

## Validering av nytt HPLC-system for analyse av astaxanthin (BIOLAB A 23)

Gunnhild Hovde og Bente Asbjørnsen





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

Nofima har om lag 370 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 Johnsen gate 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](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<i>Tittel:</i> <b>Validering av nytt HPLC-system for analyse av astaxanthin (BIOLAB A 23)</b>	ISBN 978-82-8296-578-1 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Validation of a new HPLC-system for analysis of astaxanthin (BIOLAB A 23)	<i>Rapportnr.:</i> 1/2019
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Gunnhild Hovde og Bente Asbjørnsen	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Avdeling:</i> BioLab	<i>Dato:</i> 25.01.2019
<i>Oppdragsgiver:</i> Nofima AS - Bergen	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 11+9
<i>Stikkord:</i> Validering, HPLC, astaxanthin	<i>Oppdragsgivers ref.:</i>  
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Det ble validert et nytt HPLC-system for metoden BIOLAB A 23 Astaxanthin. Det nye instrumentet er en Agilent 1260 Infinity II og erstatter en Perkin Elmer Series 200. Det er ingen endringer i metodens prinsipper eller prøvematriser. Det ble foretatt en vurdering av riktighet, presisjon og linearitet. Valideringen demonstrerte at det nye instrumentet yter som forventet, og kan brukes til akkrediterte analyser av astaxanthin. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser fra og med 23. januar 2019.	
<i>English summary/recommendation:</i> A new HPLC system for the method "BIOLAB A 23 Astaxanthin" was validated. The new instrument is an Agilent 1260 Infinity II and replaces a Perkin Elmer Series 200. There are no changes in the method's principles or sample matrixes. The method's accuracy, precision and linearity were evaluated. The validation demonstrated that the new instrument performs as expected and can be used for accredited analysis of astaxanthin. The report has been reviewed by Norwegian Accreditation and the instrument has been approved for accredited analyzes as of January 23 <sup>rd</sup> 2019.	

# Innhold

<b>1</b>	<b>Rapportens omfang</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Validering</b> .....	<b>2</b>
2.1	Riktighet.....	2
2.1.1	Ringtestresultater.....	2
2.1.2	Kontrollprøve.....	3
2.1.3	Andre prøver .....	4
2.2	Presisjon .....	5
2.3	Linearitet .....	6
<b>3</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>11</b>
	<b>Vedlegg 1 – Valideringsplan</b> .....	<b>II</b>
	<b>Vedlegg 2 – Riktighet</b> .....	<b>III</b>
	<b>Vedlegg 3 – Presisjon</b> .....	<b>VI</b>
	<b>Vedlegg 4 – Linearitet</b> .....	<b>VIII</b>

## 1 Rapportens omfang

Det ble validert et nytt HPLC-system for metoden BIOLAB A 23 Astaxanthin, hvor astaxanthin ekstraheres ved bruk av etanol og diklormetan og analyseres ved hjelp av normal fase kromatografi på en Si 60 kolonne ved 470 nm etter at polare matriksforbindelser er fjernet ved åpen kolonnekromatografi på silikagel. Det nye instrumentet er en Agilent 1260 Infinity II og erstatter et gammelt instrument, en Perkin Elmer Series 200. Det er ingen endringer i metodens prinsipp eller prøvematriser.

NMKL-prosedyre nr. 4 (2009) angir hva som kreves av validering før et nytt instrument tas i bruk. For en eksternt validert metode (via en kolloborativ metodeavprøvning) hvor det tas i bruk nytt instrument eller en ny matrise må det gjøres en verifisering av riktighet og presisjon og eventuelt av kvantifiseringsgrense (NMKL 2009). Det ble lagt vekt på å sjekke instrumentets linearitet. Lineariteten vil bekrefte om instrumentet yter godt nok i forhold til metodens kvantifiseringsgrense.

## 2 Validering

Valideringsplanen er vist i vedlegg 1.

### 2.1 Riktighet

Den gamle HPLCen, og resultater som produseres på denne av blant annet kontrollprøven ble brukt som grunnlag for å vurdere riktigheten til det nye instrumentet. Grunnlaget for dette er at Biolab deltar i fast ringtestprogram for astaxanthin (fra DSM (Dutch State Mines) og Masterlab), med gode resultater. Man antar derfor at riktigheten for den gamle HPLCen er god, og at en sammenligning mellom de to instrumentene også kan bekrefte riktigheten av den nye HPLCen. Det er ikke mulig å analysere gamle ringtestprøver for å verifisere riktigheten av instrumentet, da astaxanthin er en ustabil forbindelse som undergår både oksidasjon og isomerisering ved lagring. En oppsummering av ringtestdeltakelsen for metoden er vist i kapittel 2.1.1.

