat (absolutt verdi)	3,876		1,986		0,158		3,325	
T-kritisk (tosidig)	2,048		2,080		2,028		2,037	
p-verdi (tosidig)	<0,001		0,060		0,875		0,002	

*Det er ikke tatt med de DGF resultater som hadde z-score over 2,5.

Nullhypotesen for t-test er at det finnes ingen forskjell mellom gjennomsnitt på DGF og Biolab. Når p-verdien er 0,05 eller lavere (95 % konfidens) betyr det at nullhypotesen forkastes som kan tolkes at det finnes statistiske signifikante forskjeller mellom de to datasettene.

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i alfatokoferolresultater mellom de to datasettene. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i gammatokoferol resultater for 2020-7743-2 eller deltatokoferol

resultater for 2020-7743-1 mellom de to datasettene. Gjennomsnitt på betatokoferol har signifikant forskjell mellom de to datasettene for begge to ringtestprøver (p-verdi <0,001). Siden gjennomsnitt av tokoferoler på Biolab er enten lavere eller høyere enn DGF resultat, vurderes resultat at det finns ingen trend i tallene. Siden Biolab har også få observasjoner per prøve (n<16) anses riktigheten av resultater dermed å være akseptabel.

5.5.1 Sammenligning av ringtestresultater fra DGF, z-score og E_n-verdi

Z-score ble regnet ifølge formel 13 og det ble brukt gjennomsnitt- og standardavvikresultater fra ringtest rapport som er beskrevet også i 5.4 Riktighet i tabell 16 For alle datasettene antar vi at de er normalfordelt.

Z-score resultatene for begge DGF ringtestprøvene både for alle tokoferolene, uten forsåpning og med forsåpning ligger i det godkjente området (-2 > z-score < 2) (tabell 19-22). En Z-score var -2,31, som er marginalt utenfor, tilhører til gammatokoferol for prøve 2020-7743-1 med forsåpning. Vi godkjenner dette som et akseptabelt avvik. Z-scorene på Biolab har variasjon mellom negative og positive tall og det finns ingen systematisk trend. Alle E_n-verdiene ligger i det godkjente området mellom -1 og 1. Ny prøvemateriell: fiskefôr og fôringredienser (fiskemel og oljer) anses å være sammenlignbar med prøvemateriale som ble undersøkt i referansemetoden. Ifølge z-score og E_n-verdi -resultater anses riktigheten av resultater dermed å være godkjent.

Tabell 19 Biolab sine resultater, gjennomsnitt og z-score, for alfatokoferol på 2020-7743-1 og 2020-7743-1 med alle parallellene, uten forsåpning og med forsåpning.

Alfa	2020-7743-1			2020-7743-2		
	Alle parallellene (n=16)	Uten forsåpning (n=11)	Med forsåpning (n=5)	Alle parallellene (n=12)	Uten forsåpning (n=9)	Med forsåpning (n=3)
Gjennomsnitt mg/kg	969,27	980,56	944,45	397,85	400,31	390,47
Z-score	-0,20	-0,11	-0,40	0,19	0,22	0,13
E _n -verdi	-0,16			0,30		

Tabell 20 Biolab sine resultater, gjennomsnitt og z-score, for betatokoferol på 2020-7743-1 og 2020-7743-1 med alle parallellene, uten forsåpning og med forsåpning.

Beta	2020-7743-1			2020-7743-2		
	Alle parallellene (n=16)	Uten forsåpning (n=11)	Med forsåpning (n=5)	Alle parallellene (n=12)	Uten forsåpning (n=9)	Med forsåpning (n=3)
Gjennomsnitt mg/kg	85,50	85,84	84,74	52,26	54,11	46,74
Z-score	1,00	1,03	0,95	1,76	1,97	1,12
E _n -verdi	0,52			0,90		

Tabell 21 Biolab sine resultater, gjennomsnitt og z-score, for gammatokoferol på 2020-7743-1 og 2020-7743-1 med alle parallellene, uten forsåpning og med forsåpning.

Gamma	2020-7743-1			2020-7743-2		
	Alle parallellene (n=16)	Uten forsåpning (n=11)	Med forsåpning (n=5)	Alle parallellene (n=12)	Uten forsåpning (n=9)	Med forsåpning (n=3)
Gjennomsnitt mg/kg	1888,54	1923,44	1811,75	1407,07	1435,33	1322,29
Z-score	-1,59	-1,26	-2,31	0,81	1,14	-0,18
E _n -verdi	-0,43			0,23		

Tabell 22 Biolab sine resultater, gjennomsnitt og z-score, for deltatokoferol på 2020-7743-1 og 2020-7743-1 med alle parallellene, uten forsåpning og med forsåpning.

Delta	2020-7743-1			2020-7743-2		
	Alle parallellene (n=16)	Uten forsåpning (n=11)	Med forsåpning (n=5)	Alle parallellene (n=12)	Uten forsåpning (n=9)	Med forsåpning (n=3)
Gjennomsnitt mg/kg	571,23	584,21	542,68	462,22	479,40	410,69
Z-score	-0,12	0,04	-0,47	0,84	1,08	0,10
E _n -verdi	-0,07			0,49		

5.5.2 Sammenligning av ringtestresultater fra Masterlab, t-test, z-score og E_n-verdi

Resultatene av statistiske tester for Masterlab ringtest er presentert i tabell 23. Z-score for Biolab er god og ligger i det godkjente området mellom -2 og 2. Alle E_n-verdiene ligger også i det godkjente området mellom -1 og 1. Ifølge t-testen finnes det heller ingen forskjell mellom gjennomsnitt på Masterlab og Biolab (p-verdi > 0,05). Riktigheten av resultater anses dermed å være akseptabel.

Tabell 23 Gjennomsnittet, standard avvik, varians, antall observasjoner (n), z-score, E_n-verdi og t-test* resultater (beregnet i Excel ved bruk av "to utvalg med antatt ulike varianser") for Masterlab ringtestprøve 2020-1619 for alfatokoferol.

2020-1619-1, alfatokoferol	Masterlab	Biolab
Gjennomsnitt (mg/kg)	301,17942	280,42247
Standard avvik (mg/kg)	42,38	27,20
Varians (mg/kg)	1796,32388	740,09808
Antall observasjoner (n) for t-test*	10	5
z-score	-0,490	
E _n -verdi	0,114	
Frihetsgrad (fg)	12	
t-Stat (absolutt verdi)	1,14672	
T-kritisk (tosidig)	2,17881	
p-verdi (tosidig)	0,27385	

*Det er ikke tatt med Masterlab resultater som hadde z-score over 2,5.

5.6 Presisjon

Presisjonsdata fra ekstern internasjonal kollaborativ undersøkelsen som ble presentert i tabell 1a og 1 b i kapittel «2.2 Grad av ekstern validering og intern verifiseringsplan» viste seg at metodens RSD_r % ligger i området 3,0-11,1 og RSD_R % ligger i området 6,1-19,8 (NS-EN 12822:2014). Relativ standard avvik for rebeterbarhet (RSD_r %) i Biolab beregnet i tabell 24 ligger i området 3,72-5,69 og derfor presisjon anses dermed å være akseptabel.

Tabell 24 Antall prøver og replikater, gjennomsnitt (mg/kg) og relativ standard avvik for rebeterbarhet RSD_r ,% for tokoferoler analysert i Biolab.

Biolab	α - tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Antall prøver	5	5	5	5
Antall replikater	24	24	24	24
Gjennomsnitt (mg/kg)	424,49	34,63	799,05	252,03
S_r	24,16	1,63	29,69	10,37
r	68,33	4,60	83,97	29,33
Relativ standard avvik for rebeterbarhet RSD_r ,%	5,69	4,69	3,72	4,11

Siden prøvemateriale fiskefôr og fôringredienser (fiskemel og oljer) er nytt ble det undersøkt presisjon nærmere av 3 prøver: fiskemel (2020-7919-1), planteolje (2020-7743-1) og fiskefôr (2020-5672-1). Relativ standard avvik for rebeterbarhet (RSD_r %) beregnet i tabell 25 og 26 ligger i området 1,49-10,38. For lave resultater (<10 mg/kg tokoferol) ser vi at standard avvik for rebeterbarhet er høye (RSD_r % er cirka 10). I tillegg ser vi at standard avvik for rebeterbarhet (RSD_r %) for alfatokoferol og gammatokoferol i fiskefôr (2020-5672-1) er også høy (RSD_r % er cirka 10) for høye resultater (> 80 mg/kg tokoferol).

Beregnet presisjon for en ny prøvemateriell: fiskefôr og fôringredienser (fiskemel og oljer) anses å være sammenlignbar med prøvemateriale som ble undersøkt i referansemotoden. Presisjon anses dermed å være akseptabel.

Tabell 25 Antall prøver og replikater, gjennomsnitt (mg/kg) og relativ standard avvik for rebeterbarhet RSD_r ,% for alfa og betatokoferoler analysert i Biolab.

Biolab	Fiskemel (2020-7919-1, KP)	Planteolje (2020-7743-1)	Fiskefôr (2020-5672-1)	Fiskemel (2020-7919-1, KP)	Planteolje (2020-7743-1)	Fiskefôr (2020-5672-1)
År	2020			2020		
Tokoferol	alfatokoferol			betatokoferol		
Antall replikater	5	6	4	5	6	4
Gjennomsnitt (mg/kg)	29,08	985,32	520,59	3,13	86,59	5,98
RSD_r , %	2,922	1,791	10,000	10,380	1,909	9,076

Tabell 26 Antall prøver og replikater, gjennomsnitt (mg/kg) og relativ standard avvik for rebeterbarhet RSDr,% for gamma- og deltatokoferoler analysert i Biolab.

Biolab	Fiskemel (2020-7919-1, KP)	Planteolje (2020-7743- 1)	Fiskefôr (2020-5672- 1)	Fiskemel (2020-7919-1, KP)	Planteolje (2020-7743- 1)	Fiskefôr (2020-5672- 1)
År	2020			2020		
Tokoferol	gammatokoferol			deltatokoferol		
Antall replikater	5	6	4	5	6	4
Gjennomsnitt (mg/kg)	31,64	1920,47	92,44	14,18	581,36	28,44
RSDr, %	1,503	1,966	6,790	3,596	2,324	1,489

5.7 Måleusikkerhet

I denne valideringen er det kun den eksperimentelle måleusikkerheten som blir beregnet (tabell 27 og rådata finnes i vedlegg 9. Måleusikkerheten beregnes for måleområde >2 mg/kg.

Resultatspredning for betatokoferol er stor, vanligvis ligger resultater under 10 mg/kg, men oljeprøver har også høye betatokoferol verdier cirka 100 mg/kg. Selv om presisjon ble funnet til å være godkjent, finnes det få sammenlignbare resultater for betatokoferol under 5 mg/kg. Resultater rapportert fra det eksternt akkreditert laboratorium har kvantifiseringsgrense (LOQ) som 5 mg/kg, derfor ble måleusikkerheten for betatokoferol beregnet i to deler: resultater mellom 2-10 mg/kg og resultater over 10 mg/kg.

Måleusikkerhets (U) RSD % (+/-2s) for resultater >2 mg/kg ble funnet til å være 15 % for alfatokoferol, 21 % for gammatokoferol og 25 % for deltatokoferol. Måleusikkerhets (U) RSD % (+/-2s) for betatokoferol ble funnet til å være 32 % for resultater 2-10 mg/kg og 42 % for resultater >10 mg/kg.

Det ble bestemt å gjøre forenkling for måleusikkerheten siden vi må tas hensyn til resultatrapportering til kundene. Bestemt måleusikkerhets (U) RSD % (+/-2s) for resultater >2 mg/kg ble da 15 % for alfatokoferol, 35 % for betatokoferol og 25 % for gamma- og deltatokoferoler.

Tabell 27 Antall prøver og replikater, gjennomsnitt (mg/kg), kombinert måleusikkerhet (Uc), ekspandert kombinert måleusikkerhet (U) og beregnet og bestemt måleusikkerhets (U) RSD % (+/-2s) for tokoferoler analysert i Biolab.

Biolab	α - tokoferol	β -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Området	Hele >2 mg/kg	2-10 mg/kg	>10 mg/kg	Hele >2 mg/kg	Hele >2 mg/kg
Antall prøver	11	8	3	11	11
Antall replikater	22	16	6	22	22
Gjennomsnitt (mg/kg)	271,69	4,63	46,19	341,92	108,98
$U_{\text{Nofima-}\bar{x}}$	14,27	0,71	9,46	33,99	13,02
U_{Nofima}	15,46	0,22	2,17	12,70	4,48
U_c	21,0	0,7	9,7	36,3	13,8
U	42,1	1,5	19,4	72,6	27,5
% RSD U (+/- 2s)	15	32	42	21	25
Bestemt % RSD U (+/- 2s)	15	35		25	25

5.8 Måleusikkerhetsbidrag

Det ble foretatt en vurdering av bidrag til måleusikkerheten i metoden. Nofima Biolab har en akkreditert metode Biolab A92 Astaxanthin-Panaferd og siden metodeutførelsen fra denne metoden er relativt like med analysemetoden for tokoferoler, ble kilde og bidrag til måleusikkerhet vurdert ut ifra denne metoden. Måleusikkerhets bidrag for forsåpning ble bestemt av basert på optimaliseringsanalyser presentert i vitenskapelige tidsskrifter som har blitt skrevet i kapittel 2.3. 'Optimalisering av metodeparameter'.

Totalt ble det satt opp 15 punkter (13 + 2) som er kritisk i forhold til metodeutførelsen (tabell 28). Det ble satt opp 3 punkter som har stort bidrag til måleusikkerheten: spektrofotometrisk bestemmelse av konsentrasjon av hver enkelt tokoferol standardløsningen, pipettering av ekstrakt og HPLC-analyse (injeksjonsvolum, separasjon og integrering).

