

# Valideringsrapport

Bestemming av mengde løyseleg fosfor i fôr og fôringrediensar ved bruk av basisk ekstraksjon, mikrobølgeomnsoppslutning og ICP-OES



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



#### Sunnalsøra

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> 20/2023	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-754-9	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 11. juli 2023	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 13 + 12	<i>Prosjektnummer:</i> 11277
<i>Tittel:</i> <b>Valideringsrapport: Bestemming av mengde løseleg fosfor i fôr og fôringrediensar ved bruk av basisk ekstraksjon, mikrobølgeomnsopplutting og ICP-OES</b>		
<i>Title:</i> Validation report: Determination of soluble phosphorus in feeds and feed ingredients by alkaline extraction, microwave digestion and ICP-OES		
<i>Forfatter(e):</i> Ingri Ullestad Moen		
<i>Avdeling:</i> Biolab		
<i>Oppdragsgiver:</i> Intern		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> -		
<i>Stikkord:</i> Løseleg fosfor, elementanalyse, ICP-OES, validering		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Formålet med dette arbeidet var å utvikle og validere ein ny metode for analyse av løseleg fosfor i fiskefôr og fôringrediensar. Den nye metoden er basert på den tidlegare metoden, A 102 Løselig fosfor, og A 120 Elementanalyser ved ICP-OES og mikrobølgeovnopplutting, og består av tre trinn; ekstraksjon, opplutting og analyse. Først vert løseleg fosfor ekstrahert frå prøven ved hjelp av base, deretter vert ein fraksjon av væskefasen oppslutta under høgt trykk og temperatur i mikrobølgeomn (UltraWave). Fosforkonsentrasjonen i prøven vert til slutt bestemt ved bruk av induktivt kopla plasma optisk emisjonsspektroskopi (ICP-OES).  Validering av presisjon, samanlikning av ny og tidlegare metode og undersøking av robustheit med tanke på ekstraksjonstid, prøvemengde og sentrifugevilkår har vorte utført. Etter gjennomgang av resultat, vert metoden ansett å vere godkjent.		
<i>English summary/recommendation:</i> The purpose of this project was to develop and validate a new method for analysis of soluble phosphorus in fish feed and feed ingredients. This new method, based on the previous method, A 102 Soluble phosphorus, and A 120 Element analysis by use of ICP-OES and microwave digestion, consist of three steps: extraction, digestion and analysis. Firstly, soluble phosphorus is extracted from the sample by use of a base, secondly an aliquot of the liquid phase is digested under high temperature and pressure, using a microwave oven (UltraWave). The concentration of phosphorus in the sample is then determined by use of inductive coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES).  Precision was validated, new and previous methods were compared and robustness regarding time of extraction, amount of sample and centrifugation conditions was investigated. Based on a review of the results, this new method is approved.		

## Innhold

<b>1</b>	<b>Innleiing</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teori</b>	<b>2</b>
2.1	Prinsipp	2
2.2	Grad av validering og tidlegare ekstern validering	2
2.3	Avvik frå metodereferanse	2
2.4	Valideringsparameter	2
2.4.1	Selektivitet	2
2.4.2	Linearitet	2
2.4.3	Presisjon	2
2.4.4	Riktighet/nøyaktigheit	3
2.4.5	Konsentrasjons- / måleområde	3
2.4.6	Robustheit	3
2.4.7	Måleusikkerheit	3
<b>3</b>	<b>Eksperimentelt</b>	<b>4</b>
3.1	Selektivitet	4
3.2	Linearitet	4
3.3	Presisjon	4
3.4	Riktighet / nøyaktigheit	4
3.4.1	Samanlikning med metode A 102 Løselig fosfor	4
3.5	Konsentrasjons- / måleområde	4
3.6	Robustheit	4
<b>4</b>	<b>Resultat</b>	<b>6</b>
4.1	Selektivitet	6
4.2	Linearitet	6
4.3	Presisjon	6
4.3.1	Repeterbarheit	6
4.3.2	Intern reproduserbarheit	6
4.4	Riktighet / nøyaktigheit	6
4.4.1	Samanlikning med metode A102 Løyseleg fosfor	6
4.5	Konsentrasjons- / måleområde	7
4.6	Robustheit	7
4.7	Måleusikkerheit	8
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>9</b>
5.1	Selektivitet	9
5.2	Linearitet	9
5.3	Presisjon	9
5.3.1	Repeterbarheit	9
5.3.2	Intern reproduserbarheit	9
5.4	Riktighet / nøyaktigheit	10
5.4.1	Samanlikning med metode A 102 Løyseleg fosfor	10

5.5	Konsentrasjons- / måleområde	10
5.6	Robustheit	10
<b>6</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>12</b>
<b>7</b>	<b>Referansar</b>	<b>13</b>
<b>VEDLEGG</b>		<b>I</b>
Vedlegg 1 – Riktighet: samanlikning med A 102		II
Vedlegg 2 – Presisjon		III
Vedlegg 3 – Robustheit		X

## 1 Innleiing

Vinteren/våren 2022 vart metoden A 120 Elementanalyser validert hjå Nofima Biolab. Analyse av fleire ulike mineral inngår i metoden, deriblant fosfor. Den tidlegare metoden for fosforanalyse (A 37) vart dermed erstatta av ein langt raskare og enklare metode. Prøvane vert analysert med ein ICP-OES frå Agilent av typen 5110 VDV. Til dekomponering av prøvar før analyse nyttast ein UltraWave frå Milestone. Då den eksisterande metoden for løyseleg fosfor (A 102) også er ein svært tid- og arbeidskrevjande metode, var det ønskeleg å utvikle denne metoden til også å kunne analyserast ved bruk av ICP-OES.

Hausten/vinteren 2022 vart ein ny metode for analyse av løyseleg fosfor validert hjå Nofima Biolab. Metoden baserer seg på den eksisterande metoden for løyseleg fosfor (A 102) og A 120 Elementanalyser. Analysetida for den nye metoden vart redusert frå fem dagar til éin dag, og kapasiteten per serie vart auka. Valideringa av denne nye metoden inkluderer presisjon, robustheit og samanlikning med eksisterande metode. Riktigheit og måleusikkerheit vart ikkje undersøkt, då ringtestar eller anna sertifisert referansematerial ikkje var tilgjengeleg for denne metoden. Selektivitet, linearitet og måleområde vart undersøkt ved validering av A 120, og vil vere det same for denne nye metoden.

