

Valideringsrapport – tilleggsrapport

Analyse av cystein/cystin (BIOLAB A99) ved bruk av Büchi Multivapor™ og Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 10/2023	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-744-0	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 23. mai 2023	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 20 + 9	<i>Prosjektnummer:</i> 11277
<i>Tittel:</i> Valideringsrapport – tilleggsrapport: Analyse av cystein/cystin (BIOLAB A99) ved bruk av Büchi Multivapor™ og Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra		
<i>Title:</i> Validation report – supplementary report: Analysis of cysteine/cystine (BIOLAB A99) using Büchi Multivapor™ and Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra		
<i>Forfatter(e):</i> Gunnhild Gjengedal		
<i>Avdeling:</i> Biolab		
<i>Oppdragsgiver:</i> Intern		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i>		
<i>Stikkord:</i> Validering, cystein, cystin, Multivapor, UPLC		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Det ble validert nytt inndampingsutstyr (Büchi Multivapor™) og nytt instrument (Waters ACQUITY UPLC) for metoden BIOLAB A99 Cystein/cystin. Selektivitet, linearitet, robusthet, presisjon og riktighet ble validert, måleområde ble vurdert, og måleusikkerhet ble beregnet. Valideringen demonstrerte at ytelsen til metoden er god og som forventet.		
<i>English summary/recommendation:</i> New evaporation equipment (Büchi Multivapor™) and a new instrument (Waters ACQUITY UPLC) was validated for the method BIOLAB A99 Cysteine/cystine. Selectivity, linearity, robustness, precision, and accuracy were validated, measurement range was assessed, and measurement uncertainty was calculated. The validation demonstrated that the performance of the method is good and as expected.		

Innhold

1	Innledning	5
2	Teori	6
2.1	Prinsipp	6
2.2	Grad av validering	7
2.3	Avvik fra metodereferansen	7
2.4	Valideringsparametre	8
2.4.1	Selektivitet	8
2.4.2	Linearitet	8
2.4.3	Presisjon	8
2.4.4	Riktighet/nøyaktighet	8
2.4.5	Måleområde	9
2.4.6	Måleusikkerhet	9
3	Eksperimentelt	10
3.1	Selektivitet	10
3.2	Linearitet	10
3.3	Robusthet	10
3.4	Presisjon	10
3.5	Riktighet	11
3.6	Sammenligning mellom HPLC og UPLC	11
4	Resultater og diskusjon	12
4.1	Selektivitet	12
4.2	Linearitet	12
4.3	Robusthet	14
4.4	Presisjon	14
4.4.1	Repeterbarhet	14
4.4.2	Intern reproduserbarhet	15
4.4.3	Instrumentets presisjon	15
4.5	Riktighet	16
4.6	Sammenligning mellom HPLC og UPLC	17
4.7	Måleusikkerhet	18
5	Konklusjon	19
6	Referanser	20
	Vedlegg 1 – Linearitet	II
	Vedlegg 2 – Robusthet	III
	Vedlegg 3 – Presisjon	IV
	Vedlegg 4 – Sammenligning mellom HPLC og UPLC	VIII
	Vedlegg 5 – Måleusikkerhet	IX

1 Innledning

Det ble validert nytt inndampingsutstyr (Büchi Multivapor™) og et nytt instrument (Waters ACQUITY UPLC (ultra performance liquid chromatography) I-Class PLUS med fluorescens- og UV-detektor) for metoden BIOLAB A 99 Cystein/cystin. Tidligere har det blitt benyttet rotavapor og HPLC (high performance liquid chromatography) av typen Waters Alliance 2695 separasjonsmodul med Waters 2475 fluorescensdetektor og Waters 2487 UV-detektor til denne analysen. Det er fluorescensdetektoren som har blitt brukt til cystein/cystin-analyser. Waters AQUITY UPLCen med fluorescensdetektor er allerede validert for totale aminosyrer (BIOLAB A 42). Denne valideringen er beskrevet i rapporten «Valideringsrapport: Analyse av totale aminosyrer (BIOLAB A42) ved bruk av Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra» (Gjengedal og Vestvik 2023), heretter kalt hovedrapport.

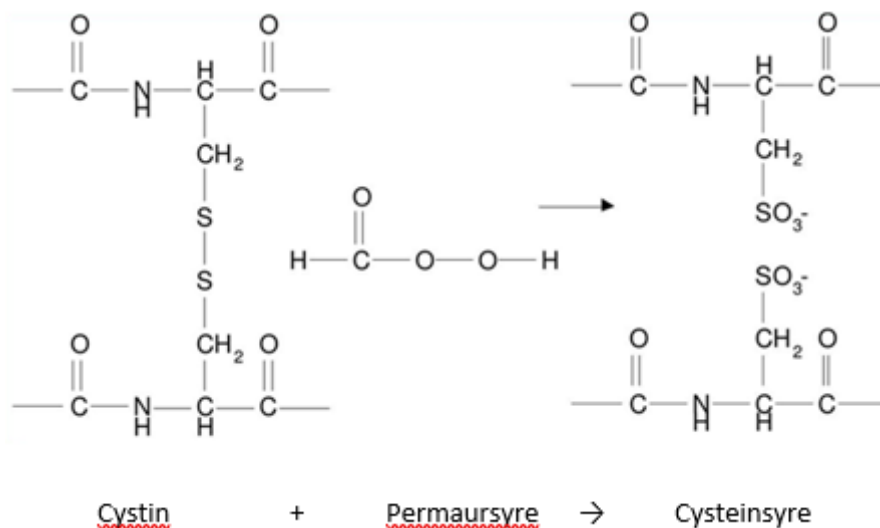
I forbindelse med bytte av instrument har også applikasjonen blitt endret fra Waters AccQ•Tag (Waters-Corporation 1994) til Waters AccQ•Tag Ultra (Waters-Corporation 2007). Prinsippet for de to applikasjonene er beskrevet i hovedrapporten (Gjengedal og Vestvik 2023).

Valideringsparametere som ble omfattet av denne valideringen er: Selektivitet, linearitet, robusthet, presisjon og riktighet, samt en vurdering av måleområde og beregning av måleusikkerhet. De fleste prøvene som er inkludert i valideringen er dampet inn på Multivapor og deretter analysert på både HPLC og UPLC (parvis) for sammenligning.