Tabell 28 Måleusikkerhetsbidrag. Kilde til måleusikkerhet og bidrag til måleusikkerhet (lite, middels og stort).

Kilde til måleusikkerhet	Bidrag til måleusikkerhet		
	Lite bidrag	Middels bidrag	Stort bidrag
Reagenser			
Tillaging av eluent (5 % tetrahydrofuran i heptan), ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) og lut (20 % kaliumhydroksid (KOH) i vann)	x		
Standardkurven			
Tillaging av stamløsninger og standardløsninge av hver enkelt tokoferol	x		
Spektrofotometer, kons.bestemmelse av std.løsning ^a			x
Tillaging av blandingsstandard av α -, β -, γ - og δ -tokoferol, tillaging av standardkurven og HPLC-analysen av standardkurven		x	
Opparbeiding av prøve			
Håndtering av prøve, oppmaling, mørkt og kaldt	x		
Innveiing prøve (homogenitet ved 0,5 g innveiing)		x	
Forsåpning			
7.1. 80 grader temperatur i 30 minutter	x		
7.2. Mengden av luten: 0,5 ml		x	
Risting		x	
Sentrifugering		x	
Ekstraksjon	x		
Pipettering av ekstrakt			x
Fylling av målekolber opp i merket	x		
HPLC-analyse (injeksjonsvolum, separasjon og integrering)			x
^a Et potensielt stort bidrag til måleusikkerhet på grunn av at tokoferoler er ustabil samt risiko for at løsemiddelet fordampes. Nøyaktigheten til spektrofotometeret er kritisk pga. av at dette er en ekstern standard metode. Målingen må gjøres på kalibrert instrument og umiddelbart etter at løsningen er tillaget.			

6 Konklusjon

Ut ifra det statistiske grunnlaget fra de utførte analysene hos Nofima Biolab, ringtester (DGF og Masterla), ekstern laboratorier og den internasjonale kollaborative metodeavprøvingen anses riktigheten og presisjonen til å være godkjent.

Referansemetoden angir bruk av et kalibreringspunkt ved lineær kalibrering. Under validering ble det testet det nødvendige mengde av kalibreringspunktene (totalt 10 ulike konsentrasjonsnivåer) og standardkurven ble vurdert å være lineær. Når standardkurven analyseres på nytt, vurderes det at 4-6 kalibreringspunkter er godkjent mengde.

En nedskalering av referansemetoden for å minske forbruket av kjemikalier ble undersøkt i validering. I tillegg ble det undersøkt å forenkle enkelte arbeidstrinn, for eksempel i stedet for evaporasjon ble ekstrakt direkte fortynnet til ønsket konsentrasjon. Alle analysene på Biolab ble gjennomført som metodeutførelsen er beskrevet i kapittel 3.1 'Metodeparameter' og i tabell 29. Siden det ble ikke funnet at nedskalering eller forenkling av arbeidstrinn har påvirkning til resultater, godkjennes de valgte metodeparameterne.

Tabell 29 Oppsummering over variasjon av metodeparameter.

E vitamin analyse	Prøve mengde (g)	KOH %	EtOH (ml)	Forsåpningstid (min)	Forsåpnings-temperatur (C°)	KOH mengde (ml)
Nofima Biolab	0,5	20	4	30	80	0,5

Metoden har et måleområde (<2 mg/kg) og akseptert avvik mellom paralleller (RSD %) er 10 for alle tokoferolene. Måleusikkerheten (U) % RSD (+/- 2s) varierer mellom tokoferolene og oversikten over måleusikkerhet (U) % RSD (+/- 2s) er vist i tabell 30.

Tabell 30 Oversikt over måleområde, måleusikkerhet (U) RSD % (+/- 2) og akseptert avvik mellom paralleller for måleområdene.

Biolab	Alfa	Beta	Gamma	Delta
Måleområde (mg/kg)	> 2 mg/kg	> 2 mg/kg	> 2 mg/kg	> 2 mg/kg
Akseptert avvik mellom paralleller (RSD %)	10	10	10	10
Måleusikkerhet (U) % RSD (+/- 2s)	15	35	25	25

Metoden er ferdig validert og gyldig fra og med 3.5.2021 for prøvetyper av fôr og fôringredienser: fiskemel og oljer.

7 Referanser

- CAS Common Chemistry. (A) CAS, a division of the American Chemical Society, n.d. (+)- α -Tocopherol. https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=59-02-9. (referert 25.3.2021) (CAS RN: 59-02-9).
- CAS Common Chemistry. (B) CAS, a division of the American Chemical Society, n.d. Tocopheryl acetate. https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=58-95-7. (referert 25.3.2021). (CAS RN: 58-95-7).
- ISO (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons (ISO 13528), ISO (International Organization for Standardization): 66.
- Norsk Standard. 2014. NS-EN 12822:2014. Næringsmidler. Bestemmelse av vitamin E med væskrokromatografi (HPLC). Måling av α -, β -, γ - og δ -tokoferol. Foodstuffs. Standard Norge.
- NKL-Prosedyre. 2009. NR.4. Validering av kjemiske analysemetoder. Nordisk metodikomite for næringsmidler.
- Finglas P.M., van den Berg H., de Froidmont-Görtz I. 1997. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421) and lyophilized brussels sprouts powder (CRM 431). Vitamins A, D3 & E in CRM 122; C, D3, E & niacin in CRM 421, and C & niacin in CRM 431. Report EUR 18039. European Commission bcr information. Reference materials. ISSN 1018-5593.
- Ryynänen. M., Lampi AM., Salo-Väänänen P., Ollikainen V., Piironen V. 2004. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals.
- Ueda. T. og Igarashi. O. 1987. New solvent system for extraction of tocopherols from tissue after saponification as a pretreatment for HPLC determination. Journal of Micronutrient Analysis 3, 15-25.

Vedlegg 1 Biolab a 121 tokoferolprofilen

1. Anvendelsesområde

Fiskefôr, fiskemel, oljer og fôringredienser.

2. Referanse

Norsk Standard NS-EN 12822:2014. Næringsmidler. Bestemmelse av vitamin E med væskekromatografi (HPLC). Måling av α -, β -, γ - og δ -tokoferol.

3. Prinsipp

Vitamin E bestemmes med væskekromatografi (HPLC) ved hjelp av fluorescensdeteksjon.

Metodeprinsippet er forsåpning av prøven og ekstraksjon av uforsåpbare materialet. Mengden av α -, β -, γ - og δ -tokoferol beregnes ved hjelp av standardkurve.

4. Utstyr og kjemikalier

A Utstyr

1. Spektrofotometri
2. HPLC (Væskekromatograf) Agilent 1200
 - a) Fluorescensdetektor excitation 295 nm og emission 330nm
 - b) Automatisk prøveinjektor, volumet 20 μ l
 - c) Pumpehastighet 1 ml/min
 - d) Run time 20 minutter
 - e) Kolonne Lichrosorb Si 60, 5 μ m, 125 mm x 4 mm
3. Analysevekt, avlesningsnøyaktighet 0,1 mg
4. Ultralydvannbad
5. Whirlmixer
6. Sentrifuge med swing-out rotor for 10 ml rør
7. Blockheater med nitrogengass
8. Finnpipette (100-5000 μ l)
9. Plastpipette 1 ml
10. Dispenser 2 ml
11. Spatel
12. Glassvare
 - a) Målekolbe, 10-1000 ml
 - b) Målesylinder 25-1000 ml
 - c) Begerglass 25-250 ml
 - d) Begerglass 2000 ml

- e) 10 ml glassrør med kork
- f) Pasteurpipette
- g) Fullpipette (1 ml, 2 ml, 4 ml, 10 ml)
- h) Blåkorkflaske

B Kjemikalie

1. Metanol, HPLC-kvalitet (R112 Eterrom)
2. Etanol absolutt alkohol Prima, 100 % (R210A)
3. n-heptan, HPLC-kvalitet (R112 Eterrom)
4. n-hexan, HPLC-kvalitet (R112 Eterrom)
5. Etylacetat, HPLC-kvalitet (R112 Eterrom)
6. Tetrahydrofuran (THF) HPLC-kvalitet (R112 Eterrom)
7. Kaliumhydroksyd (KOH) (Merck art nr. 5033) (Kjeldahl-rom)
8. Antioksidant, askorbinsyre (Merck art nr. 127) (R113)
9. Destillert vann
10. Calbiochem Tokoferol set (Merck art.nr.613424) (i frys)

C Reagenser

1. Eluent, 5 % tetrahydrofuran i heptan
Mål opp 50 ml tetrahydrofuran i en 50 ml målesylinder og overfør det til 1 liters målekolbe. Fyll opp til merket med heptan og bland.
2. Ekstraksjonsløsningsmiddel, 10 % etylacetat i heksan
Mål opp 100 ml etylacetat i en 100 ml målesylinder og overfør det til 1 liters målekolbe. Fyll opp til merket med heksan og bland.
3. Lut, 20 % kaliumhydroksid (KOH) i vann
Vei inn 200 g KOH i et 2000 ml begerglass og tilsett 800 ml vann og en magnet. Sett på røring til alt er oppløst og løsningen når romtemperatur. Overfør luten til en 1 liters blåkorkflaske og la stå over natt. Vær forsiktig under tilsetting vann, løsning blir ganske varm.
4. Stamløsninger av hver enkelt tokoferol
Løs opp hver α -, β -, γ - og δ -tokoferol ampulle (50 mg av hver tokoferol) med litt etanol (0,40 ml) og overfør til 100 ml målekolber og fyll opp til merket med heksan. Konsentrasjon blir cirka 500 $\mu\text{g/ml}$. Blås med nitrogen. Oppbevares i fryseboks ca. 6 måneder.

5. Standardløsninger av hver enkelt tokoferol

- a) Pipetter ut 2 ml fra hver av stamløsningene til hver sin 10 ml glassrør.
- b) Damp inn til tørrhet på varmeblokk og temperatur mindre enn 50 grader med nitrogen.
- c) Løs gjenværende opp i 5 ml metanol og rist et øyeblikk på whirlmixer.
- d) Pipetter ut hver løsning til hver sin kvartskvett. Bruk metanol som blank.
- e) Mål absorbansen av disse løsningene i spektrofotometer. Se punkt 5.D

6. Blandingsstandard av α -, β -, γ - og δ -tokoferol

Pipetter ut 8 ml fra β -tokoferol stamløsningen og 10 ml fra de tre andre α -, γ - og δ -tokoferol stamløsninger og overfør til 50 ml målekolbe, fyll opp med heksan.

(Konsentrasjon blir cirka 80-120 $\mu\text{g/ml}$ for de øvrige). Oppbevar blandingsstandard i fryseboks ca. 6 måneder.

7. Standardkurven

Fortynn ut blandingsstandard ved bruk av heksan. Standardkurveserien skal ha massekonsentrasjon fra 0,01 $\mu\text{g/ml}$ til 10 $\mu\text{g/ml}$ av hver tokoferol. Se tabell 1 av fortynningsserien for standardserien.

Tabell 1 Fortynningsserien for standardkurve for α -, γ - og δ -tokoferol og β -tokoferol i parentes (). Fortynn ut blandingsstandarder til 10; 3; 0,3; 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Blandingsstandard nivå	Ut pipettering (ml)	Målekolbe (ml)	Konsentrasjon ca. $\mu\text{g/ml}$
Blandingsstandardløsning		50	100
LEVEL 5	5	10	50
LEVEL 4	3	25	12
LEVEL 3	3	100	3
LEVEL 2 (pipetteres fra level 3)	3	25	0,4
LEVEL 1 (pipetteres fra level 3)	0,5	100	0,01

5. Utførelse

A Kalibrering

1. Lag standardløsninger av hver enkelt tokoferol slik beskrevet i punkt C.5.
2. Mål absorbansen av disse løsningene på et spektrofotometer umiddelbart etter tillaging. Bølgelengden er gitt i tabell 2.
3. Analyserer samtidig standardkurveløsninger (C.7.) på HPLC-systemet (umiddelbart etter tillaging). Velg i Chromeleon 'Tok_standardkurve_mal' og lagre filen som 'Tok_standardkurve_ny_dato'.
4. Med hjelp av regneark (Biolab Analyse -> Metodelogg -> standardkurv_MAL) beregne massekonsentrasjon av vitamin E i stamløsninger, ρ , respektive α -, β -, γ - og δ - tokoferol i mikrogram per milliliter ved å bruke formelen (1):

$$\rho = \frac{A \cdot M \cdot 5000}{\epsilon} \quad (1)$$

hvor

ρ massekonsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)

A er absorpsjon verdi av hver tokoferol i en respektiv standard løsning i metanol

ϵ er molar absorpsjon koeffisient i metanol i $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ på spesifikk bølgelengde som beskrevet i tabell 2.

M er molar masse, grams per mol, av hver tokoferol som beskrevet i tabell 2

5000 er fortynningsfaktor

Tabell 2 Beregningsfaktorer. (Norsk Standard, 2014). $\epsilon = (E \cdot M)/10$

Substans	Bølgelengde nm (i metanol)	E $1\%_{1\text{cm}}$	Molar masse (i $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ϵ (i $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
α -tokoferol	292	76	430,7	3273,3
β -tokoferol	296	89	416,7	3708,6
γ -tokoferol	298	91	416,7	3782,0
δ -tokoferol	298	87	402,6	3502,6

Ved avlesing av α -tokoferol på 255 nm (minimum) bør forholdet ved bølgelengdene ligger under $E_{255}/E_{292} = 0,18$. Hvis den ikke gjør, det kan ikke standarden brukes.

5. Legg inn beregnet konsentrasjoner for standardkurv og velg Cal. Type som Lin til 'Tok_standardkurve_ny_dato'-filen i Chromeleon (Data Processing -> Processing method -> Component table) og velg en riktig sekvens (Data Processing -> Processing method -> Calibration -> Browse). Lagre.