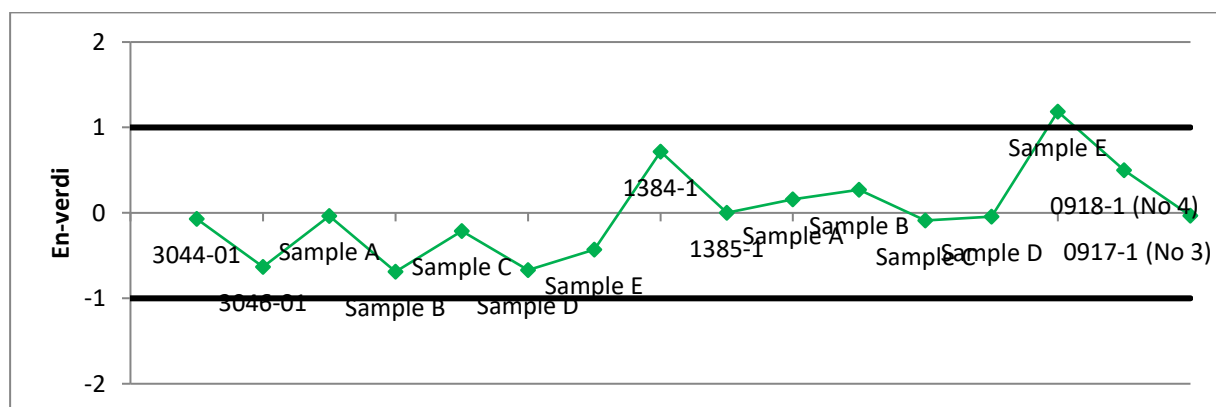
#### 2.1.1 Ringtestresultater

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

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

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

En oppsummering av de 16 siste ringtestresultatene for metoden er vist i tabell 2 i vedlegg 2 og i Figur 1.



Figur 1  $E_n$ -verdier for de 16 siste ringtestene for astaxanthin.

Alle  $E_n$ -verdiene i perioden ligger i det akseptable området, med unntak av én som ligger i det betenkelige området. Riktigheten til metoden slik den har vært utført på gammelt instrument anses dermed som god og kan benyttes for å verifisere riktigheten av nytt instrument.

For å verifisere riktigheten til det nye instrumentet ble det analysert kontrollprøver samt en del andre prøver for å sjekke overenstemmelsen mellom de to instrumentene. Utfordringene i den forbindelse har vært at forskjellige analysebetingelser kan bidra til variasjon i resultatene, derfor har man benyttet samme kolonne og gjort kalibrering samme dag av de to instrumentene, for å unngå for mange usikkerhetsfaktorer.

### 2.1.2 Kontrollprøve

Kontrollprøven ble analysert på begge instrumentene. Det ble som nevnt benyttet samme kolonne på begge instrumentene. Kontrollprøven ble analysert på gammel HPLC i tidsrommet 19. november til 13. desember 2018 og på ny HPLC i tidsrommet 16. november til 11. desember 2018. Datasettet for de to HPLCene er vist i Tabell , vedlegg 2. Det ble benyttet F-test for å sjekke om det var signifikant forskjellig varians (det vil si spredning) i de to datasettene. Beregningen av F-verdi er vist i Tabell 1.

Tabell 1 *F-test for sammenligning av varians mellom gammelt og nytt instrument (tosidig, 95 % konfidensintervall).*

	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt (mg/kg)	46,93	45,92
Standardavvik	2,95	2,23
Varians	8,69	4,99
Antall observasjoner (n)	34	30
Frihetsgrader	33	29
F-verdi (beregnet)	1,740	
F-verdi (kritisk), tosidig	2,069	
p-verdi (tosidig)	0,133	

Beregnet F-verdi er 1,740 som er mindre enn den kritiske F-verdien på 2,069, og p-verdien er >0,05. Det vil si at det ikke er signifikant forskjell på variansen/spredningen i de to datasettene. Det ble deretter benyttet t-test for å sjekke om det var forskjeller mellom gjennomsnittet av kontrollprøven analysert på de to instrumentene. Resultat av t-test er vist i Tabell 2.

Tabell 2 *t-test for sammenligning av resultater av kontrollprøven på de to instrumentene (tosidig, 95 % konfidensintervall).*

	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt (mg/kg)	46,93	45,92
Standardavvik	2,95	2,23
Varians	8,69	4,99
Antall observasjoner (n)	34	30
Frihetsgrader	62	
t-verdi (beregnet)	1,532	
t-verdi (kritisk), tosidig	1,999	
p-verdi (tosidig)	0,131	

Beregnet t-verdi er 1,532 og er lavere enn den kritiske t-verdien på 1,999, og p-verdien er >0,05. Det er derfor ikke signifikant forskjell på de to datasettene.

I denne beregningen er verdier i alarmområdet for gammel HPLC utelatt. Dersom disse inkluderes blir resultatet av t-test som vist i Tabell 3.

Tabell 3 *t-test for sammenligning av resultater av kontrollprøven på de to instrumentene dersom verdier i alarmområdet for gammel HPLC inkluderes (tosidig, 95 % konfidensintervall).*

	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt (mg/kg)	47,43	45,92
Standardavvik	3,16	2,23
Varians	9,96	4,99
Antall observasjoner (n)	40	30
Frihetsgrader	68	
t-verdi (beregnet)	2,230	
t-verdi (kritisk), tosidig	1,995	
p-verdi (tosidig)	0,029	

Som vist er da den beregnede t-verdien noe høyere enn den kritiske t-verdien, og p-verdien er <0,05. Det vil si at det er statistisk signifikant forskjell mellom de to HPLCene under disse betingelsene. Kontrollprøven på gammel HPLC har havnet i alarmområdet noe oftere enn det som er statistisk forventet. Dette kan skyldes problemer med pumpen. I stabile perioder er forskjellen mellom de to instrumentene små, som vist i Tabell 2.

### 2.1.3 Andre prøver

Det ble gjort en sammenligning på nytt og gammelt instrument av fem ringtestprøver mottatt i desember 2018. Det ble analysert to paralleller per prøve per instrument. Det ble benyttet parett t-test for å sammenligne de to instrumentene. Datasettet er vist i Tabell , vedlegg 2. Resultat av t-test er vist i Tabell 4.

Tabell 4 *Parett t-test for 5 ringtestprøver analysert på begge instrument.*

	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt	219,75	234,97
Antall observasjoner (n)	5	5
Frihetsgrader	4	
t (beregnet)	0,986	
t (kritisk), tosidig	2,776	
p-verdi, tosidig	0,380	

Det er ikke statistisk forskjell på datasettene, da beregnet t-verdi (0,986) er lavere enn tabellverdi for t (2,776) og p-verdien er >0,05. Det er heller ikke systematisk forskjell mellom de to instrumentene. Arrangørens resultater for de 5 ringtestprøvene forelå ikke enda da denne rapporten ble ferdigstilt.