2 Teori

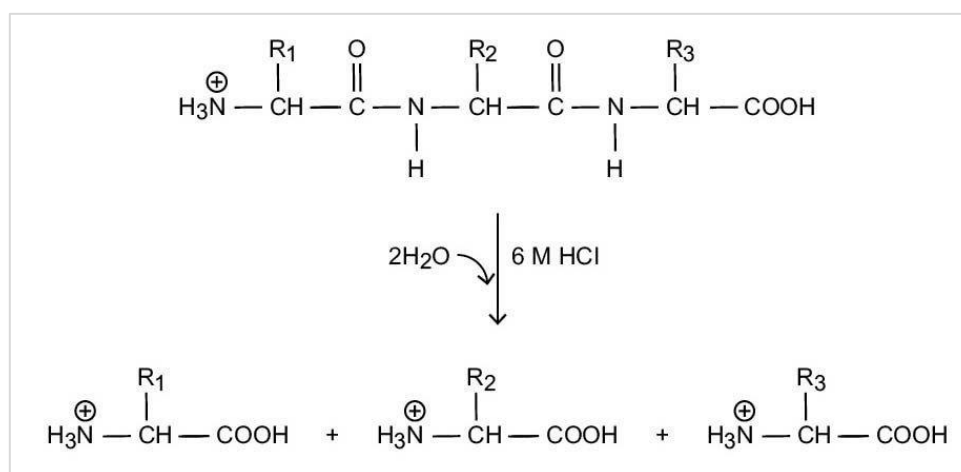
2.1 Prinsipp

Sulfidgruppene og disulfidbindingene i hhv. cystein og cystin oksideres av permaursyre (HCOOOH) til cysteinsyre. Figur 1 viser oksidasjon av cystin til cysteinsyre.



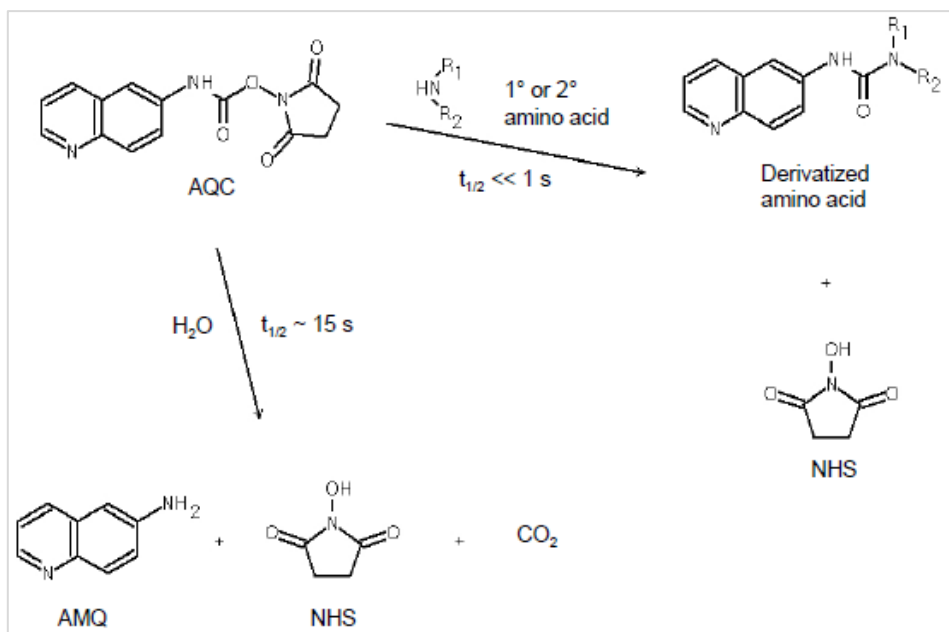
Figur 1 Oksidasjon av disulfidbindingen i cystin med permaursyre til cysteinsyre.

Oksidasjonen stoppes ved tilsats av hydrogenbromid (HBr), og deretter dampes permaursyre og HBr av ved bruk av Multivapor. Proteinet hydrolyseres så med 6 M HCl i 22 timer ved 110 °C i varmeskap. Aminosyrene inkl. cysteinsyre blir frigjort under hydrolysen ved spalting av peptidbindinger og tilførsel av et vannmolekyl til hver peptidbinding, som vist i Figur 2 (Waters-Corporation 2022).



Figur 2 Frigjøring av aminosyrer ved spalting av peptidbindinger og tilførsel av vannmolekyl (Waters-Corporation 2022).

Prøven tilsettes intern standard, fortynnes og filtreres. Det filtrerte hydrolysatet derivatiseres med 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). AQC omdanner både primære (1°) og sekundære (2°) aminosyrer til ureaderivater som er stabile i en uke ved romtemperatur og som fluorescerer. Overskuddet av AQC hydrolyseres og gir 6-aminoquinoline (AMQ), N-hydroxysuccinimide (NHS) og karbondioksid (CO₂) (Waters-Corporation 2007).



Figur 3 Reaksjon mellom AQC og primære og sekundære aminosyrer, samt hydrolyse av overskuddet av AQC til AMQ, NHS og CO₂ (Waters-Corporation 2007).

AMQ gir en signifikant topp som er lett oppløselig kromatografisk. NHS og CO₂ påvirker ikke analysen (Waters-Corporation 2007).

2.2 Grad av validering

Metoden A99 omfatter cystein og cystin. Det er ikke mulig å skille mellom cystein og cystin i prøven, alt oksideres til cysteinsyre (Cya) i analysen og Cya kvantifiseres deretter som cystein (Cys).

Det ble valgt å gjøre en full intern validering av de fleste parametre, da det er en del endringer i metoden, inkludert annen kolonne, eluenter og intern standard (Se Tabell 1 i hovedrapport). Prøvematrisene som omfattes av valideringen er fiskemel, fiskefôr, dyrefôr, soyamel, fiskefeces og krillmel, som er våre mest vanlige prøvetyper.

For oksidasjon av cystein/cystin til cysteinsyre benyttes som nevnt permaursyre. For å minske bruken av kjemikalier ble metodens robusthet testet ved en halvering av mengden permaursyre (fra 10 til 5 ml) og påfølgende halvering av mengden HBr. Det ble også gjort en sammenligning mellom HPLC og UPLC.

2.3 Avvik fra metodereferansen

Metoden har blitt optimalisert for våre prøvetyper med hjelp fra Waters Danmark. Optimaliseringen ble gjort for å blant annet bedre separasjonen mellom Cya og H-Pro. Avvikene fra metodereferansen er oppsummert i hovedrapport.

2.4 Valideringsparametre

2.4.1 Selektivitet

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

2.4.2 Linearitet

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

2.4.3 Presisjon

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

2.4.4 Riktighet/nøyaktighet

Riktighet defineres som graden av overensstemmelse mellom en prøves sanne innhold av en bestemt analytt og resultatet av en analyse (NMKL 2009).