6. Kopiere Tok_procesing_metode fra 'Tok_standardkurve_ny_dato'-filen til Tokoferol_MAL.

B Bestemmelse av vitamin E i olje

1. Vei inn ca. 0,5 g prøve i en 50 ml målekolbe og noter prøvevekten. Bruk analysevekt med antistatisk utladning. Bruk 25 ml målekolbe for lave konsentrasjoner og 100 ml målekolbe for høye konsentrasjoner.
2. Tilsett ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) halv av målekolbe sin volumet: enten cirka 15, 25 eller 50 ml.
3. Blås med nitrogen og sett kork på kolben. Rist kolben.
4. Plasser kolben med prøven på ultralydvannbad cirka 30 grader i 30 minutter.
5. Rist og fyll opp til merket med ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) og rist godt igjen.
6. Overfør løsningen til autosamplerglass og injiser på HPLC.

C Bestemmelse av vitamin E i tørre prøver (fiskefôr: fiskemel og fôringredienser)

1. Prøvematerialet må være godt homogenisert.
2. Vei inn ca. 0,5 g prøve i et 10 ml engangsglassrør med skrukork og noter prøvevekten. Bruk analysevekt med antistatisk utladning.
3. Tilsett 4 ml etanol og 0,1 g (en spatellspiss) askorbinsyre og sett kork på røret. Rist godt på Whirlmixer.
4. Tilsett 0,5 ml lut (KOH), sett kork på røret og rist godt på Whirlmixer.
5. Forsåpning 30 minutter. Plasser glassrør med kork på varmeblokk 30 min 80 °C. Etter 15 min rist prøven godt på Whirlmixer og forsett forsåpning 15 minutter til.
6. Etter forsåpning rist prøvene godt på Whirlmixer.
7. Avkjøl prøven i is-vann-bad cirka 30 sekunder til den er romtemperert, cirka 25 °C.
8. Etter avkjøling rist prøven godt på Whirlmixer og plasser den deretter på ristemaskin og la det riste 10 min.
9. Ekstraksjon. Tilsett 1 ml vann og 2 ml heksan:etylacetat (9:1).

10. Rist prøven godt på Whirlmixer og plasser deretter på ristemaskin og la det riste 10 min. Sentrifuger prøven i 5 minutter ved 3000 rpm.
11. Overfør den øverste fasen til en 25 ml målekolbe ved bruk av Pasteur pipette.
12. Tilsett 2 ml ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) på andre gang og rist prøven godt på Whirlmixer. Her må man riste prøven veldig godt siden prøvemateriale sitter ofte fast i bunnen av røret. Plasser deretter på ristemaskin og la det riste 10 min. Sentrifuger prøven i 5 minutter ved 3000 rpm.
13. Tilsett 2 ml ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) på tredje gang og rist prøven godt på Whirlmixer. Her må man riste prøven veldig godt siden prøvemateriale sitter ofte fast i bunnen av røret. Plasser deretter på ristemaskin og la det riste 10 min. Sentrifuger prøven i 5 minutter ved 3000 rpm.
14. Etter tredje ekstraksjon fylles 25 ml kolben opp til merket med ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan).
15. Overfør prøveløsningen til autosamplerglass og plasser den på autosampleren i HPLC-systemet.

D Analyse

1. Plasser på autosampleren: blank-prøve (eluent 4.C.1), standardrekke og/eller kontrollprøve (KP) og prøver.
2. Velg A121 Tokoferolprofilen -analyse i programvare som er koblet til HPLC.
3. Sjekk at parameterne (punkt 4.A.2.) stemmer i HPLC-systemer og programvare.
4. Programmer antall av prøver og injeksjoner i prøveserien. Legg inn journalnummer, prøvevekt og fortynningsfaktor.
5. Start analysen etter oppstartprosedyre for HPLC-systemet.
6. Fire tokoferoler detekteres. De er alfa-, beta-, gamma- og deltatokoferol. For retensjonstider (min), se tabell 3.

Tabell 3 Tokoferoler og deres retensjonstid

Tokoferol	Retensjonstid (min)
Alfatokoferol	3,7-4,0
Betatokoferol	4,7-5,3
Gammatokoferol	5,7-6,4
Deltatokoferol	7,7-8,6

6. Beregning

Basert på kalkulasjon av standardkurve og korrespondent integreringsprogram (Chromeleon), kalkuleres massefraksjon, w , av α -, β -, γ - og δ -tokoferol i mg/kg i prøven ved bruk av formelen 1:

$$w = \frac{A_s \times \rho \times V \times V_{ST}}{A_{ST} \times m \times V_s \times 1000} \times 1000 \quad (1)$$

w	α -, β -, γ - og δ -tokoferol i mg/kg
A_s	areal av α -, β -, γ - og δ -tokoferol analysert i prøven
A_{ST}	areal av topp av α -, β -, γ - og δ -tokoferol analysert i standardløsning
V	total volum av prøveløsning i milliliter (ml)
ρ	konsentrasjon av α -, β -, γ - og δ -tokoferol analysert i standardløsning mikrogram per milliliter ($\mu\text{g/ml}$)
m	innveid prøve, i gram (g)
V_{ST}	injeksjonsvolum av standard løsning i mikroliters (μl)
V_s	injeksjonsvolum av prøven i mikroliters (μl)
1000	konversjon faktor for mikrogram til milligram ($\mu\text{g/mg}$)
1000	konversjon faktor for massefraksjon per 1000 g = 1 kg

Fiskefôr og fôringredienser: fiskemel og oljer

Resultater under 2 mg/kg oppgis som <2 mg/kg.

Resultater oppgis med 2 signifikante siffer for resultater mellom 2 og 99 mg/kg.

Resultater oppgis med 3 signifikante siffer for resultater 100-1000 mg/kg

Resultater over 1000 mg/kg oppgis med 3 signifikante siffer

7. Kommentarer

1. Heksan er meget brannfarlig. Farlig ved innånding og hudkontakt. Kan være dødelig ved svelging om det kommer ned i luftveiene. Mistenkes for å kunne skade forplantningsevnen og/eller gi fosterskader. Kan forårsake organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering. Arbeid i avtrekk. Bruk øyevern og hansker. *
2. THF er meget brannfarlig. Kan danne eksplosive peroksid. Irriterer øyne og luftveier. Mistenkes for å kunne forårsake kreft. Arbeid i avtrekk. Bruk øyevern og hansker. *
3. Metanol er meget brannfarlig. Den er giftig ved innånding, hudkontakt og svelging. Forårsaker organskader. Arbeid i avtrekk. Bruk øyevern og hansker. *

*Jmfr. Datablad fra leverandør

Arbeidsbeskrivelse for metoden:

A Forbehandling av prøver

1. Fiskemel og andre tørre prøver (fett < 20%) males på Retch Grindomix laboratoriemølle ved 8000 o/min i 30 sekunder. Normalt oppnår vi da at 95% av partiklene passerer ASTM sikt nummer 30 (595 µm).
2. Fiskefôr og andre prøver med høyt fettinnhold (fett > 20%) males på Retch Grindomix laboratoriemølle ved 8000 o/min i 25 sekunder.
3. Spesielle prøvemateriale vurderes av metodeansvarlig i hvert enkelt tilfelles.

B Kontrolltiltak

En kontrollprøve (KP) analyseres i henhold til instruksene nedenfor. Tillaging og oppbevaring av kontrollprøver er beskrevet i [BIOLAB KH 07.4 Materiell - Generelle rutiner for referansemateriale og kontrollprøver](#).

1. Vei inn 2 paralleller av kontrollprøven sammen med de øvrige prøvene og analyser disse som beskrevet i dette dokumentet.
2. Før resultatene for alfa-, beta-, gamma- og deltatokoferol i kontrollkortet. Noter første avlesning som prøve a. Kontrollkortet finnes elektronisk under I:Avdelinger/alab/Kontrollkort
3. Kontrollkortet beregner automatisk middelerdi og % RSD og plottet punktene i diagrammene.
4. Hvis resultatet for kontrollprøven er tilfredsstillende, kan resultater fra ordinære prøver i serien benyttes.
5. Hvis resultatet for kontrollprøven ikke er tilfredsstillende følges rutine beskrevet i [BIOLAB KH 02.5 Kvalitetssystem - Konstruksjon og anvendelse av kontrollkort](#).

Prøveserien kan godkjennes uten KP hvis det er andre kjente prøver i serien som bekrefter resultatet. Prøveserien kan godkjennes hvis tre av tokoferoler i KP:n er innenfor godkjente måleområde. En slik vurdering skal gjøres av metodeansvarlig/avdelingsledelse.

C Notater fra analysen

Under analysen fylles data inn på journalark for Tokoferolprofilen, se slutten av dokumentet.

1. Dato for innveiling av prøven.
2. Vektens ID nummer.
3. Vekt innveid prøve.
4. Prøvens fortynning under analysen = fortynningsfaktor som skal legges inn i sekvensen i Chromeleon.
5. Signatur og ferdig dato.
6. Eventuelle avvik fra metodebeskrivelse (må begrunnes under kommentarer).

Utskrift for den enkelte prøve legges ved analyserekvisisjon og arkiveres sammen med den.

D Vurdering av paralleller/resultat

Analysen skal alltid utføres med to kontrollprøveparalleller. Hvis avviket mellom parallellene for enten alfa-, beta-, gamma- og deltatokoferol utgjør mer enn 10 % RSD, skal analysen kontrolleres med to nye kontrollprøveparalleller.

Gjennomsnittet av alle parallellene skal normalt rapporteres dersom de er analysert i godkjente serier.

Hvis en enkelt parallell utelates fra gjennomsnittsberegningen, må dette enten være som resultat av en Dixon test, eller være skriftlig begrunnet på annen måte.

E Blanding av kjemikalier

Alle reagenser som oppbevares skal merkes med standard merkelapp.

Tabell 4 Holdbarhet og oppbevaring reagenser

Reagens	Holdbarhet	Oppbevaring
Eluent, 5 % tetrahydrofuran i heptan	6 måneder	Ildsfarlig skap
Ekstraksjonsløsningsmiddel, 10 % etylacetat i heksan	6 måneder	Ildsfarlig skap
Lut, 20 % kaliumhydroksid (KOH) i vann	6 måneder	Base skap
Stamløsninger av hver enkelt tokoferol	6 måneder	Oppbevares i fryseboks
Standardløsninger og blandingsstandardløsninger	Brukes den dagen den er laget	Oppbevares ikke

F Bruk av utstyr

Vekten som benyttes skal ha gjeldende kalibrering og være ferdig testet for dagen iht. [BIOLAB KH 07.3](#) og [BIOLAB RU 08 Vektkontrollkort](#)

Dersom automatpipetter benyttes til nøyaktige volumuttak, kontrolleres de i samsvar med [BIOLAB KH 07.3](#) og [BIOLAB RU 03 Volumkontrollkort](#)

Pass på at spektrofotometeret har gyldig kalibrering iht. [BIOLAB RU 09 Spektrofotometer; Kalibrering](#)

HPLC-systemet må være fritt for luft, lekkasjer o.l. Service og vedlikehold av HPLC-systemet loggføres i skjema [BIOLAB RU 12](#)

Før en prøveserie kan kjøres må journalnummer, prøvevekt og fortynningsfaktor legges inn i sekvensen i Chromeleon.

G Disponering av avfall

Prøverester, eluent, ekstraksjonsløsningsmiddel, stamløsninger, standardløsning og blandingstandardløsninger tømmes i fat merket «organisk avfall uten klor» i avfallskontaineren. Lut tømmes i vask og skylles godt med varmt vann.

H Usikkerhetsbidrag:

Det er gjort en vurdering av usikkerhetsbidrag i de enkelte analysetrinn i valideringsrapporten (Nofima-rapport XXX). Vurderingene forutsetter at metode, arbeidsbeskrivelse og øvrige kvalitetssikringstiltak følges nøyaktig.

Metodens relative måleusikkerhet er oppgitt i [BIOLAB KH 02.4 Kvalitetssystem - Metodeoversikt, måleområde og usikkerhet](#).

Tabell 5 Måleusikkerhetsbidrag. Kilde til måleusikkerhet og bidrag til måleusikkerhet (lite, middels og stort).

Kilde til måleusikkerhet	Bidrag til måleusikkerhet		
	Lite bidrag	Middels bidrag	Stort bidrag
Reagenser			
1. Tillaging av eluent (5 % tetrahydrofuran i heptan), ekstraksjonsløsningsmiddel (10 % etylacetat i heksan) og lut (20 % kaliumhydroksid (KOH) i vann)	x		
Standardkurven			
2. Tillaging av stamløsninger og standardløsninge av hver enkelt tokoferol	x		
3. Spektrofotometer, kons.bestemmelse av std.løsning ^a			x
4. Tillaging av blandingsstandard av α -, β -, γ - og δ -tokoferol, tillaging av standardkurven og HPLC-analysen av standardkurven		x	
Opparbeiding av prøve			
5. Håndtering av prøve, oppmaling, mørkt og kaldt	x		
6. Innveing prøve		x	
7. Forsåpning			
7.1. 80 grader temperatur i 30 minutter	x		
7.2. Mengden av luten: 0,5 ml		x	
8. Risting		x	
9. Sentrifugering		x	
10. Ekstraksjon	x		
11. Pipettering av ekstrakt			x
12. Fylling av målekolber opp i merket	x		
13. HPLC-analyse (injeksjonsvolum, separasjon og integrering)			x
<p>^a Et potensielt stort bidrag til måleusikkerhet på grunn av at tokoferoler er ustabil samt risiko for at løsemiddelet fordamper. Nøyaktigheten til spektrofotometeret er kritisk pga. av at dette er en ekstern standard metode. Målingen må gjøres på kalibrert instrument og umiddelbart etter at løsningen er tillaget.</p>			

Referanser:

Norsk Standard. 2014. NS-EN 12822:2014. Næringsmidler. Bestemmelse av vitamin E med væskrokromatografi (HPLC). Måling av α -, β -, γ - og δ -tokoferol. Foodstuffs. Standard Norge.