## 2.2 Presisjon

Presisjon beskriver overensstemmelsen mellom uavhengige resultater oppnådd på nøyaktig samme måte under spesifikke forhold. Presisjonen uttrykkes vanligvis som resultatenes standardavvik. Metodens presisjon kan bestemmes som a) repeterbarhet, det vil si at analysemetoden benyttes på identiske prøver på samme laboratorium med samme utstyr i løpet av en kort tidsperiode, eller som b) reproduserbarhet, det vil si at metoden benyttes på identiske prøver på forskjellige laboratorier med forskjellig utstyr (Douglas A. Skoog 2004, NMKL 2009). I dette tilfellet ble det beregnet det som må kalles en mellomting, da det i dette tilfellet er benyttet samme prøve, men det er flere analytikere analysert prøvene. For gammel HPLC ble prøven analysert i løpet av en noe lengre tidsperiode enn for ny HPLC. Det ble derfor beregnet en såkalt «intermediate precision». Beregning som for repeterbarhetsgrense ble benyttet. Betingelsene for presisjonsberegningene er vist i Tabell 5.

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

Betingelse	Gammel HPLC	Ny HPLC
Samme prøve	Ja	Ja
Samme analytiker	Nei	Nei
Samme utstyr	Nei	Nei
Tidsperiode	11 dager	3 dager

Repeterbarhetsgrensen ( $r$ ) er et uttrykk for den absolutte forskjellen med 95 % konfidensintervall mellom to uavhengige testresultater oppnådd ved betingelsene nevnt i punkt a på forrige side (ISO 1994). Slike testresultater kalles dobbeltbestemmelser (NMKL 2009).  $r$  beregnes som vist i formel 2.1.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r \quad (2.1)$$

$t$  er den tosidige  $t$ -verdien ved 95 % konfidensintervall og  $S_r$  er standardavviket til repeterbarheten (ISO 1994).  $S_r$  beregnes ved hjelp av formel 2.2.

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}} \quad (2.2)$$

$x_i$  og  $y_i$  er de to målingene i en dobbeltbestemmelse og  $n$  er antall par av dobbeltbestemmelser (NMKL 2009).

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

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

Krav til presisjon på det nye instrumentet er at den er minst like god som for det gamle. Siden vi sammenligner prøver over et mindre tidsrom for det nye instrumentet forventes det at presisjonen for det nye instrumentet er noe bedre enn for det gamle.

Beregning av presisjon for kontrollprøven er vist i tabell 5 og tabell 6 i vedlegg 3. En oppsummering er vist i Tabell 6.

Tabell 6 Oppsummering av beregnet presisjon for gammelt og nytt instrument.

	Gammel HPLC	Ny HPLC
Snitt (mg/kg)	46,93	45,92
$S_r$	0,846	0,604
$r$	2,39	1,71

Som vist i tabellen er presisjonen noe bedre for den nye HPLCen enn den gamle, det vil si at repeterbarhetsgrensen er lavere. Dette er som forventet i henhold til foregående avsnitt.

## 2.3 Linearitet

Linearitet ble undersøkt ved å fortynne standardløsning til ulike konsentrasjoner og injisere hver standardløsning tre ganger. Måleområdet skulle minst dekke det akkrediterte måleområdet til metoden. Måleområdet til metoden ble derfor omregnet til injisert mengde på instrumentet. Metodens måleområde i mg/kg er vist i Tabell 7.

Tabell 7 Metodens akkrediterte måleområde slik det er oppgitt i metodebeskrivelsen og i kvalitetssystemet.

Prøvematriks	Nedre måleområde (mg/kg)	Øvre måleområde (mg/kg)	Innveid mengde (g)	Fortynning (ml)
Fiskefôr	5	150	2	100
Fisk	2	20	20	250
Konsentrat	2000	15000	0,1	250+3/20,5

Det vil si at metodens totale måleområde er 2-15000 mg/kg. Omregnet til mg/l injisert på HPLC tilsvarer dette cirka 0,10 til 3 mg/l.

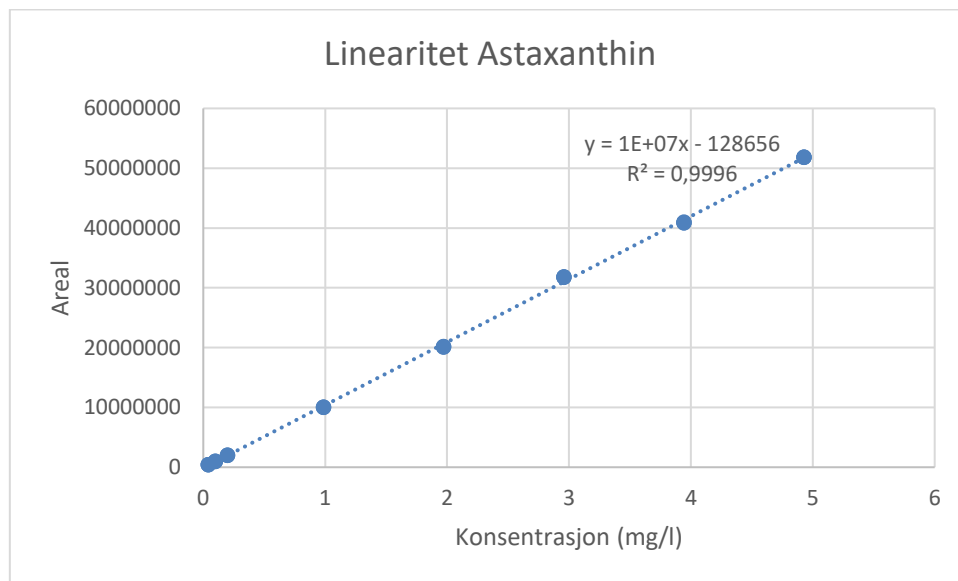
Det ble laget en stamløsning av astaxanthin. Denne løsningen ble målt spektrofotometrisk og konsentrasjonen i løsningen ble beregnet til 19,71 mg/l. Denne løsningen (C1) ble brukt til å lage 8 standarder som igjen ble benyttet til å sjekke instrumentets linearitet. Fortynningen av C1 og konsentrasjonen på de tillagede løsningene er vist i Tabell 8. Fortynningen ble tilpasset det utstyret som var tilgjengelig (målekolber og fullpipetter), men det ble passet på at standardløsningene dekket hele måleområdet og at det var god spredning mellom standardene. Måleområdet som ble dekket av dette forsøket var fra 0,04-4,93 mg/l.