Det finnes ikke standard/sertifisert referansemateriale med relevant prøvematriks for metoden, og derfor benyttes prøver fra sammenlignende laboratorieprøving (SLP) for å vurdere metodens riktighet/nøyaktighet.

I denne metodevalideringen ble fem tidligere mottatte SLP-prøver analysert; to prøver fra Masterlab (fiskemel og fiskefôr) og tre prøver fra AAFCO (Association of American Feed Control Officials) (sauedefôr, lama- og alpakkafôr og soyamel). De rapporterte nivåene av cystein i de fem prøvene er vist i Tabell 1.

Tabell 1 Rapporterte nivåer av cystein i SLP-prøver oppgitt i g/100 g prøve. u =usikkerhet angitt av SLP-arrangør og n =antall deltakere.

Referansenr. (j.nr. Biolab)	Prøvetype	Ref.verdi (g/100 g prøve)	u	n
202128 (2021-5241-1)	Dyrefôr (sheep feed, medicated)	0,44	0,04	23
202129 (2021-6267-1)	Soyamel	0,65	0,05	25
2-59 (BG-2022-38-1)	Fiskemel	0,76	0,12	10
3-30 (BG-2022-39-1)	Fiskefôr	0,57	0,08	8
202227 (BG-2022-1221-1)	Dyrefôr (llama and alpaca feed)	0,24	0,02	29

Formel for beregning av E_n -verdi er vist i kapittel 2.4.4 i hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

2.4.5 Måleområde

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

2.4.6 Måleusikkerhet

Den totale måleusikkerheten til metoden ble beregnet som utvidet usikkerhet med dekningsfaktor (k) lik 2, som tilsvarer 95 % konfidensintervall. Måleusikkerheten inneholder interne og eksterne usikkerhetskomponenter og ble beregnet ved bruk av formel 2.1.

$$U_C = k \times \sqrt{u_{LAB}^2 + u_{LAB-\bar{X}}^2} \quad (2.1)$$

u_{LAB} er Nofima Biolab sitt interne standardavvik for intern reproducerbarhet. Denne verdien bestemmes ut fra differanser mellom dobbeltbestemmelser av vanlige prøvematerialer med resultater i normalområdet.

$u_{LAB-\bar{X}}$ er Nofima Biolab sin usikkerhet for avvik fra gjennomsnittsverdien i sammenligningen med SLP (siden vi ikke har deltatt i SLP). Denne ble beregnet som vist i formel 2.2.

$$u_{LAB-\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum (LAB-\bar{X})^2}{2d}} \quad (2.2)$$

der d er antall dobbeltbestemmelser.

3 Eksperimentelt

3.1 Selektivitet

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

3.2 Linearitet

Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

3.3 Robusthet

Totalt 48 innveinger av fiskemel, fiskefeces, dyrefôr, soyamel og fiskefôr ble tilsatt 10 eller 5 ml permaursyre og videre 3 eller 1,5 ml HBr. Det ble veid inn cirka 30 mg protein for alle prøvetyper. Det ble gjort flest replikater av kontrollprøven og av fiskefecesprøven som var den prøven som inneholdt mest cystein (>1 g/100 g prøve). Det ble benyttet parvis t-test for å sjekke om det var signifikant forskjell på betingelsene.

3.4 Presisjon

For beregning av presisjon ble følgende prøvetyper brukt: Fiskemel og fiskefeces til beregning av repeterbarhet, og fiskefôr, krillmel og alle prøvetyper analysert i valideringen til beregning av intern reproduserbarhet. Prøveoppsett for bestemmelse av metodens presisjon er vist i Tabell 2.

Tabell 2 Prøveoppsett ved bestemmelse av metodens presisjon.

Bestemme hva	Prøvetype	Betingelser
Repeterbarhet	Fiskemel	Kort tidsrom Samme utstyr Samme prøve Samme analytiker
	Fiskefeces	Kort tidsrom Samme utstyr Samme prøve Samme analytiker
Intern reproduserbarhet	Fiskefôr	Kort tidsrom Samme utstyr Ulike prøver, men samme prøvetype (med likt nivå av Cys) Samme analytiker
	Krillmel	Kort tidsrom Samme utstyr Ulike prøver, men samme prøvetype (med likt nivå av Cys) Samme analytiker
	Alle*	Langt tidsrom Delvis ulikt utstyr Ulike prøver og prøvetyper Ulike analytikere

*Alle prøvetyper omfatter fiskemel, fiskefeces, fiskefôr, krillmel, dyrefôr og soyamel

Instrumentets presisjon ble undersøkt ved å injisere samme standardkalibreringsløsning 10 ganger (det vil si 10 injeksjoner fra samme vial).

3.5 Riktighet

Alle SLP-prøver ble analysert med fire replikater, hvor to ble analysert på HPLC og to på UPLC.

3.6 Sammenligning mellom HPLC og UPLC

De fleste prøvene fra valideringen ble analysert både på HPLC og UPLC (parvis). Det ble benyttet parvis t-test for å sjekke om det var signifikant forskjell på instrumentene.