## 2 Teori

### 2.1 Prinsipp

Fosfor er eit viktig mineral for fisk, men beinbunden fosfor i fôret er ikkje biologisk tilgjengeleg for fisken. Det er difor av interesse å kunne bestemme mengde biotilgjengeleg fosfor, i denne metoden kalla løyseleg fosfor. Fosfor i fytatform er løyseleg, men ikkje biotilgjengeleg for fisk då dei manglar fordøyingsenzymet fytase.

Prøveprepareringa for analysen av løyseleg fosfor består av to trinn. Først vert løyseleg fosfor ekstrahert frå prøvematerialet ved hjelp av lut, denne prosessen skal etterlikne fordøyelsesystemet til fisk. Etter ekstraksjonen vert ein del av væskefasen tatt ut, tilsett salpetersyre og oppslutta ved bruk av UltraWave mikrobølgeovn. Den oppslutta prøven vert deretter analysert ved ICP-OES (induktivt kopla plasma optisk emisjonsspektroskopi). Oppslutting og analyse følgjer same framgangsmåte som skildra i A 120 Elementanalyser.

### 2.2 Grad av validering og tidlegare ekstern validering

Den eksisterande metoden for analyse av løyseleg fosfor, A 102, vart validert internt i 2013, og A 120 Elementanalyser vart validert og akkreditert i 2022. Denne nye metoden for analyse av løyseleg fosfor er basert på desse to metodane. Valideringa av den nye metoden inkluderer presisjon og robustheit. Utover samanlikning med eksisterande metode, har det ikkje vorte gjort undersøking av riktigheit. Dette på grunn av mangel på ringtestar eller andre referanseprøvar for analyseparameteren. Øvrige valideringsparameter er dei same som for validering av A 120, som igjen er basert på NS-EN 15621:2017 (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022).

### 2.3 Avvik frå metodereferanse

Ekstraksjonstrinnet er ikkje inkludert i metodereferansen brukt for validering av total fosfor. Referansen NS-EN 15621:2017 skildrar også mikrobølgeovnsopplutting med «bomber», mens Biolab nyttar «single chamber» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022).

### 2.4 Valideringsparameter

#### 2.4.1 Selektivitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

#### 2.4.2 Linearitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

#### 2.4.3 Presisjon

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

#### **2.4.4 Riktighet/nøyaktighet**

Då verken sertifiserte referansematerial (CRM) eller ringtestar var tilgjengelege for løyseleg fosfor, vart riktighet/nøyaktighet kun vurdert utifrå samanlikning av eksisterande og ny metode. I eksisterande metode vart riktighet undersøkt ved spikingforsøk med fire ulike fosfatsalt og soyalecitin. Metodane vart samanlikna ved bruk av parvis t-test i excel.

For øvrig teori, sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggssrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U. 2022).

#### **2.4.5 Konsentrasjons- / måleområde**

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggssrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U. 2022).

#### **2.4.6 Robustheit**

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022).

#### **2.4.7 Måleusikkerheit**

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggssrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutting» (Moen, I. U. 2022).



## 3 Eksperimentelt

### 3.1 Selektivitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

### 3.2 Linearitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

### 3.3 Presisjon

For berekning av repeterbarheit og intern reproducerbarheit, vart aktuelle prøvetypar analyserte over fleire analysedagar og av fleire analytikarar. Prøvane vart vege inn i sentrifugerøyr (0,2 g), tilsett lut (20 ml, 1 M NaOH) og rista på ristebord i minimum éin time. Deretter vart suspensjonane sentrifugerte i fem minutt, ved 3000 omdreiingar per minutt, før 1 ml av væskefasen vart overført til oppsluttingsrøyr. Salpetersyre (2 ml, 69 % kons.) vart tilsett, og prøvane vart oppslutta og analyserte som skildra i metode A 120 Elementanalyser ved ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting.

### 3.4 Riktigheit / nøyaktigheit

#### 3.4.1 Samanlikning med metode A 102 Løselig fosfor

Prøvar analyserte med eksisterande metode for løyseleg fosfor (A 102) vart også analyserte med ny metode, med framgangsmåte som skildra i 3.3 Presisjon.

### 3.5 Konsentrasjons- / måleområde

Bestemming av konsentrasjons-/måleområde for analyse av fosfor ved bruk av ICP-OES er skildra i Valideringsrapport - tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U. 2022). Dette vil vere likt for bestemming av løyseleg fosfor, då oppslutting og analyse er tilsvarende som for total fosfor (A 120 Elementanalyser) og prøvematriksane er dei same. Berekning av nedre kvantifiseringsgrense (LOQ) for løyseleg fosfor i prøvematerialet blir dermed noko ulik, sidan kun 1 ml av totalt 20 ml lutfase blir tatt vidare til oppslutting og analyse. Prøven får dermed ein fortynningsfaktor på 20.

### 3.6 Robustheit

Ulike mengder innvege prøve, ekstraksjonstid og sentrifugeringsvilkår vart undersøkte. Tabell 1 viser dei ulike parametra og vilkåra som vart testa. Det vart nytta same konsentrasjon av lut (1 M) som i A 102, og forholdet lutvolum/prøvemengde vart halde konstant, og likt som i A 102. Det vart altså brukt 20 ml lut til 0,2 g prøve og 80 ml til 0,8 g prøve.

Prøvemengde på 0,2 g vart samanlikna med 0,8 g (brukt i A 102). Ti replikat av kvar innveging vart analyserte. Prøvane rista på ristebord over natt og vart sentrifugerte i 20 minutt ved 2000 omdreiingar per minutt før uttak av væskefasen. Det vart vidare gjort forsøk med sentrifugetider på fem og ti minutt ved 3000 omdreiingar, som vart samanlikna med 20 minutt ved 2000 omdreiingar. Ti replikat vart brukt i forsøket, med 0,2 g prøve og ekstraksjon over natt. Prøvane vart sentrifugerte og 1 ml væskefase vart

pipettert ut, deretter vart prøvane rista opp att og sentrifugerte igjen med nye sentrifugeinstillingar. Ekstraksjonstid i lut vart også undersøkt. Til dette forsøket vart det nytta fem ulike prøvar; tre fiskefôr og to vegetabilske prøvar. Det vart analysert to replikat av kvar prøve etter éin, to, fem og 17 timar ekstraksjon.