Tabell 8 Fortynning av stamløsning (C1) (19,71 mg/l) for å sjekke instrumentets linearitet.

Standard	Navn	Fortynning	Beregnet kons. (mg/l)
1	C2	C2*5/10	4,93
2	C3	C2*4/10	3,94
3	C4	C5*3/5	2,96
4	C5	C1*10/100	1,97
5	C6	C8*5/10	0,99
6	C7	C9*5/25	0,20
7	C8	C10*5/10	0,10
8	C9	C10*1/5	0,04

Hver standard (1-8) ble injisert tre ganger. De tilhørende arealene for hver standard er vist i tabell 7 i vedlegg 4.

Det ble gjort regresjonsanalyse samt benyttet minste kvadraters metode for å undersøke lineariteten. Regresjonslinjen er vist i Figur 2.



Figur 2 Regresjonslinje for astaxanthin, i området 0,04-4,93 mg/l.

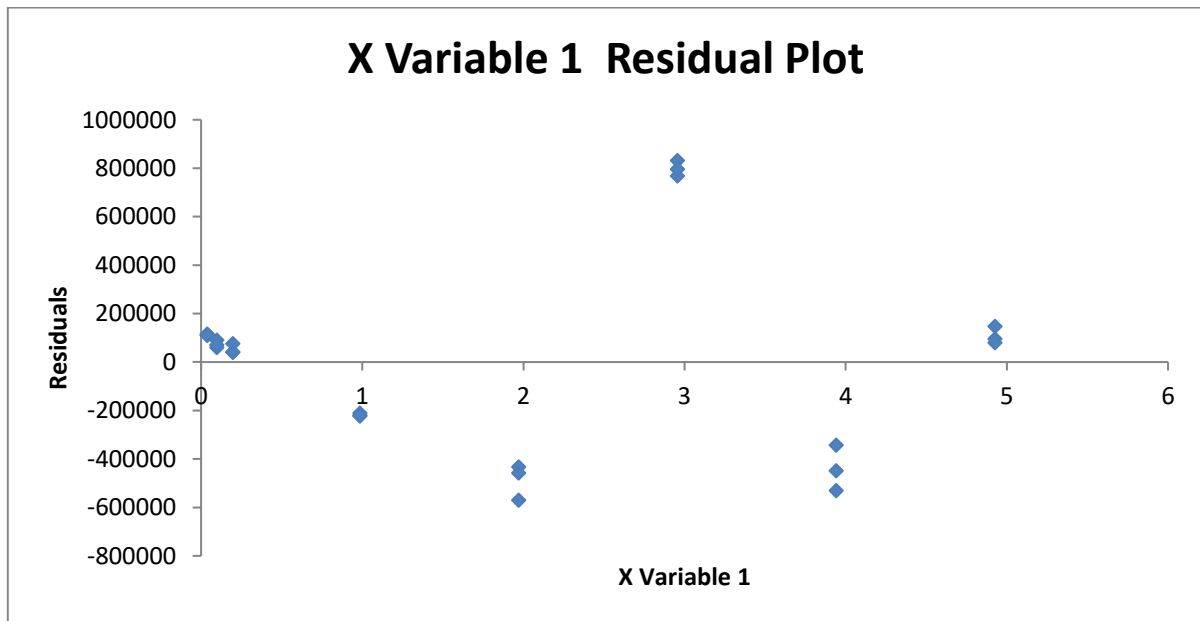
Som vist i figuren er korrelasjonskoeffisienten nær 1 (0,9996). Signifikanstester bør vise at stigningstallet er statistisk forskjellig fra null, mens skjæringen med y-akse bør ikke være signifikant forskjellig fra null. Dataanalyseverktøyet i Excel ble benyttet. Regresjonsstatistikken er vist i Tabell 9.

Tabell 9 Regresjonsstatistikk for linearitetstest (minste kvadraters metode).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	24		
R <sup>2</sup> -verdi	0,99958		
F-verdi	52268		
t-verdi		-1,081	228,6
p-verdi		0,291	1,23×10 <sup>-38</sup>
Nedre 95 % konfidensintervall		-375481	10429676
Øvre 95 % konfidensintervall		118170	10620628

Tabellen viser at stigningstallet er signifikant forskjellig fra null med  $t=228,6$  og  $p \ll 0,05$ . For skjæringspunktet viser t-verdien på  $-1,081$  at skjæringspunktet ikke er signifikant forskjellig fra 0, mens p-verdien på  $0,291$  viser at det er signifikant forskjellig fra null. Når man ser på 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet ( $-375481$  til  $118170$ ) ser man at null er en mulig verdi for skjæringspunktet. En høy F-verdi ( $52268$ ) styrker også argumentet om at regresjonen er berettiget.