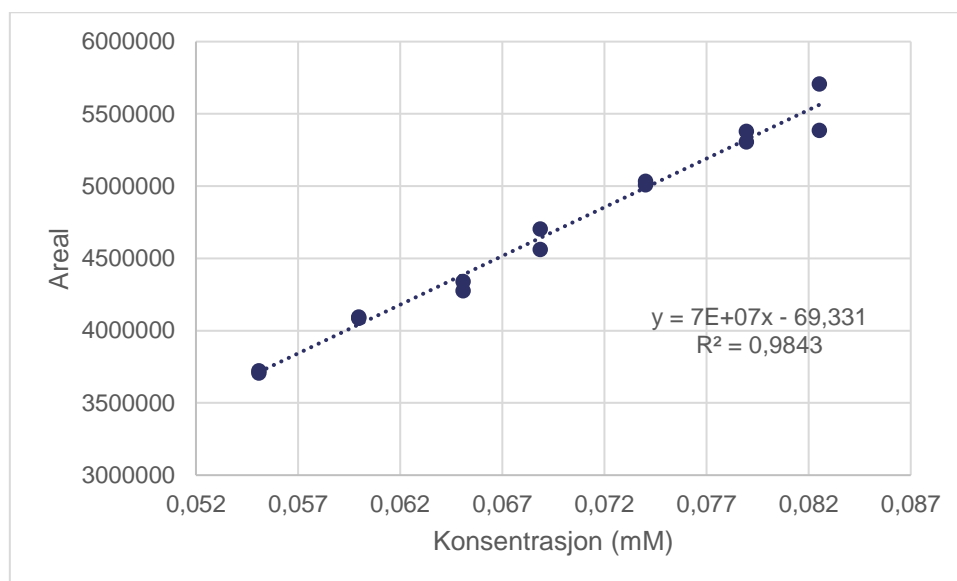
4 Resultater og diskusjon

4.1 Selektivitet

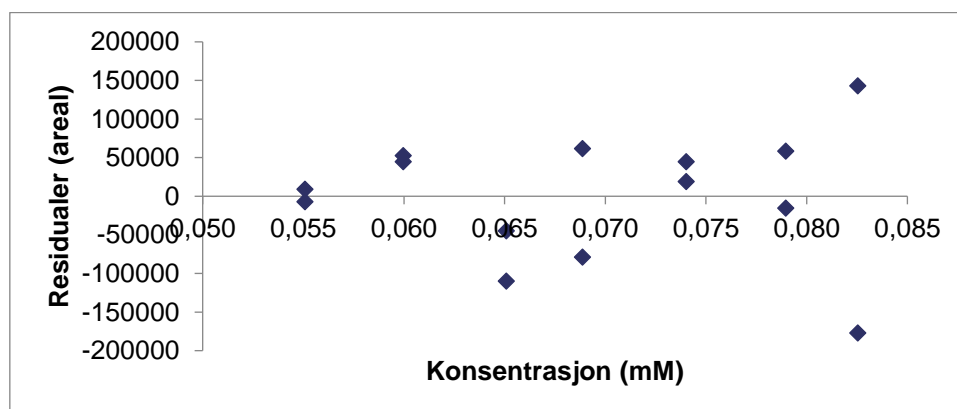
Se hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

4.2 Linearitet

Det ble analysert sju standardløsninger, som beskrevet i kapittel 3.2. Hver standardløsning ble derivatisert i paralleller og deretter analysert på UPLC i tilfeldig rekkefølge. Lineær regresjon, regresjonsstatistikk og residualplott ble utarbeidet i Microsoft Excel. Lineær regresjon og residualplott for Cya er vist i Figur 4 og Figur 5. Toppareal ved hver standardkonsentrasjon er vist i Vedlegg 1, Vedleggstabell 1.



Figur 4 Lineær regresjon for Cya.



Figur 5 Residualplott for Cya.

Figurene viser at kurvene er lineære med korrelasjonskoeffisient (R^2 -verdi) = 0,9843 og at residualene er tilfeldig fordelt rundt x-aksen. Den siste standarden (standard 7) har et høyere avvik mellom parallellene enn de andre standardene, men ved beregning av responsfaktor viser denne samme verdi for begge standardene. Avviket mellom parallellene skyldes derfor mest sannsynlig avvik i pipetteringsvolum ved derivatisering, og dette volumet vil uansett ikke ha betydning siden dette er en

intern standard-metode. Den gjennomsnittlige responsfaktoren for Cya er 1,45 med RSD = 0,45 %. Fullstendig beregning er vist i Vedlegg 1, Vedleggtabell 1.

En oppsummering av regresjonsstatistikken er vist i Tabell 3. Parameterne er beskrevet i kapittel 0 i hovedrapport (Gjengedal og Vestvik 2023).

Tabell 3 Regresjonsstatistikk for Cya.

Parameter	Cya
Observasjoner (n)	14
R ² -verdi	0,9843
F-verdi	751
t-verdi, b	0,000
p-verdi, b	1,000
Nedre 95% konf.int., b	-374209
Øvre 95% konf.int., b	374070
t-verdi, m	27,408
p-verdi, m	3,431×10 ⁻¹²
Nedre 95% konf.int., m	62050486
Øvre 95% konf.int., m	72767778

Kurven har $t\text{-verdi} < t_{\text{krit}}$ ($t_{\text{krit}}=2,179$ ved 95 % konfidensintervall, tosidig, n-2 frihetsgrader) og $p\text{-verdi} > 0,05$ for skjæringspunktet, og 95 % konfidensintervallet viser at null er en mulig verdi for skjæringen med y-aksen. For stigningstallet er $t\text{-verdi} > t_{\text{krit}}$ og $p < 0,05$. Regresjonsstatistikken viser at regresjonen er berettiget og at kurven virkelig er lineær. Dette til tross for at det er noe høy spredning for standard 7. Hvis standard 7 fjernes fra beregningen blir korrelasjonskoeffisienten noe bedre (0,9905).

4.3 Robusthet

Det ble gjort parvis t-test for sammenligning mellom 10 og 5 ml permaursyre. Resultatene av analysene er vist i Vedlegg 2, Vedleggtabell 2. Statistikkparametere er vist i Tabell 4.

Tabell 4 Statistikkparametere for parvis t-test ved sammenligning mellom 10 og 5 ml permaursyre.

Parameter	10 ml	5 ml
Gjennomsnitt (g/100 g prøve)	1,14147	1,14759
Varians (g/100 g prøve)	0,31670543	0,32758712
Observasjoner (n)	24	24
Frihetsgrader (fg)	23	
t-verdi	-0,7675505	
p-verdi (tosidig)	0,45056266	
t_{krit} (tosidig)	2,06865761	

t-verdi (absoluttverdi) er mindre enn t_{krit} ($t_{krit}=2,069$ ved 95 % konfidensintervall, tosidig, n-1 frihetsgrader), og viser at det ikke er signifikant forskjell på om det tilsettes 10 eller 5 ml permaursyre.

4.4 Presisjon

4.4.1 Repeterbarhet

Repeaterbarhet for aminosyrene ble beregnet for to av prøvetypene (fiskemel og fiskefeces) og både for HPLC og UPLC. Beregningen er basert på 6 dobbeltbestemmelser analysert på tre dager for fiskemel og 4 dobbeltbestemmelser analysert på 1 dag for fiskefeces. Beregnet repeterbarhet er vist i Tabell 5 og i Vedlegg 3, Vedleggtabell 3 til Vedleggtabell 6.

Tabell 5 Repeterbarhet for fiskemel og fiskefeces for både HPLC og UPLC. d =antall dobbeltbestemmelser. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Prøve (j.nr. Biolab)	Instrument	Snitt	d	s_r	r	RSD _r (%)
Fiskemel (kontrollprøve)	HPLC	1,01	6	0,03	0,07	2,5
	UPLC	0,75	6	0,01	0,04	1,7
Fiskefeces (2021-5346-1)	HPLC	2,17	4	0,04	0,11	1,8
	UPLC	1,48	4	0,03	0,10	2,3

Repeaterbarheten for de to prøvetypene er god med $RSD_r \leq 2,5$ %. Repeterbarheten er relativt lik for både HPLC og UPLC.