Til samanlikning av prøvemengde og sentrifugevilkår, vart det nytta eit fiskefôr (2022-408-1), mens for ekstraksjonstider vart det brukt tre ulike fiskefôr (2022-1130-1, 2022-1239-2, 2022-1239-3) og to vegetabilske prøvar (2022-2314-1 og 2022-2314-2). Prøve vart vege inn i sentrifugerøyr (0,2 g) eller glasflaske (0,8 g), lut vart tilsett ved hjelp av byrette, og prøvane vart rista på ristebord i eit gitt antal timar. Vidare opparbeiding og analyse vart utført som beskrive i 3.3 Presisjon.

*Tabell 1: Parameter og vilkår testa under robustheitsforsøk for analyse av løyseleg fosfor.*

Parameter	Mengder / tider undersøkte
Prøvemengde (g)	0,2 og 0,8
Ekstraksjonstid (t)	1, 2, 5 og 17
Sentrifugevilkår (min/rpm)	20 / 2000, 5 / 3000 og 10 / 3000

## 4 Resultat

### 4.1 Selektivitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

### 4.2 Linearitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsopplutting» (Moen, I. U. 2022).

### 4.3 Presisjon

#### 4.3.1 Repeterbarheit

Oppnådde repeterbarheitsgrenser for fiskefôr og fôringrediensar er gitt i Tabell 2.

Tabell 2: Oppnådde repeterbarheitsgrenser for løyseleg fosfor i fiskefôr og fôringrediensar. Tal er baserte på 12 (fiskefôr) og åtte (fôringrediensar) dobbelbestemmingar.

Prøve	Prøvetype	Bølgelengde (nm)	Snitt (ppm)	Sr (ppm)	r (ppm)	RSDr
22-408-1	Fiskefôr	P 213,618	7103	180	505	2,5 %
		P 214,914	6942	122	340	1,8 %
22-2214-1 og 22-2214-2	Fôringrediensar	P 213,618	5687	162	453	2,8 %
		P 214,914	6260	175	489	2,8 %

#### 4.3.2 Intern reproducerbarheit

Oppnådde grenser for intern reproducerbarheit er gitt i Tabell 3.

Tabell 3: Oppnådde grenser for intern reproducerbarheit for fiskefôr og fôringrediensar. Tal er baserte på 18 (fiskefôr) og 23 (fôringrediensar) dobbelbestemmingar.

Prøvetype	Bølgelengde (nm)	Snitt (ppm)	SRi (ppm)	Ri (ppm)	RSDRi
Fiskefôr	P 213,618	6504	251	703	3,9 %
	P 214,914	6455	251	703	4,4 %
Fôringrediensar	P 213,618	5244	279	782	5,3 %
	P 214,914	5379	306	857	5,7 %

## 4.4 Riktighet / nøyaktigheit

### 4.4.1 Samanlikning med metode A102 Løyseleg fosfor

Tabell 4 viser oppnådde resultat for analyse av ulike prøvar med ny (A 129) og eksisterande metode (A102) for løyseleg fosfor. Alle parallelar er gitt i Vedlegg 1 – Riktighet: samanlikning med A 102.

Tabell 4: Resultat av ulike prøver analyserte med både eksisterende (A 102) og ny metode (A 129) for løyseleg fosfor. Alle tal er baserte på to replikat.

Prøvenr.	Prøvetype	Resultat A 102 (mg/kg)	Resultat A 129 (mg/kg)
22-1130-1	Fiskefôr	7990	7691
22-1239-2	Fiskefôr	11945	11003
22-1239-3	Fiskefôr	5995	5519
22-2314-1	SPC	6735	6875
22-2314-2	Hestebønner	4415	4461

#### 4.5 Konsentrasjons- / måleområde

Nedre kvantifiseringsgrense for ferdig oppslutta prøve av løyseleg fosfor er den same som grensa for total fosfor i oppslutta prøve, då analysemetoden for dei to metodane er lik. LOQ i den injiserte prøveløysinga er gitt i Tabell 5. Tabellen viser også kva dette tilsvarar som nedre kvantifiseringsgrense i prøvematerialet, gitt 0,2 g prøveinnveging, fortynning til 20 ml og fortynningsfaktor 20 (standard metodebetingelsar).

Tabell 5: Kvantifiseringsgrenser for løyseleg fosfor i injeksjonsløysing og i prøvematerial for undersøkte bølgelengder.

Bølgelengde (nm)	Kvantifiseringsgrense i injeksjonsløysing (mg/l)	Kvantifiseringsgrense i prøvematerial (mg/kg) *
213,618	0,045	90
214,914	0,209	418

\*Gjeld for 0,2 g prøveinnveging, tynning til 20 ml og fortynningsfaktor 20.

#### 4.6 Robustheit

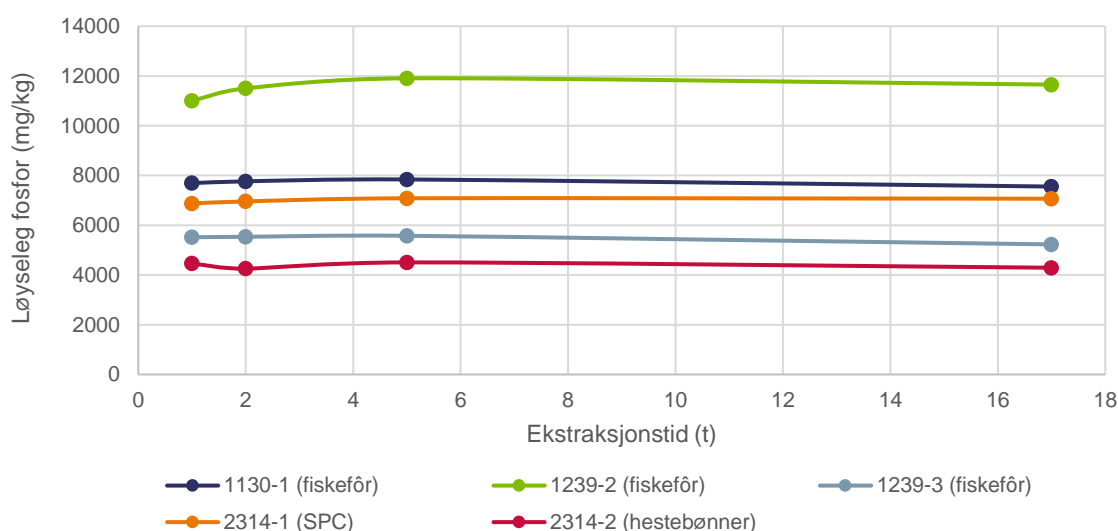
Tabell 6 viser oppnådde resultat for robustheitsforsøk med ulike prøvemengder og sentrifugevilkår. Forsøk med ulike ekstraksjonstider er gitt i Tabell 7, samt illustrert grafisk i Figur 1. Alle analyseresultat er gitt i Vedlegg 3 – Robustheit.