Det ble også laget residualplott for å undersøke om regresjonen virkelig er lineær, eller om det ser ut til at kurven bøyer av i øvre og/eller nedre måleområde. Et residual er forskjellen mellom den observerte responsen og den forutsagt fra regresjonslinjen. Residualene bør, når plottet mot x-variabelen, ha en tilfeldig distribusjon. Residualplottet er vist i Figur 2.



Figur 2 Residualplott.

Residualplottet viser at residualene er tilfeldig plassert rundt x-aksen, og at presisjonen til responsen (arealet) ikke er proporsjonal med konsentrasjonen.

Basert på de statistiske beregningene, i sammenheng med visuell observasjon av linjeplottet og residualplottet, anses lineariteten til metoden som god og ivaretatt i hele det akkrediterte måleområdet.

Det kan være verdt å nevne at ved utførelse av linearitetsforsøkene ble det gjort en regnefeil, slik at linearitet helt opp til 9,86 mg/l ble sjekket. Metoden/instrumentet viste seg å være lineær i hele måleområdet 0,04-9,86 mg/l. Grafer og statistikk vedrørende dette er vist i vedlegg 4.

### 3 Konklusjon

Basert på denne valideringen og de statistiske beregningene som er foretatt er instrumentet godkjent for bruk av analyse av astaxanthin (BIOLAB-metode A 23). Analyse av kontrollprøve og andre prøver viste at det ikke er statistisk signifikant forskjell mellom det nye instrumentet (Agilent 1260 Infinity II) og det gamle (Perkin Elmer Series 200). Riktigheten av det gamle instrumentet er demonstrert gjennom flere år med gode ringtestresultater hvorav de 16 siste er presentert i denne rapporten. Presisjonen for det nye instrumentet ble beregnet til noe bedre enn for det gamle, men dette er som forventet da analysene på nytt instrument ble utført over færre dager enn for det gamle. Lineariteten for det nye instrumentet er ivaretatt i hele det akkrediterte måleområdet, og instrumentet er også lineært i det utvidete måleområdet mellom 0,04 og 9,86 mg/l. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser fra og med 23. januar 2019.

## 4 Referanser

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

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

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

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

# VEDLEGG

<b>Vedlegg 1 – Valideringsplan .....</b>	<b>II</b>
<b>Vedlegg 2 – Riktighet .....</b>	<b>III</b>
<b>Vedlegg 3 – Presisjon .....</b>	<b>VI</b>
<b>Vedlegg 4 – Linearitet .....</b>	<b>VIII</b>



## Vedlegg 1 – Valideringsplan

Tabell 1 Valideringsplan nytt instrument: Agilent 1260 Infinity II, vinteren 2018/2019.

Instrumentet erstatter et HPLC-system fra Perkin Elmer (Series 200) som har vært brukt til analyse av astaxanthin. Måleprinsippet er det samme.				
<b>Analysemetode</b>	A 23 Astaxanthin			
<b>Metodeansvarlig</b>	Bente Asbjørnsen			
<b>Metodereferanse</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>J. Schierle, C. Frey, V. Riegert; Determination of CAROPHYLL® Pink astaxanthin in dilutions, premixes and fish feeds, Version 1.9 (06.01.2016)</li> <li>Fiskeri og havbruksnæringens landsforening (FHL): Metode for bestemmelse av astaxanthin i pelletert fiskefôr</li> </ol>			
<b>Prøvetype (matrise)</b>	Fôr, fisk og fôringredienser.			
<b>Måleområde</b>	Nedre kvantifiseringsgrense er 2 mg/kg (fisk). Øvre kvantifiseringsgrense er 15000 mg/kg (konsentrat).			
<b>Grad av ekstern validering</b>	Metoden er eksternt validert i en kollaborativ metodeavprøving. Biolab deltar regelmessig i ringtestprogram.			
<b>Valideringsomfang</b>	Verifisering av riktighet, presisjon og linearitet til nytt HPLC-system for analyse av astaxanthin.			
	<b>Valideringspunkt</b>	<b>Aktivitet og krav</b>	<b>Utføres av</b>	<b>Tidsplan</b>
1	Riktighet	<b>1. Analyse av kontrollprøve.</b> Riktighet testes ved å analysere ny KP og gammel KP minst 10 ganger.  <b>2. Ringtestprøver.</b> Ringtestprøver fra DSM-ringtesten i desember 2018 analyseres på begge instrument.  <b>Krav:</b> Godkjent F-test/t-test	BA	november
2	Presisjon	<b>Analyse av kontrollprøve (utført ved test av riktighet)</b>  <b>Krav:</b> Godkjente resultat etter vanlige regler for kontrollprøve. Nytt instrument bør ha minst like god presisjon som gammelt.	BA	november
3	Linearitet	<b>Analyse av standardløsning ved ulike fortyninger.</b> Skal minst dekke det akkrediterte måleområdet (omregnet til mg/l injisert). Tre injeksjoner per nivå. Minst 6 nivåer.  <b>Krav:</b> Godkjent regresjonsstatistikk (minste kvadraters metode).	BA	desember
4	Valideringsrapport	<b>Sammenfatte resultatene i valideringsrapport.</b>	GUHO	januar
5	Varsle NA	<b>Varsle Norsk Akkreditering når validering er utført. Instrumentet tas i bruk til akkrediterte analyser etter klarsignal fra NA.</b>	JWA	januar

## Vedlegg 2 – Riktighet

Tabell 2 Oppsummering av de 16 siste ringtestprøvene for metoden.