Finglas P.M., van den Berg H., de Froidmont-Görtz I. 1997. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421) and lyophilized brussels sprouts powder (CRM 431). Vitamins A, D3 & E in CRM 122; C, D3, E & niacin in CRM 421, and C & niacin in CRM 431. Report EUR 18039. European Commission bcr information. Reference materials. ISSN 1018-5593.

Ryynänen. M., Lampi AM., Salo-Väänänen P., Ollikainen V., Piironen V. 2004. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals.

Noora Heikintalo og Bente Asbjørnsen. Validering av metoden «NS-EN 12822:2014» for bestemmelse av vitamin E med væskrokromatografi (HPLC). Måling α -, β -, γ - og δ -tokoferol (BIOLAB A121 Tokoferolprofilen). Nofima-rapport <nr/årstall>. Utgitt <måned år>.

Journalark BIOLAB A121 Tokoferolprofilen

Journalnummer: 20 - _____

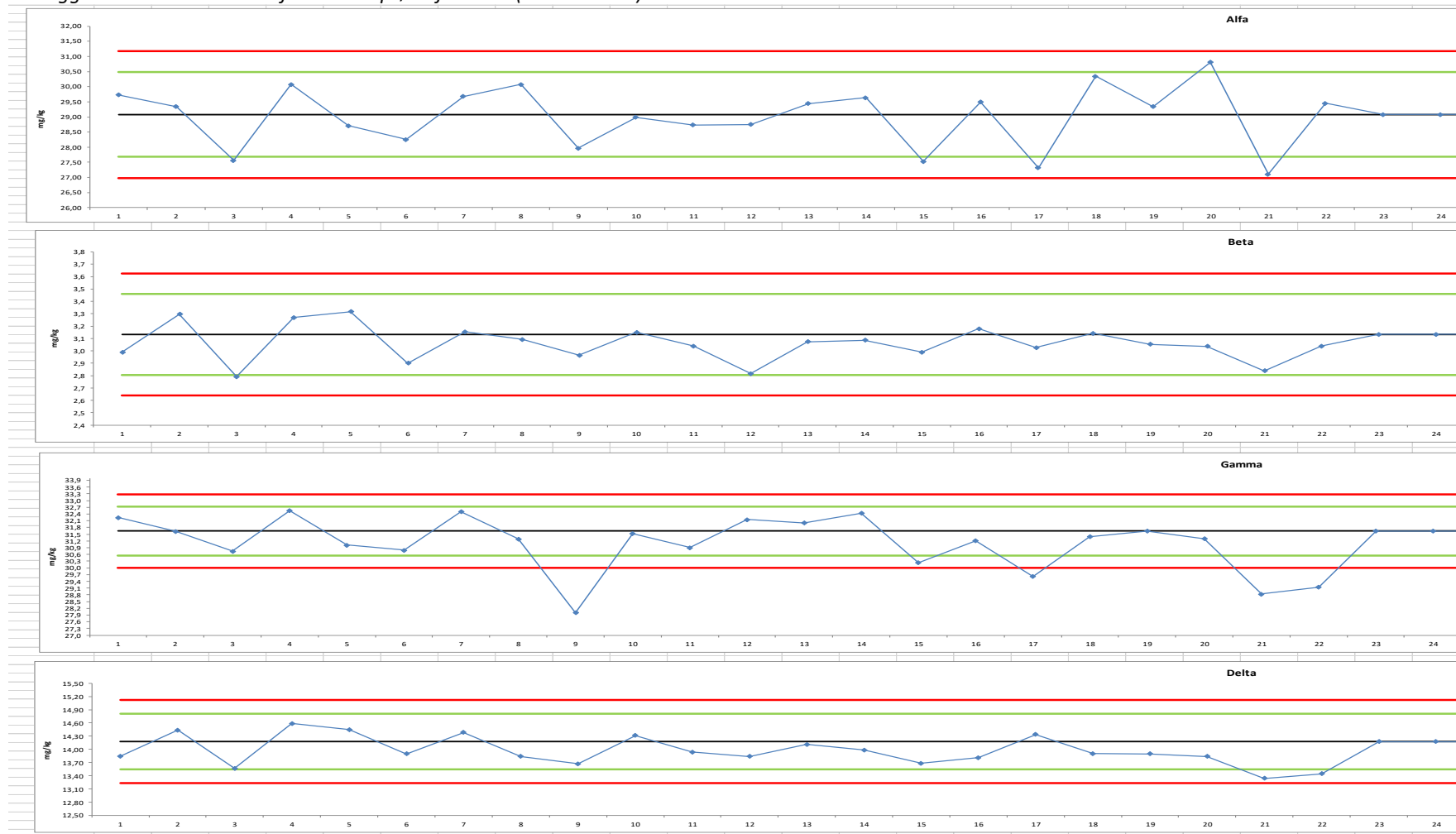
Innveid dato	Vekt ID	Innveid, g	Fortynningsfaktor (25, 50 eller 100)

Kommentarer:

Innlevert
dato: _____

Sign.: _____

Vedlegg tabell 1b Kontrollkort for kontrollprøve fiskemel (2020-7919-1)



Vedlegg 3 Data av standardkurv

Vedlegg tabell 2a-d Standardkurvene for alfa-, beta-, gamma- og deltatokoferol. Konsentrasjonene, arealene, differansen mellom parallellene og kvadratet.

2a. ALFATOKOFEROL

Konsentrasjon cirka µg/ml	Konsentrasjon nøyaktig µg/ml	Areal (LU*min)	a-b	(a-b) ²
0,004	0,00394	0,00310	0,00005	2,24336E-09
0,004	0,00394	0,00305		
0,01	0,01313	0,01108	-0,00067	4,53964E-07
0,01	0,01313	0,01176		
0,1	0,05254	0,04691	0,00025	6,11455E-08
0,1	0,05254	0,04666		
0,4	0,31524	0,29877	-0,00304	0,00001
0,4	0,31524	0,30181		
1	0,87566	0,83773	-0,01076	0,00012
1	0,87566	0,84849		
3	2,62699	2,54431	-0,03974	0,00158
3	2,62699	2,58405		
8	7,00531	6,86973	-0,11177	0,01249
8	7,00531	6,98149		
12	10,50796	10,30260	-0,15585	0,02429
12	10,50796	10,45845		
30	26,26990	25,07597	-0,41455	0,17185
30	26,26990	25,49052		
50	43,78316	43,97259	-0,26664	0,07110
50	43,78316	44,23923		
SUM				0,28143

2b. BETATOKOFEROL

Konsentrasjon cirka µg/ml	Konsentrasjon nøyaktig µg/ml	Areal (LU*min)	a-b	(a-b) ²
0,004	0,00385	0,00684	0,00100	9,93227E-07
0,004	0,00385	0,00584		
0,01	0,01284	0,01878	-0,00033	1,07788E-07
0,01	0,01284	0,01911		
0,1	0,05134	0,07679	0,00056	3,13766E-07
0,1	0,05134	0,07623		
0,4	0,30807	0,47136	0,00015	2,12868E-08
0,4	0,30807	0,47122		
1	0,85574	1,31638	-0,01357	0,00018
1	0,85574	1,32994		
3	2,56721	3,94243	-0,01523	0,00023
3	2,56721	3,95766		
8	6,84590	10,52943	-0,10849	0,01177
8	6,84590	10,63792		
12	10,26885	15,73915	-0,19920	0,03968
12	10,26885	15,93835		
30	25,67212	38,11575	-0,54076	0,29242
30	25,67212	38,65651		
50	42,78686	66,55528	-0,23297	0,05427
50	42,78686	66,78824		
SUM				0,39856

2c. GAMMATOKOFEROL

Konsentrasjon cirka	Konsentrasjon nøyaktig	Areal	a-b	(a-b) ²
µg/ml	µg/ml	(LU*min)		
0,004	0,00520	0,00799	0,00008	6,45095E-09
0,004	0,00520	0,00791		
0,01	0,01733	0,02526	-0,00051	2,62279E-07
0,01	0,01733	0,02577		
0,1	0,06931	0,10168	-0,00230	5,29277E-06
0,1	0,06931	0,10398		
0,4	0,41588	0,63953	-0,00439	0,00002
0,4	0,41588	0,64392		
1	1,15524	1,77718	-0,02311	0,00053
1	1,15524	1,80030		
3	3,46571	5,36804	-0,01985	0,00039
3	3,46571	5,38790		
8	9,24188	14,33409	-0,13288	0,01766
8	9,24188	14,46697		
12	13,86282	21,40294	-0,15638	0,02445
12	13,86282	21,55932		
30	34,65706	51,72283	-0,58312	0,34003
30	34,65706	52,30596		
50	57,76176	90,13855	-0,39951	0,15961
50	57,76176	90,53806		
SUM				0,54271

2d. DELTATOKOFEROL

Konsentrasjon cirka	Konsentrasjon nøyaktig	Areal	a-b	(a-b) ²
µg/ml	µg/ml	(LU*min)		
0,004	0,00480	0,00759	-0,00098	9,63768E-07
0,004	0,00480	0,00857		
0,01	0,01600	0,02634	0,00108	1,16605E-06
0,01	0,01600	0,02526		
0,1	0,06400	0,10141	0,00155	2,39393E-06
0,1	0,06400	0,09986		
0,4	0,38400	0,62185	-0,00418	0,00002
0,4	0,38400	0,62603		
1	1,06667	1,74509	-0,00683	0,00005
1	1,06667	1,75192		
3	3,20002	5,27128	0,04666	0,00218
3	3,20002	5,22462		
8	8,53338	14,06328	-0,05150	0,00265
8	8,53338	14,11479		
12	12,80007	20,96402	-0,07682	0,00590
12	12,80007	21,04084		
30	32,00018	50,89296	-0,39519	0,15618
30	32,00018	51,28815		
50	53,33364	88,79894	-0,02100	0,00044
50	53,33364	88,81994		
SUM				0,16742

Vedlegg 4 Data fra ringtest arrangør DGF og Masterlab

Vedlegg tabell 3 DGF ringtestresultater (2020-7743-1 og 2020-7743-2) beregnet som mg/kg.

Ringtest arrangør	Prøve	Tokoferol	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik	Antall av lab (n)
			% (w/w)	% (w/w)	mg/kg*	mg/kg*	
DGF	2020-7743-1	Alfa	27	3,38	994,33	124,48	26
		Beta	1,93	0,39	71,08	14,36	24
		Gamma	55,88	2,89	2057,89	106,43	26
		Delta	15,78	2,2	581,13	81,02	26
	2020-7743-2	Alfa	17,36	5,15	376,14	111,59	27
		Beta	1,71	0,4	37,05	8,67	25
		Gamma	61,74	3,95	1337,72	85,58	27
		Delta	18,64	3,22	403,87	69,77	27

* mg/kg = av tokoferol i prøven (mg/kg) * sum av alle tokoferolene i prøven (mg/kg) / 100 %

Summen av alle tokoferolene i 2020-7743-1: 3682,70 mg/kg og 2020-7743-2: 2166,70 mg/kg (fra DGF final rapport)

Vedlegg tabell 4 Masterlab ringtestresultat (2020-1619-1) beregnet som mg/kg.

Ringtest arrangør	Prøve	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik	Antall av lab (n)
		mg/kg som alfa-tokoferylacetat	mg/kg som alfa-tokoferylacetat	mg/kg alfatokoferol*	mg/kg alfatokoferol*	
Masterlab	2020-1619-1	330,70	69,45	301,18	63,25	12

* Molar mass for tokoferylacetat er 427,7 g/mol og for alfa-tokoferol 430,7 g/mol. (CAS Common Chemistry). Gengefaktoren alfatokoferol til tokoferylacetat er 1,098.