Tabell 6: Resultat av robustheitsforsøk med varierende prøvemengde og sentrifugeinstillingar. Alle snittverdiar er baserte på 10 replikat.

Prøve	Prøvemengde (g)	Ekstraksjonstid (t)	Sentrifugeinst. (min/rpm)	Snitt (mg/kg)	Std.avvik (mg/kg)	RSD (%)
2022-408-1	0,8	17	20/2000	6937	107	1,5 %
	0,2	17	20/2000	7078	214	3,0 %
	0,2	17	5/3000	7127	179	2,5 %
	0,2	17	10/3000	7030	204	2,9 %

Tabell 7: Resultat av robustheitsforsøk med variasjon i ekstraksjonstid. Snittverdiane er baserte på to replikat per prøve.

Ekstraksjonstid (t)	1130-1 (fiskefôr)		1239-2 (fiskefôr)		1239-3 (fiskefôr)		2314-1 (SPC)		2314-2 (hestebønner)	
	Snitt (mg/kg)	RSD (%)	Snitt (mg/kg)	RSD (%)	Snitt (mg/kg)	RSD (%)	Snitt (mg/kg)	RSD (%)	Snitt (mg/kg)	RSD (%)
1	7691	3 %	11003	4 %	5519	5 %	6875	2 %	4461	1 %
2	7764	2 %	11500	3 %	5534	3 %	6957	3 %	4255	4 %
5	7841	0 %	11905	3 %	5576	0 %	7084	1 %	4506	0 %
17	7555	2 %	11653	2 %	5229	3 %	7066	4 %	4291	4 %



Figur 1: Samanlikning av resultat for løyseleg fosfor i ulike prøvar, som funksjon av ekstraksjonstid.

## 4.7 Måleusikkerheit

Då verken sertifiserte referansmaterial eller ringtestprøvar var tilgjengelege for analyse av løyseleg fosfor, har det ikkje blitt berekna måleusikkerheit for denne metoden. Sidan metoden i stor grad er basert på A 120 Elementanalyser der analyse av total fosfor inngår, vert måleusikkerheit for denne brukt som eit estimat for måleusikkerheit også i denne nye metoden. Måleusikkerheit for løyseleg fosfor vert dermed estimert å vere 14 % (sjå Moen, I. U. 2022).

## 5 Diskusjon

### 5.1 Selektivitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutning» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutning» (Moen, I. U. 2022).

### 5.2 Linearitet

Sjå valideringsrapport 32/2022 «Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutning» (Moen, I. U., Gjengedal, G. 2022) og tilleggsrapport 33/2022 «Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeomnsoppslutning» (Moen, I. U. 2022).

### 5.3 Presisjon

#### 5.3.1 Repeterbarheit

Som Tabell 2 viser, er oppnådde repeterbarheitsgrenser låge for både fiskefôr og fôringrediensar. Dei to bølgelengdene som vart undersøkte, gav tilsvarende gode resultat. Tabell 8 samanliknar oppnådde grenser med repeterbarheitsgrenser oppnådd for eksisterande metode for løyseleg fosfor og for analyse av total fosfor i metode A 120. Oppnådd repeterbarheit for ny metode er langt betre enn repeterbarheit for eksisterande metode (Hovde, G. 2013), men også noko betre enn repeterbarheit for analyse av total fosfor (Moen, I. 2022).

Tabell 8: Samanlikning av repeterbarheit for ny metode for løyseleg fosfor og metode for total fosfor (A 120).

Metode	Prøvetype	Bølgelengde (nm)	RSDr
Ny metode (A129)	Fiskefôr	213,618	2,5 %
		214,914	1,8 %
	Fôringrediensar	213,618	2,8 %
		214,914	2,8 %
Total fosfor (A 120)	Fiskefôr	213,618	4,3 %
		214,914	4,4 %
	Fiskemjøl	213,618	4,6 %
		214,914	4,6 %

#### 5.3.2 Intern reproduserbarheit

Tabell 9samanliknar oppnådd intern reproduserbarheit for fiskefôr og fôringrediensar med eksisterande metode for analyse av løyseleg fosfor og metode A 120 for analyse av total fosfor. Intern reproduserbarheit for denne nye metoden ligg mellom nivåa for dei to andre metodane. Verdiane er noko høgare enn oppnådd repeterbarheit, noko som er forventa.

Tabell 9: Samanlikning av intern reproduserbarheit for ny og eksisterande metode for løyseleg fosfor, samt for total fosfor (A 120).

Metode	Prøvetype	Bølgelengde (nm)	RSDRi
Ny metode (A129)	Fiskefôr	213,618	3,9 %
		214,914	4,4 %
	Fôringrediensar	213,618	5,3 %
		214,914	5,7 %
Eksisterande metode (A 102)	Fiskefôr ++	-	6,8 %*
Total fosfor (A 120)	Fiskefôr	213,618	1,6 %
		214,914	1,5 %
	Fiskemjøl	213,618	3,7 %
		214,914	3,8 %

## 5.4 Riktigheit / nøyaktigheit

### 5.4.1 Samanlikning med metode A 102 Løyseleg fosfor

Som Tabell 4 viser, samsvarar dei to metodane godt. Det vart gjort t-test for parvise utval for statistisk samanlikning, og denne viste ikkje-signifikant skilnad mellom metode A 102 og ny metode med 0,2 g innveging og éin time ekstraksjon på ristebord. Fem ulike prøvar, med to replikat kvar, vart nytta i berekninga. Alle tal og t-test er gitt i Vedlegg 1 – Riktigheit: samanlikning med A 102.

## 5.5 Konsentrasjons- / måleområde

Av dei undersøkte bølgelengdene for fosforanalyse, er 213,618 nm langt meir sensitiv enn 214,914 nm. Dette resulterer i lågare kvantifiseringsgrense for 213,618 nm (sjå Tabell 5). Sidan andre undersøkte valideringsparameter har gitt tilsvarande gode resultat for begge bølgelengdene, vil 213,618 nm vere å føretrekke på grunn av betre sensitivitet og lågare kvantifiseringsgrense.