Ringtest-arrangør	M-Lab	M-Lab	DSM	DSM	DSM	DSM	DSM	M-Lab	M-Lab	DSM	DSM	DSM	DSM	DSM	M-lab	M-lab
<b>Prøve-nummer</b>	3044-01	3046-01	Samp le A	Samp le B	Samp le C	Samp le D	Samp le E	1384-1	1385-1	Samp le A	Samp le B	Samp le C	Samp le D	Samp le E	0918-1 (No 4)	0917-1 (No 3)
<b>Prøve-type</b>	Fiske-for	Fiske-fillet	Fiske-for	Fiske-for	Fiske-for	Fiske-for	Pre-mix	Fiske-for	Fiske-fillet	Fiske-for	Fiske-for	Fiske-for	Fiske-for	Pre-mix	Fish Flesh	Fish Feed
<b>Dato</b>	20.07.2016	12.08.2016	Uke 50-16	Uke 50-16	Uke 50-16	Uke 50-16	Uke 50-16	42816	42844	Nov 17	Nov 17	Nov 17	Nov 17	Nov 17	43207	43208
<b>Analytiker</b>	KS	RE	BA	BA	BA	BA	BA	KS	RE	BA	BA	BA	BA	BA	RE	RE
<b>Resultat, Nofima</b>	46,11	4,38	80,70	58,50	61,30	58,9	0,82	60,13	5,24	35,4	65,2	83,4	64,5	1,37	3,55	73,14
<b>uNofima</b>	2,31	0,22	4,04	2,93	3,07	2,945	0,041	3,007	0,262	1,77	3,26	4,17	3,225	0,069	0,178	3,657
<b>Middel-verdi</b>	46,51	4,71	81	62,8	62,7	63,2	0,86	54,78	5,24	34,8	63,3	84,2	64,8	1,19	3,34	73,48
<b>Antall deltakere</b>	12	8	20	20	20	20	20	17	12	27	28	27	27	24	12	14
<b>uSLP</b>	6,1	0,4	6,3	4,9	5,4	5,7	0,1	9,17	0,57	3,7	6,9	8,9	6	0,16	0,39	13,23
<b>Z-score</b>	0,066	0,825	0,048	0,878	0,259	0,754	0,400	0,583	0,000	0,162	0,275	0,090	0,050	1,125	0,538	0,026
<b>Zeta-score</b>	0,061	0,724	0,040	0,754	0,225	0,670	0,370	0,554	0,000	0,146	0,249	0,081	0,044	1,034	0,490	0,025
<b>En-verdi</b>	0,069	0,633	0,035	0,688	0,212	0,670	0,428	0,715	0,000	0,157	0,271	0,089	0,044	1,186	0,500	0,033

Tabell 3 Datasett for analyse av kontrollprøve på gammel og ny HPLC.

Gammel HPLC		Ny HPLC	
Dato	Resultat (mg/kg)	Dato	Resultat (mg/kg)
19.11.2018	50,31	16.11.2018	48,30
19.11.2018	50,16	16.11.2018	48,94
20.11.2018	49,05	16.11.2018	48,58
20.11.2018	49,56	16.11.2018	49,09
21.11.2018	48,10	16.11.2018	48,12
21.11.2018	49,06	16.11.2018	49,78
23.11.2018	49,59	16.11.2018	48,76
23.11.2018	48,98	16.11.2018	49,06
27.11.2018	48,61	16.11.2018	49,16
27.11.2018	48,71	16.11.2018	48,26
28.11.2018	50,80	05.12.2018	42,70
28.11.2018	51,16	05.12.2018	43,78
29.11.2018	48,03	05.12.2018	42,91
29.11.2018	49,19	05.12.2018	43,71
30.11.2018	50,23	05.12.2018	43,82
30.11.2018	51,68	05.12.2018	43,82
06.12.2018	47,31	05.12.2018	44,18
06.12.2018	48,24	05.12.2018	44,06
12.12.2018	46,68	05.12.2018	43,39
12.12.2018	46,55	05.12.2018	44,37
12-13.12.2018	44,56	11.12.2018	45,43
12-13.12.2018	46,68	11.12.2018	45,47
12-13.12.2018	42,96	11.12.2018	45,06
12-13.12.2018	46,55	11.12.2018	45,47
12-13.12.2018	42,52	11.12.2018	45,38
12-13.12.2018	43,37	11.12.2018	44,78
12-13.12.2018	42,92	11.12.2018	44,48
12-13.12.2018	43,00	11.12.2018	46,17
12-13.12.2018	43,68	11.12.2018	45,60
12-13.12.2018	43,56	11.12.2018	44,94
12-13.12.2018	43,64		
12-13.12.2018	43,85		
12-13.12.2018	43,35		
12-13.12.2018	43,02		

Tabell 4 Resultater for analyser av 5 ringtestprøver på gammel og ny HPLC. Resultater fra ringtestarrangøren forelå ikke enda da rapporten ble ferdigstilt.