Vedlegg 5 Data av prøveresultatene Nofima Biolab

Vedlegg tabell 5. Informasjon: dato, prøvetype, vekt, dilusjon og tokoferolresultater (mg/kg) på 2020-7743-1 og 2020-7743-2 på Biolab

Prøve ID	Nr.	DATO	PRØVETYPE	VEKT (g)	DILUSJON (ml)	Alfa	Beta	Gamma	Delta	
						mg/kg				
2020-7743-1 (DGF)	1	11.11.2020		0,8245	100	1011,12	86,27	1999,58	601,38	
	2	11.11.2020		0,7392	100	1008,08	86,63	1997,70	618,00	
	3	11.11.2020		0,8409	100	1005,87	85,86	1988,40	608,17	
	4	17.11.2020		0,8535	250	1023,82	86,33	2060,96	625,30	
	5	17.11.2020		0,664	250	1012,41	88,05	2047,99	626,30	
	6	19.11.2020	OLJE	1,5365	100	1015,83	88,60	1957,30	587,48	
	7	19.11.2020		0,5077	100	1026,80	91,23	1980,51	612,90	
	8	24.11.2020		0,5153	100	770,03	70,85	1486,91	456,67	
	9	24.11.2020		0,4935	100	935,33	83,04	1809,03	545,17	
	10	25.11.2020		0,4795	100	960,92	86,84	1864,65	556,47	
	11	25.11.2020		0,5181	100	1015,89	90,55	1964,85	588,43	
	12	24.11.2020		0,6655	25	913,50	80,28	1736,59	516,56	
	13	25.11.2020	OLJE	0,8394	25	977,58	87,38	1903,74	565,81	
	14	25.11.2020	FORSÅPET	0,7804	25	942,46	84,95	1819,84	548,83	
	15	26.11.2020		0,6854	25	924,74	84,47	1756,46	535,70	
	16	26.11.2020		0,5641	25	963,97	86,62	1842,11	546,49	
2020-7743-2 (DGF)	1	25.11.2020		0,5615	100	368,51	49,51	1333,93	441,79	
	2	11.11.2020		1,078	100	410,16	51,39	1462,06	490,16	
	3	11.11.2020		0,7319	100	414,88	54,05	1478,60	492,29	
	4	11.11.2020		OLJE	0,7983	100	408,85	52,66	1462,87	486,72
	5	17.11.2020			0,9052	250	412,52	55,79	1498,35	503,51
	6	17.11.2020		1,017	250	411,37	55,73	1491,56	494,80	
	7	24.11.2020		0,476	100	412,39	60,40	1475,26	495,73	
	8	24.11.2020		0,4422	100	352,39	51,88	1231,95	418,53	
	9	25.11.2020		0,4614	100	411,69	55,56	1483,38	491,03	
	10	24.11.2020	OLJE	0,5497	25	377,22	45,14	1277,69	401,30	
	11	26.11.2020	FORSÅPET	0,4768	25	401,21	47,51	1348,45	409,00	
	12	26.11.2020		0,5657	25	392,98	47,55	1340,73	421,78	

Vedlegg tabell 6. Informasjon: dato, prøvetype, vekt, dilusjon og tokoferolresultater (mg/kg) på 2020-7919-1 (KP MEL), 2020-5672-1, 2020-6324-1 og 2020-6325-1 på Biolab

Prøve ID	Nr.	DATO	PRØVETYPE	VEKT (g)	DILUSJON (ml)	Alfa	Beta	Gamma	Delta
						mg/kg			
2020-7919-1 (KP MEL)	1	17.11.2020	MEL	0,4451	25	30,95	3,45	32,92	14,51
	2	17.11.2020		0,7219	25	28,50	2,53	31,58	13,17
	3	19.11.2020		0,4657	25	29,35	3,20	31,87	14,24
	4	19.11.2020		0,4324	25	29,32	3,40	31,38	14,63
	5	24.11.2020		0,5159	25	28,08	2,95	30,67	13,76
	6	24.11.2020		0,6155	25	27,04	2,63	30,82	13,38
	7	25.11.2020		0,4928	25	29,90	3,15	32,33	14,24
	8	25.11.2020		0,4348	25	30,25	3,39	32,78	14,93
	9	26.11.2020		0,4479	25	28,81	3,25	31,08	14,37
	10	26.11.2020		0,4357	25	28,60	3,39	30,96	14,52
2020-5672-1	1	19.11.2020	FÔR	0,5197	25	542,86	6,65	93,38	28,33
	2	19.11.2020		0,4792	25	560,36	6,81	93,12	28,82
	3	24.11.2020		0,4648	25	587,13	3,10	93,67	27,59
	4	24.11.2020		0,5909	25	524,59	4,63	92,89	27,48
	5	25.11.2020		0,563	25	526,61	7,06	97,23	28,72
	6	25.11.2020		0,441	25	542,39	7,12	98,17	29,67
	7	26.11.2020		0,4704	25	374,80	5,90	76,70	28,20
	8	26.11.2020		0,4082	25	506,00	6,60	94,41	28,74
2020-6324-1	1	19.11.2020	MEL	0,4975	25	19,39	3,92	41,95	24,31
	2	19.11.2020		0,6741	25	15,94	3,32	34,27	22,83
	3	24.11.2020		0,4308	25	17,61	4,09	36,63	23,40
	4	24.11.2020		0,594	25	15,35	3,37	32,83	23,00
	5	25.11.2020		0,539	25	18,34	3,57	39,90	23,26
	6	25.11.2020		0,4677	25	18,79	3,88	39,25	23,54
	7	26.11.2020		0,4187	25	18,86	4,12	40,09	23,94
	8	26.11.2020		0,4646	25	19,04	3,85	41,06	23,25
2020-6325-1	1	19.11.2020	MEL	0,5174	25	18,88	3,76	37,06	23,55
	2	19.11.2020		0,4505	25	17,18	4,01	32,71	23,90
2020-0725-1	1	25.11.2020	MEL	0,4259	25	13,85	4,33	25,46	18,05
	2	25.11.2020		0,4976	25	14,64	4,03	30,85	18,21

Vedlegg tabell 7. Informasjon: dato, prøvetype, vekt, dilusjon og tokoferolresultater (mg/kg) på 2020-1619 (Masterlab ringtest), 2019-7340-1, 2019-4120-1, 2019-3352-3 og 2020-0610-1 på Biolab

Prøve ID	Nr.	DATO	PRØVETYPE	VEKT (g)	DILUTION (ml)	Alfa (mg/kg)	Beta (mg/kg)	Gamma (mg/kg)	Delta (mg/kg)
2020-1619-1 (Masterlab)	1	11.11.2020	FÔR	0,7259	25	274,07	4,4	61,5	12,8
	2	11.11.2020		0,511	25	322,09	5,2	65,6	14,1
	3	11.11.2020		0,7094	25	246,60	4,8	64,5	13,6
	4	17.11.2020		0,4476	25	284,07	5,8	64,7	15,2
	5	17.11.2020		0,6696	25	275,28	4,9	63,1	13,5
2019-7340-1	1	26.11.2020	MEL	0,4214	25	14,36	4,57	37,82	30,47
	2	26.11.2020		0,4119	25	14,43	4,66	36,23	30,27
2019-4210-1	1	24.11.2020	MEL	0,573	25	22,08	3,98	41,77	31,29
	2	24.11.2020		0,6338	25	21,27	3,67	40,52	30,39
2019-3352-3	1	19.11.2020	FÔR	0,6393	25	312,95	5,12	54,53	4,50
	2	19.11.2020		0,6495	25	351,12	4,91	54,40	4,36
2020-0610-1	1	17.11.2020	OLJE	0,7884	100	644,20	18,19	49,54	28,77
	2	17.11.2020		0,4332	100	627,95	21,95	53,47	34,40
	3	24.11.2020		0,7111	100	466,14	14,94	40,00	23,42
	4	25.11.2020		0,4623	100	571,49	20,12	48,91	28,86
	5	25.11.2020		0,4443	100	625,82	21,20	52,68	30,63

Vedlegg 6 Area (LU*min) av blank-prøver

*Vedlegg tabell 8. Informasjon: dato, blank nr. i batch, Area (LU*min) for hvert tokoferoler.*

Nr.	Dato	Blank nr. i batch	Area (LU*min)			
			Alfa	Beta	Gamma	Delta
1	11.11.2020	Blank 1	0,00075	0,00296	0,00107	0,00052
2	11.11.2020	Blank 2	0,00192	0,00037	0,00057	0,00005
3	11.11.2020	Blank 3	0,00149	0,00036	0,00463	0,00400
4	12.11.2020	Blank 0	0,00897	0,01022	0,01053	0,00289
5	12.11.2020	Blank 1	0,00120	0,00045	0,00109	0,00078
6	12.11.2020	Blank 2	0,00160	0,00169	0,00002	0,00083
7	12.11.2020	Blank 3	0,00060	0,00156	0,00014	0,00120
8	12.11.2020	Blank 4	0,00028	0,00198	0,00294	0,00053
9	12.11.2020	Blank 5	0,00114	0,00170	0,00026	0,00016
10	12.11.2020	Blank 6	0,00072	0,00003	0,00102	0,00155
11	12.11.2020	Blank 7	0,01147	0,00189	0,00084	0,00041
12	12.11.2020	Blank 8	0,00049	0,00051	0,00128	0,00038
13	12.11.2020	Blank 9	0,00164	0,00215	0,00062	0,00285
14	12.11.2020	Blank 10	0,00134	0,00191	0,00001	0,00056
15	17.11.2020	Blank 1	0,00005	0,00050	0,00106	0,00102
16	17.11.2020	Blank 2	0,00029	0,00034	0,00331	0,00259
17	17.11.2020	Blank 3	0,00114	0,00018	0,00298	0,00060
18	17.11.2020	Blank 4	0,00051	0,00525	0,00124	0,00329
19	19.11.2020	Blank 1	0,00353	0,00300	0,00052	0,00210
20	19.11.2020	Blank 2	0,00290	0,00146	0,00213	0,00038
21	19.11.2020	Blank 3	0,00341	0,00129	0,00200	0,00108
22	24.11.2020	Blank 0	0,00102	0,01266	0,00346	0,00439
23	24.11.2020	Blank 1	0,00274	0,00767	0,00090	0,00180
24	24.11.2020	Blank 2	0,00017	0,00087	0,00407	0,00213
25	24.11.2020	Blank 3	0,00116	0,00038	0,00067	0,00179
26	25.11.2020	Blank 0	0,00597	0,01449	0,00730	0,00359
27	25.11.2020	Blank 1	0,00195	0,00321	0,00049	0,00571
28	26.11.2020	Blank 1	0,00134	0,00126	0,00127	0,00355
29	26.11.2020	Blank 2	0,00548	0,00114	0,00363	0,00423

Vedlegg 7 Statistiske testresultater

Vedlegg tabell 9 Regresjonsanalyse for standardkurven av alfatokoferol (fra vedlegg 3).

ALFA

SAMMENDRAG (UTDATA)

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,99972
R-kvadrat	0,99945
Justert R-kvadrat	0,99942
Standardfeil	0,34413
Observasjoner	20

Variansanalyse

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>
Regresjon	1	3856,599621	3856,599621	32564,90797	8,89052E-31
Residualer	18	2,131705493	0,118428083		
Totalt	19	3858,731326			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt µg/ml	-0,07616 0,99751	0,09207 0,00553	-0,82719 180,45750	0,41896 8,890517E-31	-0,26959 0,98589	0,11727 1,00912	-0,26959 0,98589	0,11727 1,00912

AVVIK (UTDATA)

<i>Observasjon</i>	<i>Fremskrevet</i>		
	<i>Areal</i>	<i>Residualer</i>	<i>Standardrester</i>
1	-0,07223	0,07533	0,22489
2	-0,07223	0,07528	0,22475
3	-0,06306	0,07414	0,22135
4	-0,06306	0,07482	0,22336
5	-0,02375	0,07066	0,21094
6	-0,02375	0,07041	0,21021
7	0,23829	0,06048	0,18056
8	0,23829	0,06352	0,18962
9	0,79732	0,04041	0,12064
10	0,79732	0,05117	0,15278
11	2,54428	0,00003	0,00009
12	2,54428	0,03977	0,11874
13	6,91167	-0,04195	-0,12524
14	6,91167	0,06982	0,20844
15	10,40559	-0,10299	-0,30748
16	10,40559	0,05285	0,15779
17	26,12822	-1,05225	-3,14146
18	26,12822	-0,63770	-1,90383
19	43,59781	0,37478	1,11890
20	43,59781	0,64142	1,91494

Vedlegg tabell 10 Regresjonsanalyse for standardkurven av betatokoferol (fra vedlegg 3).

BETA

SAMMENDRAG (UTDATA)

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,99977
R-kvadrat	0,99955
Justert R-kvadrat	0,99952
Standardfeil	0,47061
Observasjoner	20

Variansanalyse

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>
Regresjon	1	8822,654488	8822,654488	39835,3092	1,4509E-31
Residualer	18	3,986608461	0,221478248		
Totalt	19	8826,641097			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	-0,06530	0,12591	-0,51860	0,61036	-0,32982	0,19923	-0,32982	0,19923
µg/ml	1,54387	0,00774	199,58785	1,4509E-31	1,52761	1,56012	1,52761	1,56012

AVVIK (UTDATA)

<i>Observasjon</i>	<i>Fremskrevet</i>		
	<i>Areal</i>	<i>Residualer</i>	<i>Standardrester</i>
1	-0,05935	0,06619	0,14450
2	-0,05935	0,06519	0,14232
3	-0,04548	0,06426	0,14028
4	-0,04548	0,06459	0,14100
5	0,01397	0,06282	0,13715
6	0,01397	0,06226	0,13592
7	0,41031	0,06105	0,13328
8	0,41031	0,06090	0,13296
9	1,25585	0,06053	0,13214
10	1,25585	0,07409	0,16176
11	3,89813	0,04430	0,09671
12	3,89813	0,05953	0,12996
13	10,50385	0,02558	0,05584
14	10,50385	0,13407	0,29268
15	15,78843	-0,04928	-0,10758
16	15,78843	0,14992	0,32730
17	39,56901	-1,45326	-3,17262
18	39,56901	-0,91250	-1,99208
19	65,99188	0,56340	1,22995
20	65,99188	0,79636	1,73854

Vedlegg tabell 11 Regresjonsanalyse for standardkurven av gammatokoferol (fra vedlegg 3).

GAMMA

SAMMENDRAG (UTDATA)

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,99978
R-kvadrat	0,99955
Justert R-kvadrat	0,99953
Standardfeil	0,63485
Observasjoner	20

Variansanalyse

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>
Regresjon	1	16196,21927	16196,21927	40185,16188	1,34114E-31
Residualer	18	7,25471625	0,403039792		
Totalt	19	16203,47399			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	-0,07694	0,16985	-0,45299	0,65597	-0,43378	0,27990	-0,43378	0,27990
µg/ml	1,54948	0,00773	200,46237	1,34114E-31	1,53324	1,56572	1,53324	1,56572

AVVIK (UTDATA)

<i>Observasjon</i>	<i>Fremskrevet</i>		
	<i>Areal</i>	<i>Residualer</i>	<i>Standardrester</i>
1	-0,06888	0,07688	0,12441
2	-0,06888	0,07680	0,12428
3	-0,05009	0,07535	0,12194
4	-0,05009	0,07586	0,12277
5	0,03046	0,07122	0,11525
6	0,03046	0,07352	0,11898
7	0,56747	0,07206	0,11662
8	0,56747	0,07645	0,12373
9	1,71308	0,06411	0,10374
10	1,71308	0,08722	0,14115
11	5,29311	0,07493	0,12127
12	5,29311	0,09479	0,15340
13	14,24320	0,09089	0,14710
14	14,24320	0,22377	0,36214
15	21,40327	-0,00033	-0,00053
16	21,40327	0,15605	0,25254
17	53,62357	-1,90074	-3,07602
18	53,62357	-1,31762	-2,13234
19	89,42392	0,71464	1,15651
20	89,42392	1,11415	1,80306

Vedlegg tabell 12 Regresjonsanalyse for standardkurven av deltatokoferol (fra vedlegg 3).