Nedre kvantifiseringsgrense for ny metode blir dermed 90 mg/kg i prøvematerialet. For A 102 Løyseleg fosfor er kvantifiseringsgrensa 0,01 % (100 mg/kg). Dermed vil den nye metoden ha marginalt betre sensitivitet.

## 5.6 Robustheit

Det vart gjort forsøk med ulike prøveinnvegingar, endra sentrifugevilkår og redusert ekstraksjonstid på ristebord. Resultata er gitt i Tabell 6 og Tabell 7, og alle analysedata og parallellar, samt F-testar og t-testar er gitt i Vedlegg 3 – Robustheit.

F-test og tilhøyrande t-test viste ikkje-signifikant skilnad på 0,2 g og 0,8 g innvege prøvemengde. Det vart dermed beslutta å gå vidare med 0,2 g innveging då dette er mest hensiktsmessig sidan tilgjengeleg prøvemengde kan vere begrensa, forbruket av lut vert lågare og det er mest gunstig då ein kan utføre ekstraksjonen direkte i sentrifugerør.

Vidare vart sentrifugevilkåra undersøkte. A 102 beskriv at hastepøver kan sentrifugerast i 20 minutt ved 2000 rpm, i staden for sedimentering over natt som er standardmetoden. T-test viste ikkje-signifikant skilnad på 20 minutt ved 2000 omdreiingar og fem minutt ved 3000 omdreiingar. Det vart difor beslutta å gå vidare med sentrifugering i fem minutt ved 3000 omdreiingar.

T-test av resultata frå forsøk med ulike ekstraksjonstider, viste ikkje-signifikant skilnad på éin og 17 timars ekstraksjonstid. Dermed kunne ekstraksjonstida reduserast frå over natt til éin time.



## 6 Konklusjon

Oppnådde repeterbarheitsgrenser for ny metode var lågare enn grenser oppnådd for analyse av total fosfor for både fiskefôr og fôringrediensar. For intern reproduserbarheit låg oppnådde grenser mellom grensene for total fosfor og eksisterande metode for løyseleg fosfor. Presisjonen vert totalt sett vurdert som god.

Samanlikning av ny og eksisterande metode for analyse av løyseleg fosfor viste at det ikkje var signifikant skilnad mellom dei to metodane.

Nedre kvantifiseringsgrense (LOQ) vart berekna til 90 mg/l, ved bruk av bølgelengde P 213,618 nm.

Robustheitsforsøk viste at prøvemengda kan reduserast frå 0,8 g (A 102) til 0,2 g, ekstraksjonstida kan reduserast frå over natt (A 102) til éin time, og sentrifugering i fem minutt ved 3000 omdreiningar kan nyttast for separasjon av væskefasen, i staden for sedimentering over natt.

Grunna mangel på sertifisert referansematerial og ringtestar, vart ikkje måleusikkerheit berekna i denne valideringa. Måleusikkerheit for analyse av total fosfor (A 120) vert brukt som eit estimat på måleusikkerheita for løyseleg fosfor. Denne er på 14 %.

## 7 Referansar

- Moen, I. U., Gjengedal, G. (2022). Valideringsrapport: Bestemming av Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Y og Zn i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsoppslutting. Rapport 32/2022, Nofima, Bergen
- Moen, I. U. (2022). Valideringsrapport – tilleggsrapport: Bestemming av fosforinnhald i fôr, fôringrediensar, fisk og feces ved bruk av ICP-OES og mikrobølgeovnsoppslutting. Rapport 33/2022, Nofima, Bergen.
- Hovde, G. (2013). Validation of a method for analysis of soluble phosphorus by use of alkaline extraction and spectrophotometric determination. Report 17/2013, Nofima, Bergen.

# VEDLEGG

## Vedlegg 1 – Riktighet: samanlikning med A 102

Vedleggtabell 1 og Vedleggtabell 2 viser resultat og t-test for samanlikning av ny metode med eksisterande metode (A 102).

Vedleggtabell 1: Resultat for samanlikning av ny (A 129) og eksisterande metode (A 102).

Prøve	Replikant	Resultat A 129 (mg/kg)	Resultat A 102 (mg/kg)
1130-1 (fiskefôr)	a	7510	8010
	b	7872	7970
1239-2 (fiskefôr)	a	10716	12100
	b	11289	11790
1239-3 (fiskefôr)	a	5331	6220
	b	5706	5770
2314-1 (SPC)	a	6792	6650
	b	6959	6820
2314-2 (hestebønner)	a	4481	4450
	b	4440	4380

Vedleggtabell 2: T-test for samanlikning av ny (A 129) og eksisterande metode (A 102). T-test viser ikkje-signifikant skilnad mellom metodane.

### T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg

	A 129	A 102
Gjennomsnitt	7109,601	7416
Varians	5612377,07	7203071,11
Observasjoner	10	10
Pearson-korrelasjon	0,9874774	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	9	
t-Stat	-1,90627965	
P(T<=t) ensidig	0,0444949	
T-kritisk, ensidig	1,83311293	
P(T<=t) tosidig	0,08898979	
T-kritisk, tosidig	2,26215716	

## Vedlegg 2 – Presisjon

Vedleggtabell 3 - Vedleggtabell 6 viser analysedata og berekninger av repeterbarhetsgrenser for løyseleg fosfor i fiskefôr og fôringrediensar, analysert ved 213,618 nm og 214,914 nm på ICP-OES.