4.4.2 Intern reproduserbarhet

Intern reproduserbarhet ble beregnet for to av prøvetypene (fiskefôr og krillmel) og for alle prøvene som ble analysert på UPLC. Beregnet intern reproduserbarhet er vist i Tabell 6 og i Vedlegg 3, Vedleggtabell 7 til Vedleggtabell 9.

Tabell 6 Intern reproduserbarhet for UPLC. d =antall dobbeltbestemmelser. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Prøve (j.nr. Biolab)	Instrument	Snitt	d	s_r	r	RSD _r (%)
Fiskefôr (BG-2022-2719-1 til 6)	UPLC	0,63	6	0,01	0,02	1,2
Krillmel (BG-2022-3069-1 til 8)	UPLC	0,77	8	0,01	0,04	1,6
Alle prøver/prøvetyper	UPLC	0,81	29	0,02	0,05	2,1

Den interne reproduserbarheten for metoden er god, med RSD_r ≤ 2,1 %, uavhengig av prøvetype.

4.4.3 Instrumentets presisjon

Samme kalibreringsstandard ble injisert 10 ganger. Retensjonstid (RT) og areal for Cya samt gjennomsnitt, SD og %RSD er vist i Tabell 7.

Tabell 7 Retensjonstid (RT), areal, gjennomsnitt, SD og %RSD for Cya ved injeksjon av samme kalibreringsstandard 10 ganger.

Injeksjon nr.	RT	Areal
1	2,270	4835773
2	2,266	4829737
3	2,272	4959377
4	2,269	4863883
5	2,266	4838040
6	2,268	4850170
7	2,267	4793624
8	2,266	4861815
9	2,268	4888624
10	2,268	4827276
Snitt	2,268	4854832
SD	0,002	44727
%RSD	0,09	0,92

Som vist i tabellen er presisjonen til instrumentet meget god.

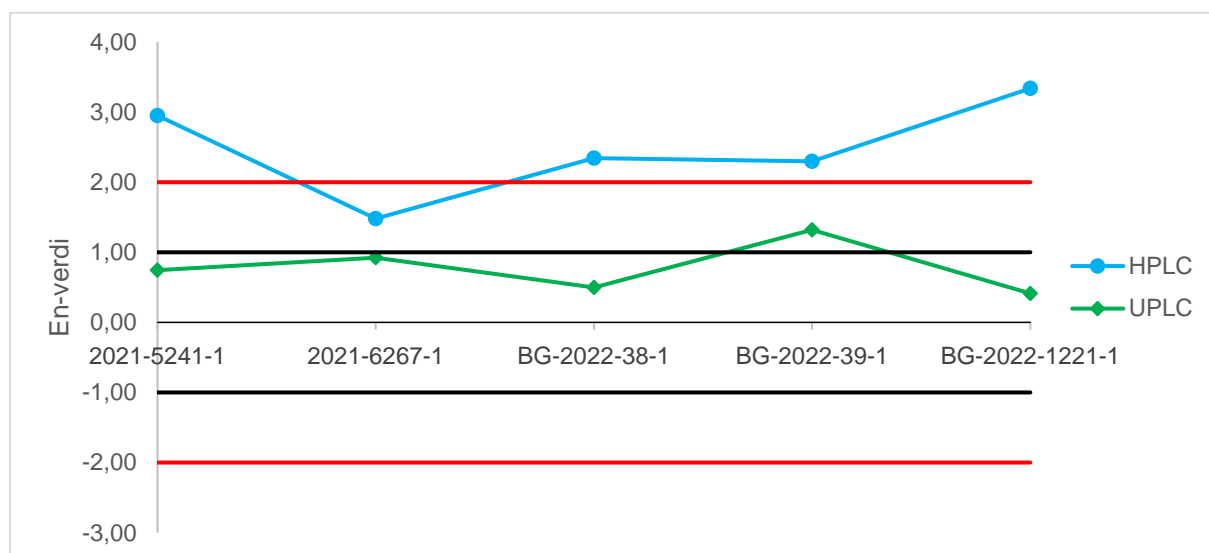
4.5 Riktighet

Rådata for beregning av riktighet er vist i Vedlegg 2, Vedleggtabell 2.

To SLP-prøver fra Masterlab og tre fra AAFCO ble analysert, og E_n -verdi ble beregnet. Resultatene er vist i Tabell 8 og i Figur 6.

Tabell 8 Oppnådde snittverdier og E_n -verdier for fem SLP-prøver. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Prøvetype (j.nr. Biolab)	Dyrefôr (2021-5241-1)		Soyamel (2021-6267-1)		Fiskemel (BG-2022-38-1)		Fiskefôr (BG-2022-39-1)		Dyrefôr (BG-2022-1221-1)	
	Snitt	E_n -verdi	Snitt	E_n -verdi	Snitt	E_n -verdi	Snitt	E_n -verdi	Snitt	E_n -verdi
HPLC	0,85	2,95	0,86	1,48	1,27	2,35	0,94	2,30	0,53	3,34
UPLC	0,50	0,74	0,77	0,92	0,84	0,50	0,74	1,32	0,26	0,41

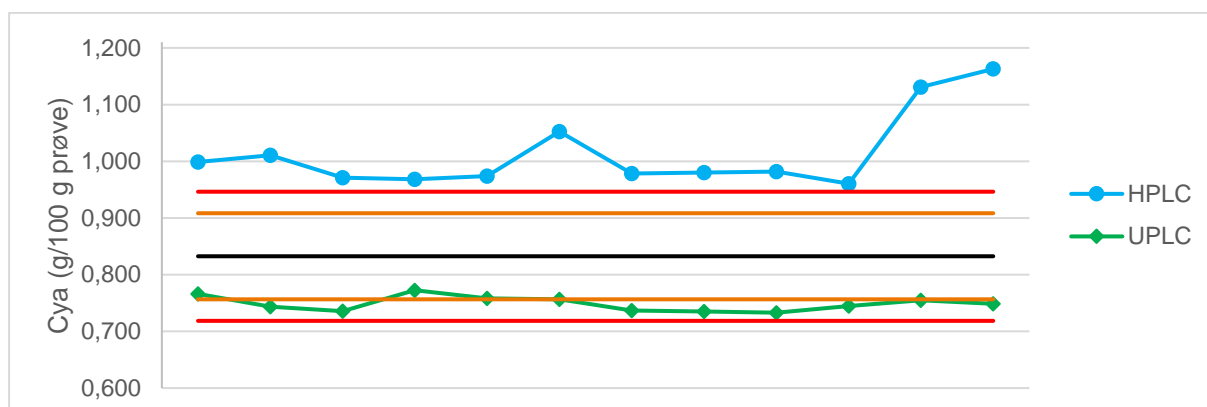


Figur 6 En grafisk framstilling av E_n -verdier for SLP-prøver analysert i denne valideringen.