DELTA

SAMMENDRAG (UTDATA)

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,99978
R-kvadrat	0,99955
Justert R-kvadrat	0,99953
Standardfeil	0,62539
Observasjoner	20

Variansanalyse

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>
Regresjon	1	15649,72226	15649,72226	40012,74235	1,39403E-31
Residualer	18	7,04013232	0,391118462		
Totalt	19	15656,76239			

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	-0,10210	0,16732	-0,61022	0,54934	-0,45363	0,24942	-0,45363	0,24942
µg/ml	1,64958	0,00825	200,03185	1,39403E-31	1,63225	1,66690	1,63225	1,66690

AVVIK (UTDATA)

<i>Observasjon</i>	<i>Fremskrevet</i>		
	<i>Areal</i>	<i>Residualer</i>	<i>Standardrester</i>
1	-0,09418	0,10178	0,16720
2	-0,09418	0,10276	0,16881
3	-0,07571	0,10205	0,16765
4	-0,07571	0,10097	0,16587
5	0,00347	0,09794	0,16090
6	0,00347	0,09639	0,15835
7	0,53134	0,09051	0,14869
8	0,53134	0,09469	0,15556
9	1,65746	0,08764	0,14397
10	1,65746	0,09446	0,15518
11	5,17657	0,09470	0,15558
12	5,17657	0,04805	0,07893
13	13,97436	0,08892	0,14608
14	13,97436	0,14042	0,23069
15	21,01260	-0,04858	-0,07980
16	21,01260	0,02824	0,04639
17	52,68465	-1,79169	-2,94340
18	52,68465	-1,39650	-2,29418
19	87,87582	0,92313	1,51652
20	87,87582	0,94412	1,55101

Vedlegg tabell 13 F-testresultater for 2020-7743-1 og 2020-7743-2. t-Test: To utvalg for varianser.

<i>2020-7743-1 ALFA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>	<i>2020-7743-2 ALFA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>
Gjennomsnitt	1002,110705	969,2717334	Gjennomsnitt	399,6336843	397,8468311
Varians	12764,30319	4260,830399	Varians	7658,401613	432,0058649
Observasjoner	23	16	Observasjoner	23	12
fg	22	15	fg	22	11
F	2,995731346		F	17,72754084	
P(F<=f) en side	0,016411607		P(F<=f) en side	1,011E-05	
F-kritisk, en side	2,306032236		F-kritisk, en side	2,62612697	

<i>2020-7743-1 BETA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>	<i>2020-7743-2 BETA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>
Gjennomsnitt	71,52807773	85,49636615	Gjennomsnitt	36,8854881	52,26413333
Varians	134,1236033	22,20638335	Varians	44,97371446	18,9809138
Observasjoner	22	16	Observasjoner	21	12
fg	21	15	fg	20	11
F	6,039867059		F	2,369417771	
P(F<=f) en side	0,000426931		P(F<=f) en side	0,071567422	
F-kritisk, en side	2,316317457		F-kritisk, en side	2,646445154	

<i>2020-7743-1 GAMMA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>	<i>2020-7743-2 GAMMA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>
Gjennomsnitt	2059,782145	1888,538339	Gjennomsnitt	1341,629668	1407,069638
Varians	13831,88883	21614,92276	Varians	8268,91203	8890,001851
Observasjoner	23	16	Observasjoner	24	12
fg	22	15	fg	23	11
F	0,639923121		F	0,930136143	
P(F<=f) en side	0,166195441		P(F<=f) en side	0,420882612	
F-kritisk, en side	0,464948052		F-kritisk, en side	0,447143328	

<i>2020-7743-1 DELTA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>	<i>2020-7743-2 DELTA</i>	<i>DGF</i>	<i>Biolab</i>
Gjennomsnitt	573,9655345	571,229843	Gjennomsnitt	402,9496774	462,2203882
Varians	3630,528228	2141,856569	Varians	4257,929034	1591,852002
Observasjoner	22	16	Observasjoner	23	12
fg	21	15	fg	22	11
F	1,695037978		F	2,674827201	
P(F<=f) en side	0,149090924		P(F<=f) en side	0,046990136	
F-kritisk, en side	2,316317457		F-kritisk, en side	2,62612697	

Vedlegg tabell 14. t-testresultater for 2020-7743-1 og 2020-7743-2. t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser. Antatt avvik mellom gjennomsnittene er 0.

2020-7743-1 ALFA	DGF	Biolab	2020-7743-2 ALFA	DGF	Biolab
Gjennomsnitt	1002,11071	969,27173	Gjennomsnitt	399,63368	397,84683
Varians	12764,30319	4260,83040	Varians	7658,40161	432,00586
Observasjoner	23	16	Observasjoner	23	12
fg	36		fg	26	
t-Stat	1,14590		t-Stat	0,09302	
P(T<=t) ensidig	0,12970		P(T<=t) ensidig	0,46330	
T-kritisk, ensidig	1,68830		T-kritisk, ensidig	1,70562	
P(T<=t) tosidig	0,25940		P(T<=t) tosidig	0,92660	
T-kritisk, tosidig	2,02809		T-kritisk, tosidig	2,05553	

2020-7743-1 BETA	DGF	Biolab	2020-7743-2 BETA	DGF	Biolab
Gjennomsnitt	71,52808	85,49637	Gjennomsnitt	36,88549	52,26413
Varians	134,12360	22,20638	Varians	44,97371	18,98091
Observasjoner	22	16	Observasjoner	21	12
fg	30		fg	30	
t-Stat	-5,10580		t-Stat	-7,96987	
P(T<=t) ensidig	0,00001		P(T<=t) ensidig	3,38734E-09	
T-kritisk, ensidig	1,69726		T-kritisk, ensidig	1,69726	
P(T<=t) tosidig	0,00002		P(T<=t) tosidig	6,77468E-09	
T-kritisk, tosidig	2,04227		T-kritisk, tosidig	2,04227	

2020-7743-1 GAMMA	DGF	Biolab	2020-7743-2 GAMMA	DGF	Biolab
Gjennomsnitt	2059,78215	1888,53834	Gjennomsnitt	1341,62967	1407,06964
Varians	13831,88883	21614,92276	Varians	8268,91203	8890,00185
Observasjoner	23	16	Observasjoner	24	12
fg	28		fg	21	
t-Stat	3,87560		t-Stat	-1,98634	
P(T<=t) ensidig	0,00029		P(T<=t) ensidig	0,03010	
T-kritisk, ensidig	1,70113		T-kritisk, ensidig	1,72074	
P(T<=t) tosidig	0,00059		P(T<=t) tosidig	0,06020	
T-kritisk, tosidig	2,04841		T-kritisk, tosidig	2,07961	

2020-7743-1 DELTA	DGF	Biolab	2020-7743-2 DELTA	DGF	Biolab
Gjennomsnitt	573,96553	571,22984	Gjennomsnitt	402,94968	462,22039
Varians	3630,52823	2141,85657	Varians	4257,92903	1591,85200
Observasjoner	22	16	Observasjoner	23	12
fg	36		fg	32	
t-Stat	0,15824		t-Stat	-3,32488	
P(T<=t) ensidig	0,43758		P(T<=t) ensidig	0,00111	
T-kritisk, ensidig	1,68830		T-kritisk, ensidig	1,69389	
P(T<=t) tosidig	0,87515		P(T<=t) tosidig	0,00223	
T-kritisk, tosidig	2,02809		T-kritisk, tosidig	2,03693	

Vedlegg tabell 15 F-testresultater for 2020-1619-1. t-Test: To utvalg for varianser.

2020-1619-1	Masterlab	Biolab
Gjennomsnitt	301,179417	280,422465
Varians	1796,32388	740,0980836
Observasjoner	10	5
fg	9	4
F	0,41200704	
P(F<=f) en side	0,20397192	
F-kritisk, en side	0,16670059	

Vedlegg tabell 16. t-testresultater for 2020-1619-1. t-Test: To utvalg med antatt like varianser. Antatt avvik mellom gjennomsnittene er 0.

2020-1619-1	Masterlab	Biolab
Gjennomsnitt	301,179417	280,422465
Varians	1796,32388	740,0980836
Observasjoner	10	5
Gruppevarians	1471,33132	
fg	13	
t-Stat	0,987979	
P(T<=t) ensidig	0,17059784	
T-kritisk, ensidig	1,7709334	
P(T<=t) tosidig	0,34119568	
T-kritisk, tosidig	2,16036866	

Vedlegg 8 Presisjon

Vedlegg tabell 17.Repeterbarhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Presisjon

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil alfatokoferol

Prøve ID	Dato	Resultat 1 (R1)	Resultat 2 (R2)	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	17.11.2020	30,95	28,50	2,44	5,9731	29,73	1
2020-7919-1 (KP)	19.11.2020	29,35	29,32	0,03	0,001	29,34	2
2020-7919-1 (KP)	24.11.2020	28,08	27,04	1,04	1,08	27,56	3
2020-7919-1 (KP)	25.11.2020	29,90	30,25	-0,35	0,12	30,07	4
2020-7919-1 (KP)	26.11.2020	28,81	28,60	0,22	0,05	28,71	5
2020-7743-1	11.11.2020	1008,08	1005,87	2,21	4,88	1006,98	6
2020-7743-1	17.11.2020	1023,82	1012,41	11,41	130,17	1018,12	7
2020-7743-1	19.11.2020	1015,83	1026,80	-10,98	120,47	1021,31	8
2020-7743-1	24.11.2020	935,33	913,50	21,83	476,75	924,41	9
2020-7743-1	25.11.2020	1015,89	977,58	38,30	1467,20	996,73	10
2020-7743-1	26.11.2020	924,74	963,97	-39,23	1539,31	944,35	11
2020-7743-2	11.11.2020	410,16	414,88	-4,71	22,22	412,52	12
2020-7743-2	17.11.2020	412,52	411,37	1,15	1,32	411,94	13
2020-7743-2	24.11.2020	352,39	377,22	-24,83	616,50	364,80	14
2020-7743-2	25.11.2020	368,51	411,69	-43,18	1864,30	390,10	15
2020-7743-2	26.11.2020	401,21	392,98	8,23	67,70	397,10	16
2020-5672-1	19.11.2020	542,86	560,36	-17,51	306,46	551,61	17
2020-5672-1	24.11.2020	587,13	524,59	62,55	3912,13	555,86	18
2020-5672-1	25.11.2020	526,61	542,39	-15,78	249,10	534,50	19
2020-5672-1	26.11.2020	374,80	506,00	-131,19	17211,60	440,40	20
2020-6324-1	19.11.2020	19,39	15,94	3,45	11,92	17,67	21
2020-6324-1	24.11.2020	17,61	15,35	2,26	5,11	16,48	22
2020-6324-1	25.11.2020	18,34	18,79	-0,44	0,19	18,56	23
2020-6324-1	26.11.2020	18,86	19,04	-0,18	0,03	18,95	24

n= **24** SUM Diff.²= **28014,59** Snitt= **424,49**

Repeterbarhet (s_r)

s_r og $s_{Ri} = \text{ROT}((\text{SUM}(R_1-R_2)^2)/2n)$	24,16
$r = 2,8 * s_r$	68,33
Relativ standard avvik for repeterbarhet, RSD _r ,%	5,69

Beregning utført (dato/sign.):

29.3.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 18.Repeterbarhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Presisjon

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil betatokoferol

Prøve ID	Dato	Resultat 1 (R1)	Resultat 2 (R2)	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	17.11.2020	3,45	2,53	0,91	0,83	2,99	1
2020-7919-1 (KP)	19.11.2020	3,20	3,40	-0,20	0,04	3,30	2
2020-7919-1 (KP)	24.11.2020	2,95	2,63	0,32	0,10	2,79	3
2020-7919-1 (KP)	25.11.2020	3,15	3,39	-0,25	0,06	3,27	4
2020-7919-1 (KP)	26.11.2020	3,25	3,39	-0,14	0,02	3,32	5
2020-7743-1	11.11.2020	86,63	85,86	0,77	0,59	86,25	6
2020-7743-1	17.11.2020	86,33	88,05	-1,72	2,94	87,19	7
2020-7743-1	19.11.2020	88,60	91,23	-2,63	6,90	89,91	8
2020-7743-1	24.11.2020	83,04	80,28	2,77	7,65	81,66	9
2020-7743-1	25.11.2020	90,55	87,38	3,18	10,09	88,96	10
2020-7743-1	26.11.2020	84,47	86,62	-2,15	4,63	85,54	11
2020-7743-2	11.11.2020	51,39	54,05	-2,65	7,05	52,72	12
2020-7743-2	17.11.2020	55,79	55,73	0,06	0,00	55,76	13
2020-7743-2	24.11.2020	51,88	45,14	6,74	45,42	48,51	14
2020-7743-2	25.11.2020	49,51	55,56	-6,05	36,55	52,53	15
2020-7743-2	26.11.2020	47,51	47,55	-0,04	0,00	47,53	16
2020-5672-1	19.11.2020	6,65	6,81	-0,17	0,03	6,73	17
2020-5672-1	24.11.2020	3,10	4,63	-1,53	2,34	3,87	18
2020-5672-1	25.11.2020	7,06	7,12	-0,06	0,00	7,09	19
2020-5672-1	26.11.2020	5,90	6,60	-0,69	0,48	6,25	20
2020-6324-1	19.11.2020	3,92	3,32	0,60	0,36	3,62	21
2020-6324-1	24.11.2020	4,09	3,37	0,72	0,52	3,73	22
2020-6324-1	25.11.2020	3,57	3,88	-0,32	0,10	3,72	23
2020-6324-1	26.11.2020	4,12	3,85	0,27	0,08	3,98	24

n= **24** SUM Diff.²= **126,80** Snitt= **34,63**

Repeterbarhet (s_r)

s_r og $s_{Ri} = \text{ROT}((\text{SUM}(R_1 - R_2)^2) / 2n)$	1,63
$r = 2,8 * s_r$	4,60
Relativ standard avvik for repeterbarhet, RSD _r , %	4,69