Vedleggtabell 3: Analysedata og berekning av repeterbarheit for løyseleg fosfor i fiskefôr, analysert ved 213,618 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-408-1	08.11.2022	INMO	1	6655	7188	-532	283226	6921
22-408-1	08.11.2022	INMO	2	7156	7208	-52	2688	7182
22-408-1	08.11.2022	INMO	3	7035	7192	-157	24492	7114
22-408-1	08.11.2022	INMO	4	6919	7191	-273	74273	7055
22-408-1	08.11.2022	INMO	5	7473	7197	276	76397	7335
22-408-1	08.11.2022	INMO	6	7092	7350	-258	66487	7221
22-408-1	08.11.2022	INMO	7	6852	7204	-351	123489	7028
22-408-1	08.11.2022	INMO	8	7299	7092	206	42551	7196
22-408-1	08.11.2022	INMO	9	7390	7300	90	8080	7345
22-408-1	08.11.2022	INMO	10	6650	6908	-259	66895	6779
22-408-1	08.11.2022	INMO	11	6997	7059	-62	3843	7028
22-408-1	08.11.2022	INMO	12	7071	6985	86	7448	7028

	Snitt (ppm)	7103	
	Sum Diff.2 (ppm)	779869	
	n	12	
	sr = ROT(Sum Diff.2/2n)	180	
	r = 2,8*sr	505	
	RSDr	2,5 %	

Vedleggstabell 4: Analysedata og berekning av repeterbarheit for løyseleg fosfor i fiskefôr, analysert ved 214,914 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-408-1	08.11.2022	INMO	1	6606	6821	-215	46229	6714
22-408-1	08.11.2022	INMO	2	6861	6844	17	300	6853
22-408-1	08.11.2022	INMO	3	6869	6678	192	36737	6773
22-408-1	08.11.2022	INMO	4	6969	6942	28	761	6956
22-408-1	08.11.2022	INMO	5	7167	6970	197	38848	7068
22-408-1	08.11.2022	INMO	6	7074	7103	-29	836	7088
22-408-1	08.11.2022	INMO	7	6616	7031	-415	172316	6824
22-408-1	08.11.2022	INMO	8	7127	6983	144	20630	7055
22-408-1	08.11.2022	INMO	9	7247	7052	195	37838	7150
22-408-1	08.11.2022	INMO	10	6248	6669	-421	177258	6459
22-408-1	08.11.2022	INMO	11	6862	6861	2	2	6862
22-408-1	08.11.2022	INMO	12	6710	6807	-97	9328	6759
	Snitt (ppm)			6942				
	Sum Diff.2 (ppm)			354496				
	n			12				
	sr = ROT(Sum Diff.2/2n)			122				
	r = 2,8*sr			340				
	RSDr			1,8 %				

Vedleggstabell 5: Analysedata og berekning av repeterbarheit for løyseleg fosfor i fôringrediensar, analysert ved 213,618 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-2314-1	16.11.2022	INMO	1	6792	6959	-167	27869	6875
22-2314-1	16.11.2022	INMO	2	6799	7116	-316	100115	6957
22-2314-1	16.11.2022	INMO	3	7018	7150	-132	17551	7084
22-2314-1	16.11.2022	INMO	4	6884	7249	-365	133181	7066
22-2314-2	16.11.2022	INMO	5	4481	4440	42	1740	4461
22-2314-2	16.11.2022	INMO	6	4121	4389	-268	71620	4255
22-2314-2	16.11.2022	INMO	7	4507	4504	3	7	4506
22-2314-2	16.11.2022	INMO	8	4163	4420	-256	65787	4291
	Snitt (ppm)			5687				
	Sum Diff.2 (ppm)			417871				
	n			8				
	sr = ROT(Sum Diff.2/2n)			162				
	r = 2,8*sr			453				
	RSDr			2,8 %				

Vedleggstabell 6: Analysedata og berekning av repeterbarheit for løyseleg fosfor i føringrediensar, analysert ved 214,914 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-2314-1	16.11.2022	INMO	1	7624	7703	-78	6136	7663
22-2314-1	16.11.2022	INMO	2	7416	7625	-209	43815	7520
22-2314-1	16.11.2022	INMO	3	7510	7443	67	4493	7476
22-2314-1	16.11.2022	INMO	4	7403	7975	-572	327356	7689
22-2314-2	16.11.2022	INMO	5	4995	5054	-59	3473	5024
22-2314-2	16.11.2022	INMO	6	4642	4872	-230	52974	4757
22-2314-2	16.11.2022	INMO	7	4949	5101	-152	23055	5025
22-2314-2	16.11.2022	INMO	8	4842	5007	-165	27096	4924

Snitt (ppm)	6260
Sum Diff.2 (ppm)	488397
n	8
$sr = \text{ROT}(\text{Sum Diff.2}/2n)$	175
$r = 2,8 * sr$	489
RSDr	2,8 %

Vedleggstabell 7: Analysedata og berekning av intern reproduserbarheit for løyseleg fosfor i fiskefôr, analysert ved 213,618 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-408-1	08.11.2022	INMO	1	6655	7188	-532	283226	6921
22-408-1	08.11.2022	INMO	2	7156	7208	-52	2688	7182
22-408-1	08.11.2022	INMO	3	7035	7192	-157	24492	7114
22-2228-1	29.11.2022	INMO	4	6712	6623	89	7919	6668
22-2228-2	29.11.2022	INMO	5	5235	5337	-103	10578	5286
22-2228-3	29.11.2022	INMO	6	8966	8956	10	100	8961
22-2852-1	09.12.2022	JMS	7	4186	4830	-644	414633	4508
22-2852-2	09.12.2022	JMS	8	4155	4387	-232	54014	4271
22-2852-3	09.12.2022	JMS	9	4316	5015	-700	489636	4665
22-011-1	05.01.2023	JMS	10	6960	6191	-164	26978	8448
22-011-2	05.01.2023	JMS	11	7454	7492	-352	124024	8128
22-011-3	05.01.2023	JMS	12	6970	7534	-136	18627	8277
23-176-1	27.01.2023	INMO	13	8366	8530	-164	26978	8448
23-176-2	27.01.2023	INMO	14	7952	8304	-352	124024	8128
23-176-3	27.01.2023	INMO	15	8209	8345	-136	18627	8277
23-315-1	10.02.2023	JMS	16	4339	4563	-224	50319	4451
23-315-2	10.02.2023	JMS	17	5159	5929	-770	592284	5544
23-315-3	10.02.2023	JMS	18	5318	5361	-42	1803	5339
	Snitt (ppm)			6504				
	Sum Diff.2 (ppm)			2270951				
	n			18				
	sRi = ROT(Sum Diff.2/2n)			251				
	Ri = 2,8*sRi			703				
	RSDRi			3,9 %				



Vedleggstabell 8: Analysedata og berekning av intern reproduserbarheit for løyseleg fosfor i fiskefôr, analysert ved 214,914 nm med ICP-OES.

