

Validering av ny destillasjonsenhet for analyse av total flyktig nitrogen

Gunnhild Hovde





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

Nofima har om lag 350 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-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

		ISBN: 978-82-8296-285-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-286-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Validering av ny destillasjonsenhet for analyse av total flyktig nitrogen		<i>Rapportnr.:</i> 17/2015
		<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Gunnhild Hovde		<i>Dato:</i> 17. april 2015
<i>Avdeling:</i> BioLab		<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 6+5
<i>Oppdragsgiver:</i> Nofima AS - Bergen		<i>Oppdragsgivers ref.:</i>
<i>Stikkord:</i> Validering, Kjeldahl destillasjonsenhet, total flyktig nitrogen		<i>Prosjektnr.:</i> 11277
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Det ble utført en validering av ny Kjeldahl destillasjonsenhet for analyse av total flyktig nitrogen (A 05). Den nye enheten erstatter en gammel, og det er ingen endringer i metodens prinsipp. Instrumentet er godkjent med gyldighetsdato fra 13. april 2015.</p>		
<i>English summary/recommendation:</i> <p>It was conducted a validation of a new Kjeldahl distillation unit for analysis of total volatile nitrogen (A 05). The new unit replaces an old, and there are no changes in the method principle. The instrument is approved with validity from April 13th 2015.</p>		

Innhold

1	Grad av verifisering	1
2	Validering	2
2.1	Riktighet.....	2
2.1.1	Reanalyse av ringtestprøver.....	2
2.1.2	Analyse av ammoniumsulfat	3
2.2	Presisjon	3
2.3	Blankverdier.....	4
3	Konklusjon	5
4	Litteratur	6
	Vedlegg 1 - Valideringsplan	ii
	Vedlegg 2 - Riktighet	iii
	Vedlegg 3 - Presisjon	iv
	Vedlegg 4 - Blankverdier	v

1 Grad av verifisering

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).

Den aktuelle metoden (A 05) blir benyttet til akkrediterte analyser av total flyktig nitrogen (TFN). Metoden har metodereferanse AOAC 920.03 («Nitrogen (Ammoniacal) in Fertilizers»). Det nye instrumentet erstatter et gammelt instrument, og det er ingen endringer i metodens prinsipp. Det er heller ingen endringer i prøvematrisen.

2 Validering

Valideringsplanen er vist i vedlegg 1.

2.1 Riktighet

2.1.1 Reanalyse av ringtestprøver

Det ble gjort en reanalyse av fem tidligere analyserte ringtestprøver fra AOCS (American Oil Chemists' Society). Det ble beregnet E_n -verdi («Error normalized»-verdi) i henhold til formel 2.1.

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

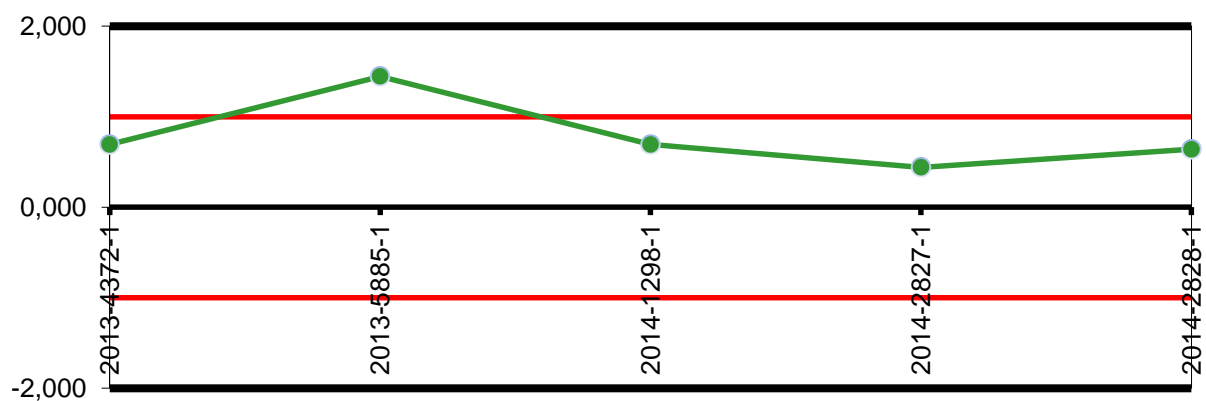
X er middelverdien som ble oppnådd ved analysen, X_{SLP} er ringtestarrangørens beste estimat på sann verdi av analytten i prøven, U_X og U_{SLP} er utvidet måleusikkerhet (to ganger standardavviket, u) for henholdsvis X og X_{SLP} . n er antall laboratorier som deltok i ringtesten. Den ideelle E_n -verdien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