Beregning utført (dato/sign.):

29.3.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 19. Repeterbarhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Presisjon

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil gammatokoferol

Prøve ID	Dato	Resultat 1 (R1)	Resultat 2 (R2)	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	17.11.2020	32,92	31,58	1,34	1,78	32,25	1
2020-7919-1 (KP)	19.11.2020	31,87	31,38	0,49	0,24	31,63	2
2020-7919-1 (KP)	24.11.2020	30,67	30,82	-0,15	0,02	30,74	3
2020-7919-1 (KP)	25.11.2020	32,33	32,78	-0,45	0,20	32,56	4
2020-7919-1 (KP)	26.11.2020	31,08	30,96	0,12	0,02	31,02	5
2020-7743-1	11.11.2020	1997,70	1988,40	9,29	86,39	1993,05	6
2020-7743-1	17.11.2020	2060,96	2047,99	12,97	168,25	2054,48	7
2020-7743-1	19.11.2020	1957,30	1980,51	-23,21	538,75	1968,91	8
2020-7743-1	24.11.2020	1809,03	1736,59	72,44	5247,67	1772,81	9
2020-7743-1	25.11.2020	1964,85	1903,74	61,10	3733,64	1934,29	10
2020-7743-1	26.11.2020	1756,46	1842,11	-85,64	7334,89	1799,29	11
2020-7743-2	11.11.2020	1462,06	1478,60	-16,53	273,32	1470,33	12
2020-7743-2	17.11.2020	1498,35	1491,56	6,78	46,02	1494,95	13
2020-7743-2	24.11.2020	1231,95	1277,69	-45,73	2091,54	1254,82	14
2020-7743-2	25.11.2020	1333,93	1483,38	-149,45	22336,35	1408,66	15
2020-7743-2	26.11.2020	1348,45	1340,73	7,72	59,55	1344,59	16
2020-5672-1	19.11.2020	93,38	93,12	0,26	0,07	93,25	17
2020-5672-1	24.11.2020	93,67	92,89	0,78	0,61	93,28	18
2020-5672-1	25.11.2020	97,23	98,17	-0,94	0,88	97,70	19
2020-5672-1	26.11.2020	76,70	94,41	-17,71	313,68	85,55	20
2020-6324-1	19.11.2020	41,95	34,27	7,67	58,87	38,11	21
2020-6324-1	24.11.2020	36,63	32,83	3,80	14,46	34,73	22
2020-6324-1	25.11.2020	39,90	39,25	0,65	0,43	39,58	23
2020-6324-1	26.11.2020	40,09	41,06	-0,97	0,95	40,58	24

n=

24

SUM
Diff.²=

42308,59

Snitt= 799,05

Repeterbarhet (s_r)

$$s_r \text{ og } s_{Ri} = \text{ROT}((\text{SUM}(R_1 - R_2)^2) / 2n) \quad 29,69$$

$$r = 2,8 * s_r \quad 83,97$$

$$\text{Relativ standard avvik for repeterbarhet, RSD}_r, \% \quad 3,72$$

Beregning utført (dato/sign.):

29.3.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 20.Repeterbarhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Presisjon

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil deltatokoferol

Prøve ID	Dato	Resultat 1 (R1)	Resultat 2 (R2)	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	17.11.2020	14,51	13,17	1,34	1,8010	13,84	1
2020-7919-1 (KP)	19.11.2020	14,24	14,63	-0,39	0,1505	14,43	2
2020-7919-1 (KP)	24.11.2020	13,76	13,38	0,38	0,1471	13,57	3
2020-7919-1 (KP)	25.11.2020	14,24	14,93	-0,69	0,4775	14,59	4
2020-7919-1 (KP)	26.11.2020	14,37	14,52	-0,15	0,0225	14,45	5
2020-7743-1	11.11.2020	618,00	608,17	9,84	96,7477	613,08	6
2020-7743-1	17.11.2020	625,30	626,30	-1,00	1,0060	625,80	7
2020-7743-1	19.11.2020	587,48	612,90	-25,42	646,1764	600,19	8
2020-7743-1	24.11.2020	545,17	516,56	28,61	818,4463	530,87	9
2020-7743-1	25.11.2020	588,43	565,81	22,62	511,8001	577,12	10
2020-7743-1	26.11.2020	535,70	546,49	-10,78	116,2731	541,10	11
2020-7743-2	11.11.2020	490,16	492,29	-2,13	4,5220	491,22	12
2020-7743-2	17.11.2020	503,51	494,80	8,71	75,8467	499,16	13
2020-7743-2	24.11.2020	418,53	401,30	17,23	296,8844	409,91	14
2020-7743-2	25.11.2020	441,79	491,03	-49,24	2424,7253	466,41	15
2020-7743-2	26.11.2020	409,00	421,78	-12,78	163,2134	415,39	16
2020-5672-1	19.11.2020	28,33	28,82	-0,49	0,2411	28,57	17
2020-5672-1	24.11.2020	27,59	27,48	0,10	0,0106	27,54	18
2020-5672-1	25.11.2020	28,72	29,67	-0,95	0,9006	29,20	19
2020-5672-1	26.11.2020	28,20	28,74	-0,53	0,2830	28,47	20
2020-6324-1	19.11.2020	24,31	22,83	1,48	2,1904	23,57	21
2020-6324-1	24.11.2020	23,40	23,00	0,40	0,1568	23,20	22
2020-6324-1	25.11.2020	23,26	23,54	-0,28	0,0795	23,40	23
2020-6324-1	26.11.2020	23,94	23,25	0,69	0,4706	23,60	24

n= **24** SUM Diff.²= **5162,57** Snitt= **252,03**

Repeterbarhet (s_r)

s_r og $s_{Ri} = \text{ROT}((\text{SUM}(R_1-R_2)^2)/2n)$	10,37
$r = 2,8 * s_r$	29,33
Relativ standard avvik for repeterbarhet, RSD _r ,%	4,11

Beregning utført (dato/sign.): 29.3.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg 9 Måleusikkerhet

Vedlegg tabell 21 Måleusikkerhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Måleusikkerhet

Analyse: **BIOLAB A 121 Tokoferolprofil alfatokoferol (>2 mg/kg)**

Prøve ID	Nofima	Ekstern "x̄"	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	29,080	27,100	1,98	3,92	28,09	1
2020-7743-1	982,554	994,330	-11,78	138,67	988,44	2
2020-7743-2	397,847	376,140	21,71	471,19	386,99	3
2020-5672-1	541,419	566,000	-24,58	604,21	553,71	4
2020-6324-1	17,916	15,500	2,42	5,84	16,71	5
2020-6325-1	18,027	13,300	4,73	22,34	15,66	6
2020-0725-1	14,244	10,000	4,24	18,01	12,12	7
2019-7340-1	14,398	12,000	2,40	5,75	13,20	8
2019-4210-1	21,671	22,400	-0,73	0,53	22,04	9
2019-3352-3	332,039	388,000	-55,96	3131,63	360,02	10
2020-0610-1	587,121	596,000	-8,88	78,84	591,56	11

n= **11** SUM Diff.²= **4480,93** Snitt= **271,69**

Repetierbarhet

$$s_r = \text{ROT}((\text{SUM}(\text{Nofima} - \bar{x})^2) / 2n)$$

14,27

Måleusikkerhet

Nofima- \bar{x} % RSD s_r 5,25

Nofima % RSD s_r 5,69

(hentet fra presisjon)

$$U_{\text{Nofima}-\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum(\text{Nofima} - \bar{x})^2}}{2n} \quad \mathbf{14,27}$$

U_{Nofima} 15,46

$$U_c = \sqrt{(u_{\text{Nofima}}^2 + u_{\text{Nofima}-\bar{x}}^2)} \quad 21,0$$

$U = 2 \times U_c$ 42,1

% RSD (+/- 2s) 15

Beregning utført (dato/sign.):

21.4.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 22 Måleusikkerhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Måleusikkerhet

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil betatokoferol (2-10 mg/kg)

Prøve ID	Nofima	Ekstern "x"	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	3,132	5,000	-1,87	3,49	4,07	1
2020-5672-1	5,996	5,000	1,00	0,99	5,50	2
2020-6324-1	3,764	5,000	-1,24	1,53	4,38	3
2020-6325-1	3,887	5,000	-1,11	1,24	4,44	4
2020-0725-1	4,182	5,000	-0,82	0,67	4,59	5
2019-7340-1	4,612	5,000	-0,39	0,15	4,81	6
2019-4210-1	3,825	6,19	-2,37	5,59	5,01	7
2019-3352-3	5,015	8,51	-3,50	12,22	6,76	8

n= **8** SUM Diff.²= **8,07** Snitt= **4,63**

Repeterbarhet

$$s_r = \text{ROT}((\text{SUM}(\text{Nofima} - \bar{x})^2) / 2n)$$

0,71

Måleusikkerhet

Nofima- \bar{x} % RSD s_r 15,33

Nofima % RSD s_r 4,69

(hentet fra presisjon)

$$U_{\text{Nofima}-\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum(\text{Nofima} - \bar{x})^2}}{2} \quad \mathbf{0,71}$$

U_{Nofima} 0,22

$$U_c = \sqrt{(u_{\text{Nofima}}^2 + u_{\text{Nofima}-\bar{x}}^2)} \quad 0,7$$

$U = 2 \times U_c$ 1,5

% RSD (+/- 2s) 32

Beregning utført (dato/sign.):

21.4.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 23 Måleusikkerhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Måleusikkerhet

Analyse:

BIOLAB A 121 Tokoferolprofil betatokoferol (> 10 mg/kg)

Prøve ID	Nofima	Ekstern "x"	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7743-1	86,473	71,08	15,39	236,94	78,78	1
2020-7743-2	52,264	37,05	15,21	231,47	44,66	2
2020-610-1	19,280	11	8,28	68,56	15,14	3

n= **3** SUM Diff.²= **536,98** Snitt= **46,19**

Repeterbarhet

$$s_r = \text{ROT}((\text{SUM}(\text{Nofima} - \bar{x})^2) / 2n)$$

9,46

Måleusikkerhet

Nofima- \bar{x} % RSD s_r 20,48

Nofima % RSD s_r 4,69

(hentet fra
presisjon)

$$u_{\text{Nofima}-\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum(\text{Nofima} - \bar{x})^2}}{2n} \quad \mathbf{9,46}$$

u_{Nofima} 2,17

$$U_c = \sqrt{(u_{\text{Nofima}}^2 + u_{\text{Nofima}-\bar{x}}^2)} \quad 9,7$$

$U = 2 \times U_c$ 19,4

% RSD (+/- 2s) 42

Beregning utført (dato/sign.):

21.4.2021 Noora Heikintalo

Måleusikkerhet

Analyse: **BIOLAB A 121 Tokoferolprofil gammatokoferol (>2 mg/kg)**

Prøve ID	Nofima	Ekstern "x"	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	31,639	29,200	2,44	5,95	30,42	1
2020-7743-1	1915,314	2057,89	-142,58	20328,01	1986,60	2
2020-7743-2	1407,070	1337,72	69,35	4809,37	1372,39	3
2020-5672-1	94,694	86,000	8,69	75,59	90,35	4
2020-6324-1	38,248	37,700	0,55	0,30	37,97	5
2020-6325-1	34,889	29,700	5,19	26,92	32,29	6
2020-0725-1	28,155	27,100	1,06	1,11	27,63	7
2019-7340-1	37,027	44,600	-7,57	57,36	40,81	8
2019-4210-1	41,143	47,6	-6,46	41,70	44,37	9
2019-3352-3	54,461	51,8	2,66	7,08	53,13	10
2020-0610-1	48,921	41,3	7,62	58,08	45,11	11

n= **11** SUM Diff.²= **25411,47** Snitt= **341,92**

Repeterbarhet

$$s_r = \text{ROT}((\text{SUM}(\text{Nofima} - \bar{x})^2) / 2n) = 33,99$$

Måleusikkerhet

Nofima- \bar{x} % RSD s_r 9,94
 Nofima % RSD s_r 3,72 (hentet fra presisjon)

$$u_{\text{Nofima}-\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum(\text{Nofima} - \bar{x})^2}}{2n} = 33,99$$

$$u_{\text{Nofima}} = 12,70$$

$$U_c = \sqrt{(u_{\text{Nofima}}^2 + u_{\text{Nofima} - \bar{x}}^2)} = 36,3$$

$$U = 2 \times U_c = 72,6$$

$$\% \text{RSD } (+/- 2s) = 21$$

Beregning utført (dato/sign.): 21.4.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg tabell 25 Måleusikkerhet beregningen for tokoferol analysert i Biolab.