Prøve	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff.2 (ppm)	Snitt (ppm)
22-408-1	08.11.2022	INMO	1	6606	6821	-215	46229	6714
22-408-1	08.11.2022	INMO	2	6861	6844	17	300	6853
22-408-1	08.11.2022	INMO	3	6869	6678	192	36737	6773
22-2228-1	29.11.2022	INMO	4	6615	6552	63	3982	6583
22-2228-2	29.11.2022	INMO	5	5113	5296	-183	33511	5205
22-2228-3	29.11.2022	INMO	6	8868	8765	104	10725	8817
22-2852-1	09.12.2022	JMS	7	4228	4825	-597	356337	4527
22-2852-2	09.12.2022	JMS	8	4242	4493	-251	63046	4367
22-2852-3	09.12.2022	JMS	9	4372	5068	-696	484235	4720
22-011-1	05.01.2023	JMS	10	6758	6165	593	351720	6462
22-011-2	05.01.2023	JMS	11	7646	7501	145	21098	7574
22-011-3	05.01.2023	JMS	12	6885	7605	-720	517738	7245
23-176-1	27.01.2023	INMO	13	8328	8721	-393	154229	8524
23-176-2	27.01.2023	INMO	14	8125	8600	-475	225274	8362
23-176-3	27.01.2023	INMO	15	8287	8536	-249	61896	8412
23-315-1	10.02.2023	JMS	16	4283	4478	-195	38209	4380
23-315-2	10.02.2023	JMS	17	5080	5793	-713	507998	5436
23-315-3	10.02.2023	JMS	18	5253	5219	34	1172	5236
	Snitt (ppm)			6455				
	Sum Diff.2 (ppm)			2914436				
	n			18				
	sRi = ROT(Sum Diff.2/2n)			285				
	Ri = 2,8*sRi			797				
	RSDRi			4,4 %				

Vedleggstabell 9: Analysedata og berekning av intern reproduserbarheit for løyseleg fosfor i fôringrediensar, analysert ved 213,618 nm med ICP-OES.

Prøve	Prøvetype	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff. <sup>2</sup> (ppm)	Snitt (ppm)
2314-1	SPC	16.11.2022	INMO	1	6792	6959	-167	27869	6875
2314-1	SPC	16.11.2022	INMO	2	6799	7116	-316	100115	6957
2314-2	Hestebønner	16.11.2022	INMO	3	4481	4440	42	1740	4461
2314-2	Hestebønner	16.11.2022	INMO	4	4121	4389	-268	71620	4255
2802-9	Fiskemjøl	12.12.2022	JMS	5	7337	7794	-457	208465	7565
2802-11	Fiskemjøl	12.12.2022	JMS	6	8120	9281	-1161	1347898	8700
2802-8	Lecithin	15.12.2022	JMS	7	6389	6655	-266	70511	6522
2314-2	Hestebønner	27.01.2023	INMO	8	3954	4634	-679	461707	4294
2314-4	Kveitegluten	27.01.2023	INMO	9	1753	1825	-72	5232	1789
2314-5	PPC	27.01.2023	INMO	10	8148	8589	-441	194596	8369
2314-6	Kveite	27.01.2023	INMO	11	2123	2507	-385	147840	2315
288-1	Fiskemjøl	02.02.2023	INMO	12	6106	6029	76	5816	6067
288-2	SPC	02.02.2023	INMO	13	7214	7424	-210	44037	7319
288-3	Hestebønner	02.02.2023	INMO	14	4695	4876	-181	32833	4786
288-4	Kveitegluten	02.02.2023	INMO	15	2101	1984	116	13561	2042
288-5	PPC	02.02.2023	INMO	16	7476	8052	-576	331764	7764
288-6	Kveite	02.02.2023	INMO	17	1909	2084	-175	30737	1997
288-1	Fiskemjøl	01.03.2023	JMS	18	5663	5948	-285	81379	5806
288-2	SPC	01.03.2023	JMS	19	7013	7273	-260	67522	7143
288-3	Hestebønner	01.03.2023	JMS	20	4109	4452	-343	117848	4280
288-4	Kveitegluten	01.03.2023	JMS	21	1834	1988	-154	23787	1911
288-5	PPC	01.03.2023	JMS	22	7402	7851	-449	201412	7626
288-6	Kveite	01.03.2023	JMS	23	1799	1752	47	2226	1776

	Snitt (ppm)	5244
	Sum Diff. <sup>2</sup> (ppm)	3590516
	n	23
	$s_{Ri} = \text{ROT}(\text{Sum Diff.}^2/2n)$	279
	$Ri = 2,8 * s_{Ri}$	782
	$RSD_{Ri}$	5,3 %

Vedleggstabell 10: Analysedata og berekning av intern reproduserbarheit for løyseleg fosfor i føringrediensar, analysert ved 214,914 nm med ICP-OES.

Prøve	Prøvetype	Dato	Analytiker	Antal, n	Resultat 1 (ppm)	Resultat 2 (ppm)	Diff. (ppm)	Diff. <sup>2</sup> (ppm)	Snitt (ppm)
2314-1	SPC	16.11.2022	INMO	1	7622	7705	-82	6805	7663
2314-1	SPC	16.11.2022	INMO	2	7412	7613	-201	40598	7512
2314-2	Hestebønner	16.11.2022	INMO	3	4999	5046	-46	2155	5022
2314-2	Hestebønner	16.11.2022	INMO	4	4638	4877	-239	57198	4758
2802-8	Fiskemjøl	15.12.2022	JMS	5	6343	6645	-302	91452	6494
2802-9	Fiskemjøl	12.12.2022	JMS	6	7347	7732	-385	148125	7539
2802-11	Lecithin	12.12.2022	JMS	7	7981	9249	-1269	1610336	8615
2314-2	Hestebønner	27.01.2023	INMO	8	3919	4599	-680	462182	4259
2314-4	Kveitegluten	27.01.2023	INMO	9	1655	1785	-130	16838	1720
2314-5	PPC	27.01.2023	INMO	10	8145	8663	-517	267641	8404
2314-6	Kveite	27.01.2023	INMO	11	2055	2507	-452	204693	2281
288-1	Fiskemjøl	02.02.2023	INMO	12	6051	6013	38	1465	6032
288-2	SPC	02.02.2023	INMO	13	7230	7419	-189	35627	7325
288-3	Hestebønner	02.02.2023	INMO	14	4700	4818	-119	14104	4759
288-4	Kveitegluten	02.02.2023	INMO	15	2074	1943	130	17009	2008
288-5	PPC	02.02.2023	INMO	16	7258	8028	-770	592992	7643
288-6	Kveite	02.02.2023	INMO	17	1830	2125	-295	87285	1978
288-1	Fiskemjøl	01.03.2023	JMS	18	6128	5912	215	46397	6020
288-2	SPC	01.03.2023	JMS	19	7202	7424	-222	49111	7313
288-3	Hestebønner	01.03.2023	JMS	20	4698	4818	-119	14225	4758
288-4	Kveitegluten	01.03.2023	JMS	21	2033	1922	111	12332	1977
288-5	PPC	01.03.2023	JMS	22	7353	8013	-660	435560	7683
288-6	Kveite	01.03.2023	JMS	23	1797	2103	-306	93844	1950