Dato	11.12.2018			12.12.2018			
Instrument	Ny HPLC			Gammel HPLC			
	asta mg/kg			asta mg/kg			
Journalnr./prøvetype	A	B	Snitt	A	B	Snitt	Differanse
2018-8049-01/fiskefôr	70,88	69,91	70,40	70,62	72,42	71,52	-1,13
2018-8049-02/fiskefôr	59,23	60,16	59,70	60,93	59,39	60,16	-0,47
2018-8049-03/fiskefôr	53,36	54,58	53,97	54,56	54,31	54,44	-0,47
2018-8049-04/fiskefôr	54,65	55,07	54,86	53,09	54,20	53,65	1,22
2018-8049-05/premix	920,47	951,41	935,94	853,47	864,50	858,99	76,96
Snitt			234,97			219,75	15,22
Standardavvik			391,91			357,42	34,52

## Vedlegg 3 – Presisjon

Tabell 5 Beregning av presisjon for gammel HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

Dato	Resultat 1	Resultat 2	Diff	Diff <sup>2</sup>	Snitt	Antall, n
19.11.2018	50,31	50,16	0,15	0,0225	50,24	1
20.11.2018	49,05	49,56	-0,51	0,2601	49,31	2
21.11.2018	48,1	49,063	-0,96	0,9274	48,58	3
23.11.2018	49,59	48,98	0,61	0,3721	49,29	4
27.11.2018	48,61	48,71	-0,10	0,0100	48,66	5
28.11.2018	50,797	51,159	-0,36	0,1310	50,98	6
29.11.2018	48,03	49,19	-1,16	1,3456	48,61	7
30.11.2018	50,23	51,68	-1,45	2,1025	50,96	8
06.12.2018	47,31	48,24	-0,93	0,8649	47,78	9
12.12.2018	46,68	46,55	0,13	0,0169	46,62	10
12-13.11.18	44,56	46,68	-2,12	4,4944	45,62	11
12-13.11.18	42,96	46,55	-3,59	12,8881	44,76	12
12-13.11.18	42,52	43,37	-0,85	0,7225	42,95	13
12-13.11.18	42,92	43	-0,08	0,0064	42,96	14
12-13.11.18	43,68	43,56	0,12	0,0144	43,62	15
12-13.11.18	43,64	43,85	-0,21	0,0441	43,75	16
12-13.11.18	43,35	43,02	0,33	0,1089	43,19	17
<b>n=</b>	<b>17</b>	<b>SUM D<sup>2</sup>=</b>	<b>24,332</b>	<b>Snitt=</b>	<b>46,93</b>	
<b>Reproduserbarhet</b>				<b>Repeterbarhet</b>		
Gjennomsnitt:		46,93		Sr = ROT(SUM(D*D))/2K)		0,8460
Standardavik:		2,9290		r = 2.8 * Sr		2,3927
Alarmgrenser:		4,1422				
Aksjonsgrenser:		6,2134		<b>Differanse</b>		
<b>+3s</b>		53,1445		Alarmgrenser +/-:		2,3927
<b>+2s</b>		51,0734		Aksjonsgrenser +/-:		3,5891
<b>Midtlinje</b>		<b>46,9311</b>				
<b>+2s</b>		42,7889				
<b>+3s</b>		40,7178				

Tabell 6 Beregning av presisjon for ny HPLC (resultater for kontrollprøven i mg/kg).

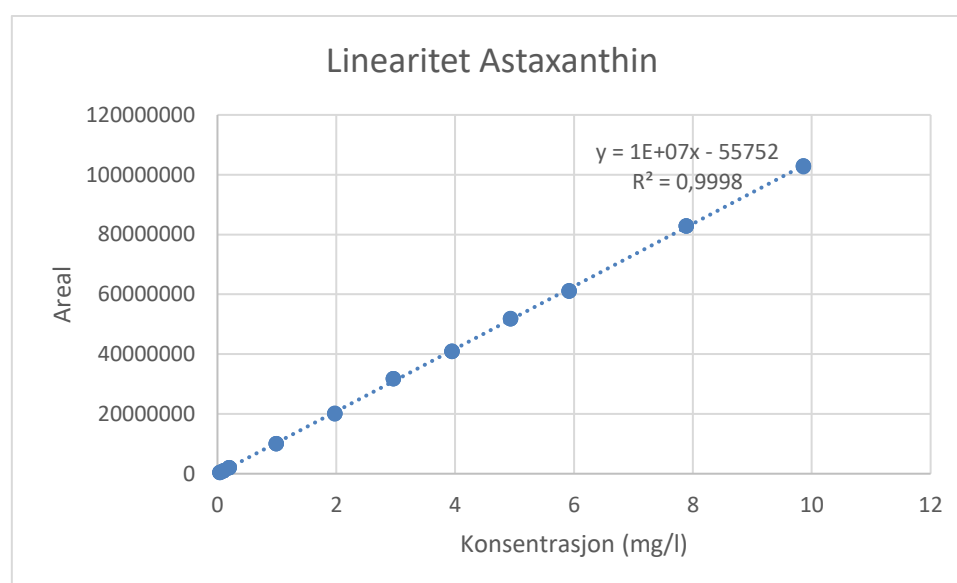
Dato	Resultat 1	Resultat 2	Diff	Diff <sup>2</sup>	Snitt	Antall, n
16.11.2018	48,3	48,944	-0,64	0,4147	48,62	1
16.11.2018	48,576	49,093	-0,52	0,2673	48,83	2
16.11.2018	48,122	49,778	-1,66	2,7423	48,95	3
16.11.2018	48,761	49,06	-0,30	0,0894	48,91	4
16.11.2018	49,162	48,256	0,91	0,8208	48,71	5
05.12.2018	42,703	43,778	-1,08	1,1556	43,24	6
05.12.2018	42,907	43,71	-0,80	0,6448	43,31	7
05.12.2018	43,821	43,821	0,00	0,0000	43,82	8
05.12.2018	44,18	44,062	0,12	0,0139	44,12	9
05.12.2018	43,386	44,368	-0,98	0,9643	43,88	10
11.12.2018	45,425	45,473	-0,05	0,0023	45,45	11
11.12.2018	45,06	45,466	-0,41	0,1648	45,26	12
11.12.2018	45,377	44,782	0,60	0,3540	45,08	13
11.12.2018	44,477	46,167	-1,69	2,8561	45,32	14
11.12.2018	45,601	44,941	0,66	0,4356	45,27	15
<b>n=</b>	<b>15</b>	<b>SUM D<sup>2</sup>=</b>	<b>10,926</b>	<b>Snitt=</b>	<b>45,92</b>	
<b>Reproduserbarhet</b>				<b>Repeterbarhet</b>		
Gjennomsnitt:		45,92		Sr = ROT(SUM(D*D)/2K)		0,6035
Standardavik:		2,2305		r = 2.8 * Sr		1,7069
Alarmgrenser:		3,1544				
Aksjonsgrenser:		4,7316		<b>Differanse</b>		
<b>+3s</b>		50,6502		Alarmgrenser +/-:		1,7069
<b>+2s</b>		49,0730		Aksjonsgrenser +/-:		2,5604
<b>Midtlinje</b>		<b>45,9186</b>				
<b>+2s</b>		42,7642				
<b>+3s</b>		41,1870				