Resultatene av reanalysen er oppgitt i Tabell 1. Fullstendig datamateriale er gitt i vedlegg 2. Opprinnelig resultat og E_n -verdi er også oppgitt i denne tabellen, det vil si resultatet som ble rapportert til AOCS.

Tabell 1 Reanalyse av fem tidligere analyserte ringtestprøver fra AOCS. Opprinnelig resultat og E_n -verdi er også oppgitt.

Prøvenummer	2013-4372-1	2013-5885-1	2014-1298-1	2014-2827-1	2014-2828-1
Prøvetype	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel	Fiskemel
Resultat, X (%)	0,12	0,12	0,12	0,087	0,090
u_X	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Middelverdi, X_{SLP} (%)	0,11	0,09	0,11	0,08	0,08
Antall deltakere, n	12	14	12	10	11
u_{SLP}	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02
E_n -verdi	0,694	1,444	0,694	0,441	0,641
Opprinnelig resultat (%)	0,13	0,11	0,12	0,09	0,09
Opprinnelig E_n -verdi	1,006	0,996	0,694	0,741	0,391

E_n -verdiene er plottet grafisk i Figur 1.



Figur 1 E_n -verdiene fra reanalysene av ringtestene plottet grafisk. De røde linjene viser grensen mellom akseptabelt og betenkelig område for E_n -verdiene (± 1).

Alle E_n -verdier ligger innenfor det akseptable området (<1) med unntak av en ringtest. Denne ligger i det betenkelige området, men resultatet ville vært godkjent av ringtestarrangøren (Z -score = 1). Man ser systematisk høye E_n -verdier, slik man også gjorde på gammel destillasjonsenhet. Metodereferansen (AOAC 920.03) er lite detaljert når det gjelder blant annet destillasjonstid og det kan derfor tenkes at det systematiske avviket skyldes metodeforskjeller. Nofima BioLab defineres ikke som uteligger av arrangøren. Generelt kan det sies at riktigheten basert på ringtestene er god.

2.1.2 Analyse av ammoniumsulfat

Det ble analysert to paralleller av ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (MERCK 1.01217.0100). Saltet ble veid inn som en ordinær prøve og analysert som beskrevet i metoden. Resultatene er oppgitt i vedlegg 2. Nitrogeninnholdet i saltet ble beregnet til 21,09 % ved å ta hensyn til saltets renhet (oppgitt på beholderen til $\geq 99,5$ %). De to parallellene ga et snittresultat for total flyktig nitrogen på 20 % (RSD = 1,5 %). Dette gir en gjenvinningsfaktor på 94,8 %. Dette er noe lavere enn forventet utbytte (98-102 %) ved dette konsentrasjonsnivået (NMKL 2012), men betraktes likevel som akseptabelt i og med at metodens måleusikkerhet er oppgitt til 11 %.