Som vist er alle HPLC-resultater i det ikke-akseptable eller det betenkelige området, mens UPLC-resultatene er i det akseptable eller betenkelige området. Dette kan tyde på at riktigheten ved bruk av UPLC er god, mens resultatene for HPLC er noe overestimert. Dette kan skyldes forurensning i derivatiseringsreagensen, som er beskrevet i hovedrapportens kapittel 4.1 og 5 (Gjengedal og Vestvik 2023). I tillegg til Glycin-forurensningen er det en forbindelse som eluerer rett før Cya-toppen på HPLC. Denne forurensningen påvirker muligens arealet til Cya-toppen. Denne interferensen ser man ikke i kromatogrammet på UPLC.

4.6 Sammenligning mellom HPLC og UPLC

Alle kontrollprøvene som ble analysert i valideringen ble plottet i metodens kontrollkort. Dette er vist i Figur 7. Kontrollkortet er utarbeidet ved analyse med rotavapor og HPLC (gammel metode).



Figur 7 Kontrollprøvene analysert i denne valideringen plottet i metodens kontrollkort. Kontrollkortet er utarbeidet ved analyse med rotavapor og HPLC (gammel metode).

Som kontrollkortet viser ligger alle KP-resultater for HPLC over aksjonsgrensen, mens nesten alle KP-resultatene for UPLC ligger i nedre alarmområde.

Alle prøvene som ble analysert både på HPLC og UPLC ble analysert i par, og det ble derfor benyttet parvis t-test for å sammenligne resultatene fra HPLC og UPLC. Resultatene er vist i Vedlegg 4, Vedleggstabell 10 og statistikkparametere er vist i Tabell 9.

Tabell 9 Statistikkparametere for parvis t-test ved sammenligning mellom HPLC og UPLC.

Parameter	HPLC	UPLC
Gjennomsnitt (g/100 g prøve)	1,280568	0,900984
Varians (g/100 g prøve)	0,32297956	0,14361044
Observasjoner (n)	30	30
Frihetsgrader (fg)	29	
t-verdi	9,82107839	
p-verdi (tosidig)	$9,9249 \times 10^{-11}$	
t_{krit} (tosidig)	2,04522964	

t-verdi (absoluttverdi) er større enn t_{krit} ($t_{krit}=2,045$ ved 95 % konfidensintervall, tosidig, n-1 frihetsgrader), og viser at det er signifikant forskjell på HPLC og UPLC. Den grafiske framstillingen av SLP-resultater og av kontrollprøven viser det samme. Siden prøvene er opparbeidet på samme måte er det sannsynlig at forskjellen skyldes kromatografiske forhold. Basert på SLP-resultatene ser det ut til at UPLC-resultatene er mest riktig, og det er også på dette instrumentet framtidige analyser skal gjøres, da HPLC-instrumentet tas ut av bruk i nærmeste framtid. Videre riktighet av metoden bekreftees med SLP-deltakelse.

4.7 Måleusikkerhet

Metodens måleusikkerhet (for UPLC) ble beregnet som beskrevet i kapittel 2.4.6. Beregningen er vist i Vedlegg 5, Vedleggtabell 11. Som Nofima Biolab sitt interne standardavvik for intern reproduserbarhet ble %RSD_r for alle prøvetyper i Tabell 6 og Vedleggtabell 9 benyttet. Metodens totale og utvidede usikkerhet, U_c, ble beregnet til 16 %.

5 Konklusjon

Basert på resultatene oppnådd i denne valideringen og de statistiske beregningene som er foretatt er UPLC-instrumentet med inndamping på Multivapor godkjent for analyse av cystein/cystin bestemt som cysteinsyre. Metoden er selektiv for cysteinsyre og lineariteten til instrumentet er god. Repeterbarhet og intern reproducerbarhet for samtlige prøvetyper som er undersøkt er god, det samme er instrumentets presisjon. Analyse av fem SLP-prøver viste at riktigheten ved analyse på UPLC er akseptabel, mens på HPLC er cystein noe overestimert. Valideringen viste at det er metodiske forskjeller mellom HPLC og UPLC, som antakelig skyldes kromatografiske forhold. Til ordinære analyser vil det kun benyttes UPLC, da HPLCen snart har nådd sin levetid og ikke lenger skal brukes. Parvis t-test viste at det ikke er signifikant forskjell på 10 og 5 ml permaursyre, og det vil derfor benyttes 5 ml permaursyre for å minske bruken av skadelige kjemikalier. Metodens måleområde er undersøkt i hovedrapporten. Metodens totale og utvidede usikkerhet ble beregnet til 16 %.

6 Referanser

- Gjengedal G., Vestvik I.A. (2023). Valideringsrapport: Analyse av totale aminosyrer (BIOLAB A42) ved bruk av Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra, rapportnummer 4/2023, Nofima: 43
- NMKL (2009). NMKL-Prosedyre nr. 4 - Validering av kjemiske analysemetoder, NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler): 46.
- Waters-Corporation (1994). Waters Accq-Tag Amino Acid Analysis Method (Waters AccQ-Tag Chemistry Package Instruction Manual). USA: 102.
- Waters-Corporation (2007). UPLC Amino Acid Analysis Solution System Guide. United States of America and Ireland: 152.
- Waters-Corporation (2022). "Comprehensive Guide to Hydrolysis and Analysis of Amino Acids." Retrieved 11-17, 2022, from <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/introduction-to-hydrolysis.html>.

VEDLEGG

Vedlegg 1 – Linearitet

Vedleggstabell 1 viser konsentrasjoner, toppareal og beregnede responsfaktorer (RF) fra linearitetsforsøk for Cya.

Vedleggstabell 1 Konsentrasjoner, toppareal og beregnede responsfaktorer fra linearitetsforsøk for Cya. For areal for Norval (intern standard), se hovedrapport.