## Vedlegg 4 – Linearitet

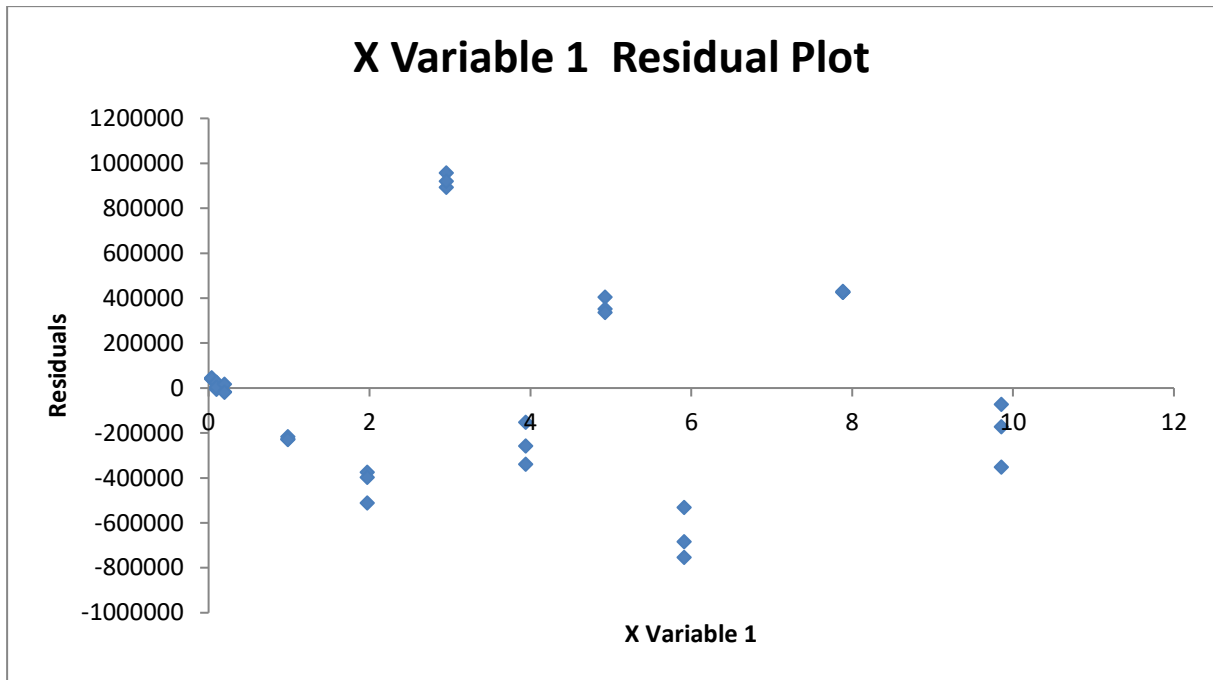
Tabell 7 En oppsummering av arealer for analyser av forskjellige fortynninger av stamløsning (19,71 mg/l) (for undersøkelse av linearitet).

Kons. (mg/l)	Areal			Snitt	%RSD
0,039	396 446	402 119	399 378	399 314	0,71
0,099	999 692	968 533	978 705	982 310	1,62
0,197	1 987 618	2 021 971	1 986 216	1 998 602	1,01
0,986	10 024 225	10 033 518	10 021 123	10 026 289	0,06
1,971	20 183 172	20 159 074	20 045 975	20 129 407	0,36
2,957	31 820 782	31 757 669	31 784 398	31 787 616	0,10
3,942	41 018 131	40 912 347	40 830 633	40 920 370	0,23
4,928	51 881 520	51 829 402	51 813 776	51 841 566	0,07
5,913	61 251 761	61 099 929	61 030 520	61 127 403	0,19
7,884	82 822 911	82 822 141	82 826 628	82 823 893	0,00
9,855	102 937 129	102 658 372	102 838 254	102 811 252	0,14

Nedenfor presenteres figurer og statistikk for måleområdet 0,04-9,86 mg/l.



Figur 1 Linearitetsforsøk fra 0,04-9,86 mg/l.



Figur 2 Residualplott for 0,04-9,86 mg/l.

Tabell 8 Regresjonsstatistikk for måleområdet 0,04-9,86 mg/l. Som vist i tabellen er metoden/instrumentet lineært i hele måleområdet (samme argumentasjon som i kapittel 2.3).

Parameter	Regresjon	Skjæringspunkt	Stigningstall
Observasjoner (n)	33		
R <sup>2</sup> -verdi	0,99983		
F-verdi	191162		
t-verdi		-0,491	437,2
p-verdi		0,627	2,55×10 <sup>-60</sup>
Nedre 95 % konfidensintervall		-287256	10409450746
Øvre 95 % konfidensintervall		175752	10507020292