2.2 Presisjon

Presisjon beskriver overensstemmelsen mellom uavhengige testresultater oppnådd på samme måte under spesifikke forhold. Det ble gjort en presisjonsberegning for de ringtestene som ble analysert i forbindelse med valideringen og for analyser av kontrollprøven (fiskemel). Presisjonen ble bestemt ved å beregne repeterbarhetsgrensen (r). Repeterbarhetsgrensen defineres som den absolutte forskjellen mellom to uavhengige enkeltresultater oppnådd ved bruk av den samme metoden på identiske prøver på samme laboratorium med samme utstyr i løpet av en kort tidsperiode. Den absolutte forskjellen mellom enkeltresultatene vil i ikke mer enn 5 % av tilfellene overskride repeterbarhetsgrensen (ISO 1994). Formel 2.2 viser beregning av r .

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

t er den tosidige Student t -verdien ved 95 % konfidensintervall. S_r er standardavviket for repeterbarheten og beregnes som vist i formel 2.3.

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}} \quad (2.3)$$

x_i og y_i er to målinger i en dobbeltbestemmelse og n er antall par av dobbeltbestemmelser (NMKL 2009). Hvis man antar at antall frihetsgrader for t går mot uendelig så er $t=1,96$, og man benytter den forenklete versjonen av formel 2.2 for beregning av r :

$$r = 2,8 \times S_r \quad (2.4)$$

Presisjonsberegningen for denne valideringen er vist i vedlegg 3, og repeterbarhetsgrensen ble beregnet til 0,005 (1,4 % RSD), noe som anses som god presisjon og godt innenfor hva som anses som akseptabel repeterbarhet (NMKL 2009). For nytt instrument som bør ha tilnærmet lik effekt på alle kokeplater er dette som forventet.

2.3 Blankverdier

Det ble gjort en analyse av seks blankprøver for tre av analytikerne som er godkjent for metoden. To av analytikerne analyserte blankprøver både på ny og gammel destillasjonsenhet.

Resultatene er vist i vedlegg 4 og en oppsummering er vist i Tabell 2.

Tabell 2 Analyse av blankprøver utført av tre analytikere.

Analytiker	JSJ	LR	ØH	Snitt, alle
Resultat, ny enhet (ml), n=6	21,323	21,223	21,163	21,236
% RSD	0,077	0,136	0,283	
Resultat, gammel enhet (ml), n=6	21,263	21,188		
% RSD	0,264	0,160		

Forskjellene mellom analytikerne er små og akseptable. Det er også små forskjeller mellom ny og gammel destillasjonsenhet.

3 Konklusjon

Basert på denne valideringen er instrumentet gyldig fra og med 13. april 2015. Analyser av ringtester og ammoniumsulfat viser at instrumentet har akseptabel riktighet. Presisjonsberegningen viste at instrumentets repeterbarhet også er godt innenfor hva som anses som akseptabelt.

4 Litteratur

ISO (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions (ISO 5725-1), ISO (International Organization for Standardization): 17.

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.

NMKL (2012). NMKL-Procedur nr. 25 - Utbyte (Recovery) vid kemiska analytiska mätningar, NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler): 30.

VEDLEGG

Vedlegg 1 - Valideringsplan	ii
Vedlegg 2 - Riktighet	iii
Vedlegg 3 - Presisjon	iv
Vedlegg 4 - Blankverdier	v

Vedlegg 1 - Valideringsplan

Instrumentet erstatter gammel Kjeldahl destillasjonsenhet. Samme måleprinsipp.

Analysemetode	A05 Total flyktig nitrogen
Metodeansvarlig	AB
Metodereferanse	AOAC, 920.03
Prøvetype (matrise)	Fisk, fiskemel og fôr
Måleområde	0,010-1,0 %
Grad av ekstern validering	Metoden er eksternt validert i en kollaborativ metodeavprøving
Valideringsomfang	Verifisering av riktighet og presisjon, samt optimalisering av bruk av utstyr.

[illegible]

Vedlegg 2 - Riktighet

Tabell 1 Reanalyse av fem tidligere analyserte ringtestprøver fra AOCS.