Std.	Kons. (mM)	Areal	RF
Blank	0	-	-
Std 1A	0,055	3721700	1,45
Std 1B	0,055	3705647	1,46
Std 2A	0,060	4086408	1,45
Std 2B	0,060	4094248	1,45
Std 3A	0,065	4276081	1,45
Std 3B	0,065	4341025	1,46
Std 4A	0,069	4562231	1,46
Std 4B	0,069	4702836	1,45
Std 5A	0,074	5008196	1,46
Std 5B	0,074	5033834	1,46
Std 6A	0,079	5380104	1,46
Std 6B	0,079	5306369	1,45
Std 7A	0,083	5385870	1,46
Std 7B	0,083	5705767	1,43
Snitt			1,45
%RSD			0,45

Vedlegg 2 – Robusthet

Vedleggtabell 2 viser sammenligning mellom 10 og 5 ml permaursyre.

Vedleggtabell 2 Sammenligning mellom 10 og 5 ml permaursyre. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Dato	Prøve (j.nr. Biolab)	Instrument	Mengde permaursyre	
			10 ml	5 ml
28.11.22	Fiskemel (KP)	HPLC	0,978	0,982
	Fiskemel (KP)		0,980	0,960
	Fiskefeces (2021-5346-1)		2,191	2,195
	Fiskefeces (2021-5346-1)		2,168	2,120
	Fiskefeces (2021-5346-1)		2,153	2,190
	Fiskefeces (2021-5346-1)		2,107	2,246
30.11.22	Fiskemel (KP)	UPLC	0,737	0,733
	Fiskemel (KP)		0,735	0,744
	Fiskefeces (2021-5346-1)		1,544	1,480
	Fiskefeces (2021-5346-1)		1,462	1,522
	Fiskefeces (2021-5346-1)		1,473	1,446
	Fiskefeces (2021-5346-1)		1,439	1,444
05.12.22	Fiskemel (KP)	HPLC	1,131	1,163
	Dyrefôr (2021-5241-1)		0,838	0,855
	Soyamel (2021-6267-1)		0,865	0,857
	Fiskemel (BG-2022-38-1)		1,258	1,278
	Fiskefôr (BG-2022-39-1)		0,939	0,938
	Dyrefôr (BG-2022-1221-1)		0,517	0,533
	Fiskemel (KP)	UPLC	0,755	0,749
	Dyrefôr (2021-5241-1)		0,505	0,504
	Soyamel (2021-6267-1)		0,758	0,782
	Fiskemel (BG-2022-38-1)		0,854	0,819
	Fiskefôr (BG-2022-39-1)		0,750	0,739
	Dyrefôr (BG-2022-1221-1)		0,259	0,263

Vedlegg 3 – Presisjon

Vedleggtabell 3 Beregning av repeterbarhet for fiskemel på HPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Analysedato	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
23.11.2022	0,9986	1,0109	-0,01	0,0001	1,00	1
23.11.2022	0,9713	0,9684	0,00	0,0000	0,97	2
23.11.2022	0,9742	1,0526	-0,08	0,0062	1,01	3
28.11.2022	0,9785	0,9799	0,00	0,0000	0,98	4
28.11.2022	0,9821	0,9605	0,02	0,0005	0,97	5
05.12.2022	1,1311	1,1628	-0,03	0,0010	1,15	6
d=	6	SUM D ² =	0,008	Snitt=	1,01	
Snitt		1,01		s _r		0,025
SD		0,067		%RSD _r		2,5
				r		0,072

Vedleggtabell 4 Beregning av repeterbarhet for fiskemel på UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Analysedato	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
23.11.2022	0,7661	0,7438	0,02	0,0005	0,75	1
23.11.2022	0,7358	0,7726	-0,04	0,0013	0,75	2
23.11.2022	0,7582	0,7567	0,00	0,0000	0,76	3
30.11.2022	0,7366	0,7351	0,00	0,0000	0,74	4
30.11.2022	0,7330	0,7445	-0,01	0,0001	0,74	5
05.12.2022	0,7546	0,7488	0,01	0,0000	0,75	6
d=	6	SUM D ² =	0,002	Snitt=	0,75	
Snitt		0,75		s _r		0,013
SD		0,009		%RSD _r		1,7
				r		0,037

Vedleggstabell 5 Beregning av repeterbarhet for fiskefeces på HPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Analysedato	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
28.11.2022	2,1910	2,1679	0,02	0,0005	2,18	1
28.11.2022	2,1528	2,1067	0,05	0,0021	2,13	2
28.11.2022	2,1953	2,1197	0,08	0,0057	2,16	3
28.11.2022	2,1895	2,2464	-0,06	0,0032	2,22	4
d=	4	SUM D ² =	0,012	Snitt=	2,17	
Snitt		2,17		s _r		0,038
SD		0,037		%RSD _r		1,8
				r		0,108

Vedleggstabell 6 Beregning av repeterbarhet for fiskefeces på UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Analysedato	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
30.11.2022	1,5437	1,4623	0,08	0,0066	1,50	1
30.11.2022	1,4731	1,4393	0,03	0,0011	1,46	2
30.11.2022	1,4803	1,5221	-0,04	0,0017	1,50	3
30.11.2022	1,4458	1,4443	0,00	0,0000	1,45	4
d=	4	SUM D ² =	0,010	Snitt=	1,48	
Snitt		1,48		s _r		0,034
SD		0,030		%RSD _r		2,3
				r		0,098

Vedleggtabell 7 Beregning av intern reproduserbarhet for fiskefôr analysert 09.01.23 på UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Journalnr.	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
BG-2022-2719-1	0,6314	0,6264	0,01	0,0000	0,63	1
BG-2022-2719-2	0,6199	0,6314	-0,01	0,0001	0,63	2
BG-2022-2719-3	0,6235	0,6300	-0,01	0,0000	0,63	3
BG-2022-2719-4	0,6185	0,6365	-0,02	0,0003	0,63	4
BG-2022-2719-5	0,6235	0,6336	-0,01	0,0001	0,63	5
BG-2022-2719-6	0,6350	0,6329	0,00	0,0000	0,63	6
d=	6	SUM D ² =	0,001	Snitt=	0,63	
Snitt		0,63		s _r		0,007
SD		0,003		%RSD _r		1,2
				r		0,020

Vedleggtabell 8 Beregning av intern reproduserbarhet for krillmel analysert 16.01.23 på UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Journalnr.	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
BG-2022-3069-1	0,7481	0,7387	0,01	0,0001	0,74	1
BG-2022-3069-2	0,7186	0,7157	0,00	0,0000	0,72	2
BG-2022-3069-3	0,6984	0,7387	-0,04	0,0016	0,72	3
BG-2022-3069-4	0,7798	0,7927	-0,01	0,0002	0,79	4
BG-2022-3069-5	0,7920	0,7848	0,01	0,0001	0,79	5
BG-2022-3069-6	0,8287	0,8302	0,00	0,0000	0,83	6
BG-2022-3069-7	0,8273	0,8424	-0,02	0,0002	0,83	7
BG-2022-3069-8	0,7358	0,7171	0,02	0,0004	0,73	8
d=	8	SUM D ² =	0,003	Snitt=	0,77	
Snitt		0,77		s _r		0,013
SD		0,048		%RSD _r		1,6
				r		0,036