Måleusikkerhet

Analyse: **BIOLAB A 121 Tokoferolprofil deltatokoferol (>2 mg/kg)**

Prøve ID	Nofima	Ekstern "x"	Diff.	Diff. ²	Snitt	Antall, n
2020-7919-1 (KP)	14,175	11,600	2,58	6,63	12,89	1
2020-7743-1	578,867	581,13	-2,26	5,12	580,00	2
2020-7743-2	462,220	403,87	58,35	3404,77	433,05	3
2020-5672-1	28,477	23,600	4,88	23,79	26,04	4
2020-6324-1	23,442	19,000	4,44	19,73	21,22	5
2020-6325-1	23,726	15,800	7,93	62,81	19,76	6
2020-0725-1	18,126	15,500	2,63	6,90	16,81	7
2019-7340-1	30,370	28,900	1,47	2,16	29,63	8
2019-4210-1	30,843	31,5	-0,66	0,43	31,17	9
2019-3352-3	4,428	7,28	-2,85	8,14	5,85	10
2020-0610-1	29,217	15,4	13,82	190,91	22,31	11

n= **11** SUM Diff.²= **3731,38** Snitt= **108,98**

Repeterbarhet	
$s_r = \text{ROT}((\text{SUM}(\text{Nofima} - \bar{x})^2) / 2n)$	13,02

Måleusikkerhet		
Nofima- \bar{x}	% RSD s_r	11,95
Nofima	% RSD s_r	4,11
$U_{\text{Nofima}-\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum(\text{Nofima} - \bar{x})^2}}{2n}$		13,02
U_{Nofima}		4,48
$U_c = \sqrt{(u_{\text{Nofima}}^2 + u_{\text{Nofima} - \bar{x}}^2)}$		13,8
$U = 2 \times U_c$		27,5
% RSD (+/- 2s)		25

(hentet fra presisjon)

Beregning utført (dato/sign.): 21.4.2021 Noora Heikintalo

Vedlegg 10 Kontrollkort for ringtest, E_n-verdi

Vedlegg tabell 26 Kontrollkort for ringtest, E_n-verdi, alfatokoferol

Kontrollkort for ringtester

Mal-versjon 3.0
Endringsprotokoll nederst på siden.

Måleområde: Skriv inn høyeste verdi for **nedre** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4. Dersom det kun er ett måleområde, la feltet være tomt.

Målesikkerhet % +/- U (2s): Skriv inn utvidet målesikkerhet for **høyt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.

Skriv inn utvidet målesikkerhet for **lavt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4

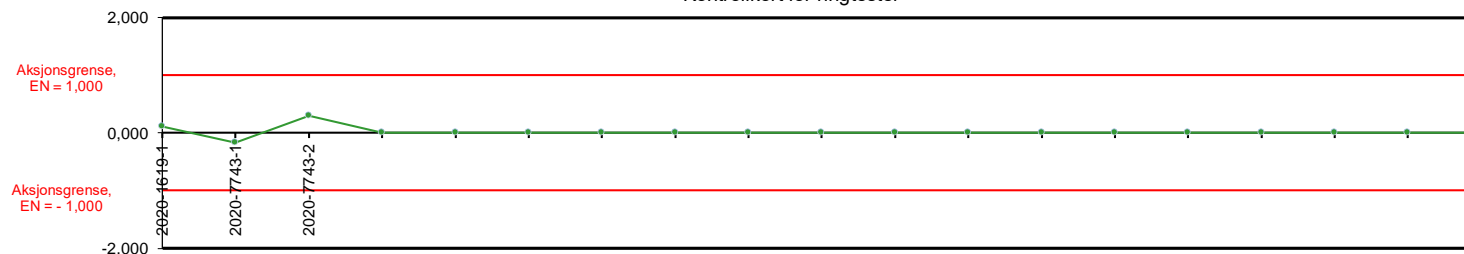
Skriv inn samme verdi i begge felt dersom det kun er ett måleområde

Ringtestarranger	Masterlab	DGF	DGF																
Prøve nr	2020-1619-1	2020-7743-1	2020-7743-2																
Prøve type	Før	Olje	Olje																
Dato	1.11.20	1.11.20	1.11.20																
Utført av	Nohe	Nohe	Nohe																
Vårt resultat	307,90	969,27	397,85																
Utestema (U _z)	23,09	72,70	29,84																
Middelverdi	301,18	994,33	376,14																
Antall deltakere	12	26	27																
u _{SLP} (standardavvik)	63,25	124,48	111,59																
E _n -verdi *	0,114	-0,163	0,295																
Trend vurdering																			
Anmerkninger	Masterlab har bare alfatokoferol.	Verdier på mg/kg finnes i tokolesterol valideringsrapport.																	
Kvalitetskoordinator																			
Metodeansvarlig	NOHE	NOHE	NOHE																

$$E_n\text{-verdi} = \frac{\text{Nofima} - \bar{X}}{\sqrt{2 \cdot u \cdot \text{Nofima}} \cdot \left(\frac{2 \cdot u \cdot SLP}{\sqrt{n}} \right)}$$

Der n = Antall deltakere

Kontrollkort for ringtester



Endringer siden siste versjon:

Signaturfelt for laboratorieleder fjernet. Lagt til mulighet for å sette inn målesikkerhet for høyt og lavt måleområde. Oppdatert formel med "Nofima" i stedet for "FF" og "SSF"

Vedlegg tabell 27 Kontrollkort for ringtest, En-verdi, betatokoferol

Kontrollkort for ringtester

Mal-versjon 3.0
Endringsprotokoll nederst på siden.

Måleområde: 2,0 Skriv inn høyeste verdi for **nedre** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4. Dersom det kun er ett måleområde, la feltet være tomt.

Målesikkerhet % +/- U (2s): 32 Skriv inn utvidet målesikkerhet for **høyt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.

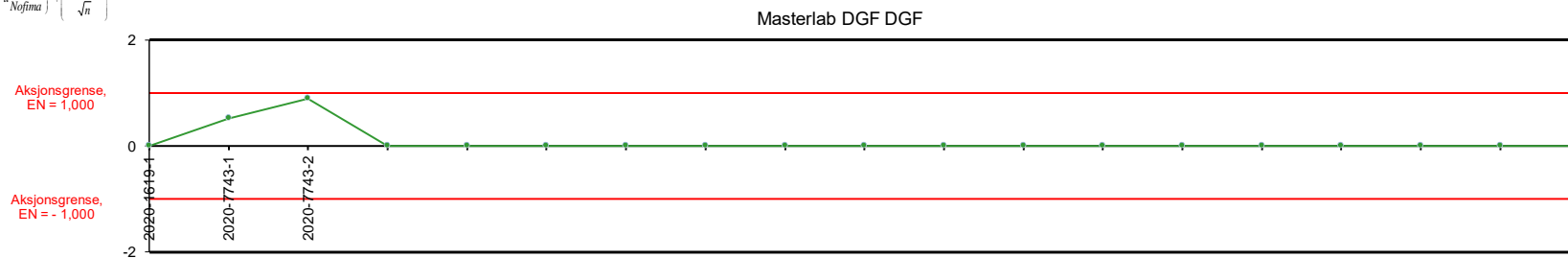
42 Skriv inn utvidet målesikkerhet for **lavt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4

Skriv inn samme verdi i begge felt dersom det kun er ett måleområde

Ringtestarrangør	Masterlab	DGF	DGF																
Prøve nr	2020-1619-1	2020-7743-1	2020-7743-2																
Prøve type	Fôr	Olje	Olje																
Dato	1.11.2020	1.11.2020	1.11.2020																
Utført av	Nohe	Nohe	Nohe																
Vårt resultat	85,50	52,26	52,26																
uNofima (Uc)		13,68	8,36																
Middelverdi		71,08	37,05																
Antall deltakere		24	25																
uSLP (standardavvik)		14,36	6,67																
En-verdi *		0,515	0,898																
Trend vurdering																			
Anmerkninger																			
Kvalitetskoordinator																			
Metodeansvarlig	NOHE	NOHE	NOHE																

$$E_n - \text{verdi} = \frac{\text{Nofima} - \bar{X}}{\sqrt{\left(\frac{2 \cdot u_{\text{Nofima}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot u_{\text{SLP}}}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

Der n = Antall deltakere



Endringer siden siste versjon:

Signaturfelt for laboratorieleder fjernet. Lagt til mulighet for å sette inn målesikkerhet for høyt og lavt måleområde. Oppdatert formler med "Nofima" i stedet for "FF" og "SSF"

Vedlegg tabell 28 Kontrollkort for ringtest, En-verdi, gammatokoferol

Kontrollkort for ringtester

Mal-versjon 3.0
Endringsprotokoll nederst på siden.

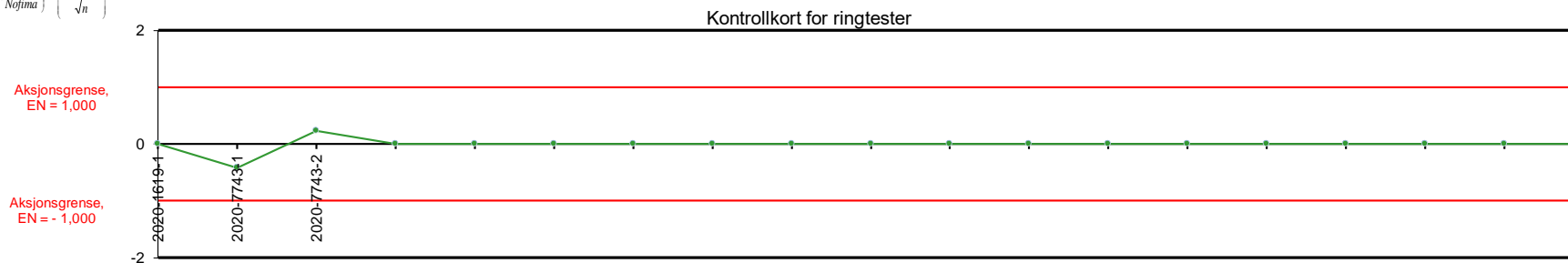
Måleområde: Skriv inn høyeste verdi for **nedre** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4. Dersom det kun er ett måleområde, la fellet være tomt.

Målesikkerhet % +/- U (2s): Skriv inn utvidet målesikkerhet for **høyt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.
 Skriv inn utvidet målesikkerhet for **lavt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.
 Skriv inn samme verdi i begge felt dersom det kun er ett måleområde

Ringtestarrangør	Masterlab	DGF	DGF															
Prøve nr	2020-1619-1	2020-7743-1	2020-7743-2															
Prøve type	Før	Olje	Olje															
Dato	1.11.2020	1.11.2020	1.11.2020															
Utført av	Nohe	Nohe	Nohe															
Vårt resultat		1888,54	1407,07															
uNofima (Uc)		198,30	147,74															
Middelverdi		2057,89	1337,72															
Antall deltakere		26	27															
uSLP (standardavvik)		106,43	85,58															
En-verdi *		-0,425	0,233															
Trend vurdering																		
Anmerkninger																		
Kvalitetskoordinator																		
Metodeansvarlig	NOHE	NOHE	NOHE															

$$E_s\text{-verdi} = \frac{Nofima - \bar{X}}{\sqrt{\left(2 \cdot u_{Nofima}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot u_{SLP}}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

Der n = Antall deltakere



Endringer siden siste versjon:

Signaturfelt for laboratorieleder fjernet. Lagt til mulighet for å sette inn målesikkerhet for høyt og lavt måleområde. Oppdatert formulering med "Nofima" i stedet for "FF" og "SSF"

Vedlegg tabell 29 Kontrollkort for ringtest, En-verdi, deltatokoferol

Kontrollkort for ringtester

Mal-versjon 3.0
Endringsprotokoll nederst på siden.

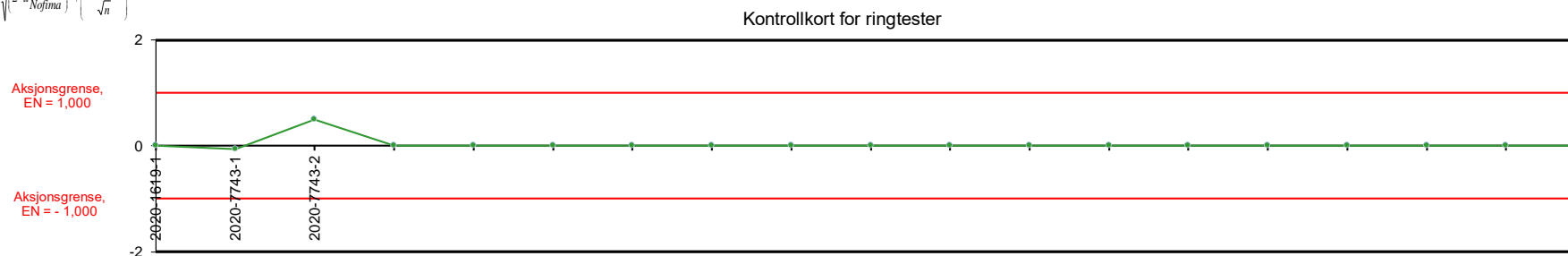
Måleområde: Skriv inn høyeste verdi for **nedre** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4. Dersom det kun er ett måleområde, la feltet være tomt.

Måleusikkerhet % +/- U (2s): Skriv inn utvidet måleusikkerhet for **høyt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.
 Skriv inn utvidet måleusikkerhet for **lavt** måleområde, se tabell i BioLab KH 02.4.
 Skriv inn samme verdi i begge felt dersom det kun er ett måleområde

Ringtestarranger	Masterlab	DGF	DGF															
Prøve nr	2020-1619-1	2020-7743-1	2020-7743-2															
Prøve type	Før	Olje	Olje															
Dato	1.11.2020	1.11.2020	1.11.2020															
Utført av	Nohe	Nohe	Nohe															
Vårt resultat		571,23	462,22															
uNofima (Uc)		71,40	57,78															
Middelverdi		581,13	403,87															
Antall deltakere		26	27															
uSLP (standardavvik)		81,02	69,77															
En-verdi *		-0,068	0,492															
Trend vurdering																		
Anmerkninger																		
Kvalitetskoordinator																		
Metodeansvarlig	NOHE	NOHE	NOHE															

$$E_n - \text{verdi} = \frac{\text{Nofima} - \bar{X}}{\sqrt{\left(2 \cdot u_{\text{Nofima}}\right)^2 + \left(\frac{2 \cdot u_{\text{SLP}}}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

Der n = Antall deltakere



Endringer siden siste versjon:

Signaturfelt for laboratorieleder fjernet. Lagt til mulighet for å sette inn måleusikkerhet for høyt og lavt måleområde. Oppdatert formler med "Nofima" i stedet for "FF" og "SSF"