	Snitt (ppm)	5379
	Sum Diff. <sup>2</sup> (ppm)	4307973
	n	23
	$s_{Ri} = \text{ROT}(\text{Sum Diff.}^2/2n)$	306
	$Ri = 2,8 * s_{Ri}$	857
	$\text{RSD}_{Ri}$	5,7 %

### Vedlegg 3 – Robustheit

Vedleggtabell 11 - Vedleggtabell 13 viser resultat for alle replikat analysert under robustheitstesting av ekstraksjonstid, prøvemengde og sentrifugevilkår. Vedleggtabell 14 - Vedleggtabell 16 viser F-test og t-test for samanlikning av parameterverdiar.

Vedleggtabell 11: Resultat frå robustheitstesting av ekstraksjonstider.

Ekstraksjonstid (t)	1		2		5		17	
Parallell	a	b	a	b	a	b	a	b
1130-1 (fiskefôr)	7510	7872	7639	7889	7827	7854	7442	7667
1239-2 (fiskefôr)	10716	11289	11284	11716	11689	12122	11529	11777
1239-3 (fiskefôr)	5331	5706	5406	5662	5560	5591	5112	5346
2314-1 (SPC)	6792	6959	6799	7116	7018	7150	6884	7249
2314-2 (hestebønner)	4481	4440	4121	4389	4507	4504	4163	4420
Snitt	8071		8266		8440		8146	
Std.avvik	2482		2702		2872		2912	
RSD	30,8 %		32,7 %		34,0 %		35,7 %	

Vedleggtabell 12: Resultat frå robustheitsforsøk for ulike prøvemengder. Alle prøvar rista i 17 timar og sentrifugerte i 20 minutt ved 2000 rpm.

Prøvemengde (g) / lutvolum (ml)	Fiskefôr (2022-408-1)										Snitt (mg/kg)	Std.av. (mg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
0,2 / 20	7114	6958	7005	6866	7468	7013	6891	7451	7055	6960	7078	214	3,0 %
0,8 / 80	6875	6812	6916	6936	7019	7042	6763	6880	7063	7064	6937	107	1,5 %

Vedleggtabell 13: Resultat frå robustheitsforsøk for ulike sentrifugevilkår. Alle prøvar har 0,2 g innveging og vart rista i 17 timar.

Sentrifugeid (min) / hastigheit (rpm)	Fiskefôr (2022-408-1)										Snitt (mg/kg)	Std.av. (mg/kg)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
20 / 2000	7114	6958	7005	6866	7468	7013	6891	7451	7055	6960	7078	214	3,0 %
5 / 3000	6845	7139	7241	7185	7072	7064	6994	7531	7069	7132	7127	179	2,5 %
10 / 3000	7046	7062	6872	7019	6917	7062	6809	7518	6849	7147	7030	204	2,9 %

Vedleggtabell 14: T-test for samanlikning av ekstraksjonstider viser ikkje-signifikant skillnad på 1 t og 17 t ekstraksjon. Tal vist i Vedleggtabell 11 er brukt i berekningane.

T-Test: Gjennomsnitt for to parvise utvalg		
	1 time	17 timar
Gjennomsnitt	7109,601	7158,856
Varians	5612377,07	7200105,6
Observasjoner	10	10
Pearson-korrelasjon	0,99647048	
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	9	
t-Stat	-0,41098665	
P(T<=t) ensidig	0,34534782	
T-kritisk, ensidig	1,83311293	
P(T<=t) tosidig	0,69069565	
T-kritisk, tosidig	2,26215716	

Vedleggtabell 15: F-test og t-test for samanlikning av 0,2 g og 0,8 g prøvemengde, viser ikkje-signifikant skillnad. Resultat gitt i Vedleggtabell 12 er brukt i berekningane.

F-Test: To utvalg for varianser			t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
	0,2 g/20 ml	0,8 g/80 ml		0,2 g/20 ml	0,8 g/80 ml
Gjennomsnitt	7078,154	6936,904	Gjennomsnitt	7078,154	6936,904
Varians	45626,24849	11475,1631	Varians	45626,2485	11475,1631
Observasjoner	10	10	Observasjoner	10	10
fg	9	9	Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
F	3,976087132		fg	13	
P(F<=f) en side	0,025973869		t-Stat	1,86923986	
F-kritisk, en side	3,178893104		P(T<=t) ensidig	0,04214031	
			T-kritisk, ensidig	1,7709334	
			P(T<=t) tosidig	0,08428062	
			T-kritisk, tosidig	2,16036866	

Vedleggtabell 16: F-test og t-test for samanlikning av sentrifugevilkår viser ikkje-signifikant skilnad på 20 min v/2000 rpm og 5 min v/ 3000 rpm. Resultat gitt i Vedleggtabell 13 er brukt i berekningane.

F-Test: To utvalg for varianser			t-Test: To utvalg med antatt like varianser		
	20 min / 2000 rpm	5 min / 3000 rpm		20 min / 2000 rpm	5 min / 3000 rpm
Gjennomsnitt	7078,154	7127,208	Gjennomsnitt	7078,154	7127,208
Varians	45626,2485	31955,0277	Varians	45626,2485	31955,0277
Observasjoner	10	10	Observasjoner	10	10
fg	9	9	Gruppevarians	38790,6381	
F	1,42782691		Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
P(F<=f) en side	0,3021243		fg	18	
F-kritisk, en side	3,1788931		t-Stat	-0,55692404	
F<Fkritisk => lik varians			P(T<=t) ensidig	0,29221917	
			T-kritisk, ensidig	1,73406361	
			P(T<=t) tosidig	0,58443834	
			T-kritisk, tosidig	2,10092204	