Vedleggstabell 9 Beregning av intern reproduserbarhet for alle prøver analysert på UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Prøvetype (j.nr. Biolab)	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
Fiskemel (KP)	0,7661	0,7438	0,02	0,0005	0,75	1
Fiskemel (KP)	0,7358	0,7726	-0,04	0,0013	0,75	2
Fiskemel (KP)	0,7582	0,7567	0,00	0,0000	0,76	3
Fiskemel (KP)	0,7366	0,7351	0,00	0,0000	0,74	4
Fiskemel (KP)	0,7330	0,7445	-0,01	0,0001	0,74	5
Fiskemel (KP)	0,7546	0,7488	0,01	0,0000	0,75	6
Fiskefeces (2021-5346-1)	1,5437	1,4623	0,08	0,0066	1,50	7
Fiskefeces (2021-5346-1)	1,4731	1,4393	0,03	0,0011	1,46	8
Fiskefeces (2021-5346-1)	1,4803	1,5221	-0,04	0,0017	1,50	9
Fiskefeces (2021-5346-1)	1,4458	1,4443	0,00	0,0000	1,45	10
Dyrefôr (2021-5241-1)	0,5047	0,5040	0,00	0,0000	0,50	11
Soyamel (2021-6267-1)	0,7582	0,7819	-0,02	0,0006	0,77	12
Fiskemel (BG-2022-38-1)	0,8539	0,8194	0,03	0,0012	0,84	13
Fiskefôr (BG-2022-39-1)	0,7502	0,7387	0,01	0,0001	0,74	14
Dyrefôr (BG-2022-1221-1)	0,2592	0,2628	0,00	0,0000	0,26	15
Fiskefôr (BG-2022-2719-1)	0,6314	0,6264	0,01	0,0000	0,63	16
Fiskefôr (BG-2022-2719-2)	0,6199	0,6314	-0,01	0,0001	0,63	17
Fiskefôr (BG-2022-2719-3)	0,6235	0,6300	-0,01	0,0000	0,63	18
Fiskefôr (BG-2022-2719-4)	0,6185	0,6365	-0,02	0,0003	0,63	19
Fiskefôr (BG-2022-2719-5)	0,6235	0,6336	-0,01	0,0001	0,63	20
Fiskefôr (BG-2022-2719-6)	0,6350	0,6329	0,00	0,0000	0,63	21
Krillmel (BG-2022-3069-1)	0,7481	0,7387	0,01	0,0001	0,74	22
Krillmel (BG-2022-3069-2)	0,7186	0,7157	0,00	0,0000	0,72	23
Krillmel (BG-2022-3069-3)	0,6984	0,7387	-0,04	0,0016	0,72	24
Krillmel (BG-2022-3069-4)	0,7798	0,7927	-0,01	0,0002	0,79	25
Krillmel (BG-2022-3069-5)	0,7920	0,7848	0,01	0,0001	0,79	26
Krillmel (BG-2022-3069-6)	0,829	0,830	0,00	0,0000	0,83	27
Krillmel (BG-2022-3069-7)	0,82728	0,8424	-0,02	0,0002	0,83	28
Krillmel (BG-2022-3069-8)	0,73584	0,717	0,02	0,0004	0,73	29
d=	29	SUM D ² =	0,017	Snitt=	0,81	
Snitt		0,81		s _r		0,017
SD		0,295		%RSD _r		2,1
				r		0,048

Vedlegg 4 – Sammenligning mellom HPLC og UPLC

Vedleggtabell 10 viser sammenligning mellom HPLC og UPLC.

Vedleggtabell 10 Sammenligning mellom HPLC og UPLC. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Dato	Prøve (j.nr. Biolab)	Instrument	
		HPLC	UPLC
23.11.22	Fiskemel (KP)	0,999	0,766
		1,011	0,744
		0,971	0,736
		0,968	0,773
		0,974	0,758
		1,053	0,757
		0,978	0,737
28.11.22 (HPLC) og 30.11.22 (UPLC)	Fiskemel (KP)	0,980	0,735
	Fiskefeces (2021-5346-1)	2,191	1,544
		2,168	1,462
		2,153	1,473
	Fiskemel (KP)	2,107	1,439
		0,982	0,733
		0,960	0,744
	Fiskefeces (2021-5346-1)	2,195	1,480
		2,120	1,522
		2,190	1,446
2,246		1,444	
05.12.22	Fiskemel (KP)	1,131	0,755
	Dyrefôr (2021-5241-1)	1,163	0,749
		0,838	0,505
	Soyamel (2021-6267-1)	0,855	0,504
		0,865	0,758
	Fiskemel (BG-2022-38-1)	0,857	0,782
		1,258	0,854
	Fiskefôr (BG-2022-39-1)	1,278	0,819
		0,939	0,750
	Dyrefôr (BG-2022-1221-1)	0,938	0,739
		0,517	0,259
		0,533	0,263

Vedlegg 5 – Måleusikkerhet

Vedleggstabell 11 viser beregning av metodens totale og utvidede måleusikkerhet, U_c .

Vedleggstabell 11 Beregning av metodens totale og utvidede måleusikkerhet. Resultater er oppgitt i g/100 g prøve.

Program	Journalnr.	Nofima	"Snitt, SLP"	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall, d
AAFCO	2021-5241-1	0,50	0,44	0,06	0,0036	0,47	1
AAFCO	2021-6267-1	0,77	0,65	0,12	0,0144	0,71	2
Masterlab	BG-2022-38-1	0,84	0,76	0,08	0,0064	0,80	3
Masterlab	BG-2022-39-1	0,74	0,57	0,17	0,0289	0,66	4
AAFCO	BG-2022-1221-1	0,26	0,24	0,02	0,0004	0,25	5
d=		5	SUM D ² =	0,024	Snitt=	0,66	
Snitt			0,66	Repeterbarhet:			
Nofima-"Snitt, SLP"		%RSD s_r	7,48	s_r		0,049	
Nofima		%RSD _r	2,09				
$u_{LAB-\bar{x}}$			0,05				
u_{LAB}			0,01				
u_c			0,05				
$U_c (\pm 2s)$			0,10				
$U_c (\pm 2s) (\%)$			16				