Prøvenr.	Dato	Innveid prøve (g)	Normalitet NaOH	Titrvolum, blindprøve (ml)	Titrvolum, prøve (ml)	% TFN	Gjennomsnitt
2013-4372-1	23.03.15	5,0	0,1019	21,22	17,005	0,1199	0,12
		5,0	0,1019	21,22	17,095	0,1177	
2013-5885-1	05.03.15	5,0	0,1016	21,49	17,435	0,1154	0,12
		5,0	0,1016	21,49	17,405	0,1162	
2014-1298-1	05.03.15	5,0	0,1016	21,49	17,135	0,1239	0,12
		5,0	0,1016	21,49	overtitrert	-	
2014-2827-1	23.03.15	5,0	0,1019	21,22	18,175	0,0869	0,087
		5,0	0,1019	21,22	18,165	0,0872	
2014-2828-1	05.03.15	5,0	0,1016	21,49	18,350	0,0893	0,090
		5,0	0,1016	21,49	18,270	0,0916	

Tabell 2 Analyse av ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄).

Prøve	Dato	Innveid prøve (g)	Normalitet NaOH	Titrvolum, blindprøve (ml)	Titrvolum, prøve (ml)	% TFN	Gjennomsnitt
Ammoniumsulfat	13.04.15	0,0289	0,1016	21,19	17,085	20,2184	20
		0,0274	0,1016	21,19	17,380	19,7928	

Vedlegg 3 - Presisjon

Tabell 3 Beregning av repeterbarhetsgrense for ringtester og kontrollprøver (fiskemel) analysert i forbindelse med valideringen.

Prøve	Analysedato	Resultat 1	Resultat 2	Diff.	Diff^2	Snitt	Antall, n
2013-4372-1	23.03.15	0,1199	0,1177	0,00	0,0000	0,12	1
2013-5885-1	05.03.15	0,1154	0,1162	0,00	0,0000	0,12	2
2014-2827-1	23.03.15	0,0869	0,0872	0,00	0,0000	0,09	3
2014-2828-1	05.03.15	0,0893	0,0916	0,00	0,0000	0,09	4
KP8	06.03.15	0,1624	0,1646	0,00	0,0000	0,16	5
KP8	06.03.15	0,1679	0,1629	0,01	0,0000	0,17	6
KP8	06.03.15	0,1622	0,1671	0,00	0,0000	0,16	7
KP10	23.03.15	0,1570	0,1580	0,00	0,0000	0,16	8
KP10	19.03.15	0,1508	0,1496	0,00	0,0000	0,15	9

$n=$ SUM $D^2=$ 0,000 Snitt= 0,13

Reproduserbarhet		Repeterbarhet	
Gjennomsnitt:	0,13	$S_r = \text{ROT}(\text{SUM}(D \cdot D)/2K)$	0,002
Standardavvik:	0,032	% RSD	1,4
		$r = 2.8 \cdot S_r$	0,005

Vedlegg 4 - Blankverdier

Tabell 4 Analyser av blankprøver utført av forskjellige analytikere. To av analytikerne analyserte også blankprøver på gammel destillasjonsenhet.

Blank, nr.	ØH	JSJ, gammel	JSJ, ny	LR, gammel	LR, ny
1. titr.volum (ml)	21,145	21,345	21,325	21,205	21,235
2. titr.volum (ml)	21,090	21,315	21,345	21,210	21,255
3. titr.volum (ml)	21,210	21,195	21,315	21,200	21,190
4. titr.volum (ml)	21,105	21,245	21,305	21,195	21,225
5. titr.volum (ml)	21,190	21,245	21,340	21,200	21,185
6. titr.volum (ml)	21,240	21,230	21,310	21,120	21,245
Gjennomsnitt (ml)	21,163	21,263	21,323	21,188	21,223
Standardavvik (ml)	0,060	0,056	0,016	0,034	0,029
% RSD	0,283	0,264	0,077	0,160	0,136

