

# Valideringsrapport

Analyse av totale aminosyrer (BIOLAB A42) ved bruk av 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



#### 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> 4/2023	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-739-6	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 8. februar 2023	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 43 + 13	<i>Prosjektnummer:</i> 11277
<i>Tittel:</i> <b>Valideringsrapport: Analyse av totale aminosyrer (BIOLAB A42) ved bruk av Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra</b>		
<i>Title:</i> Validation report: Analysis of total amino acids (BIOLAB A42) using Waters ACQUITY UPLC/Waters AccQ•Tag Ultra		
<i>Forfatter(e):</i> Gunnhild Gjengedal og Ida Anette Vestvik		
<i>Avdeling:</i> Biolab		
<i>Oppdragsgiver:</i> Intern		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> -		
<i>Stikkord:</i> Validering, aminosyrer, UPLC		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Det ble validert et nytt instrument (Waters ACQUITY UPLC) for metoden BIOLAB A42 Totale aminosyrer. Selektivitet, linearitet, presisjon og riktighet ble validert, og måleområde og måleusikkerhet ble vurdert. Valideringen demonstrerte at ytelsen til instrumentet er god og som forventet. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser av fôr, fôringredienser, fisk og fiskefeces fra og med 31. januar 2023.		
<i>English summary/recommendation:</i> A new instrument (Waters ACQUITY UPLC) was validated for the method BIOLAB A42 Total amino acids. Selectivity, linearity, precision, and accuracy were validated, and measurement range and measurement uncertainty were assessed. The validation demonstrated that the performance of the instrument is good and as expected. The report has been reviewed by Norwegian Accreditation and the instrument has been approved for accredited analyses of feed, feed ingredients, fish and fish faeces as of January 31th 2023.		

## Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teori</b>	<b>2</b>
2.1	Prinsipp	2
2.2	Grad av validering	3
2.3	Avvik fra metodereferansen	4
2.4	Valideringsparametre	4
2.4.1	Selektivitet	4
2.4.2	Linearitet	4
2.4.3	Presisjon	5
2.4.4	Riktighet/nøyaktighet	6
2.4.5	Måleområde	7
2.4.6	Måleusikkerhet	7
<b>3</b>	<b>Eksperimentelt</b>	<b>8</b>
3.1	Selektivitet	8
3.2	Linearitet	8
3.3	Presisjon	8
3.4	Riktighet	9
<b>4</b>	<b>Resultater og diskusjon</b>	<b>10</b>
4.1	Selektivitet	10
4.2	Linearitet	12
4.3	Presisjon	32
4.3.1	Repeterbarhet	32
4.3.2	Intern reproduserbarhet	34
4.3.3	Instrumentets presisjon	37
4.4	Riktighet	38
4.4.1	Kontrollprøve	38
4.4.2	Sammenlignende laboratorieprøving	40
<b>5</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Referanser</b>	<b>43</b>
	<b>Vedlegg 1 – Linearitet</b>	<b>II</b>
	<b>Vedlegg 2 – Rådata</b>	<b>V</b>
	<b>Vedlegg 3 – Instrumentets presisjon</b>	<b>XI</b>

## 1 Innledning

Det ble validert et nytt instrument for metoden BIOLAB A 42 Totale aminosyrer, en Waters ACQUITY UPLC (ultra performance liquid chromatography) I-Class PLUS med fluorescens- og UV-detektor. Instrumentet erstatter en HPLC (high performance liquid chromatography) av typen Waters Alliance 2695 separasjonsmodul med Waters 2475 fluorescensdetektor og Waters 2487 UV-detektor. Det er fluorescensdetektoren som brukes til totale aminosyrer.

I forbindelse med bytte av instrument endres også applikasjonen fra Waters AccQ•Tag (Waters-Corporation 1994) til Waters AccQ•Tag Ultra (Waters-Corporation 2007). Prinsippet for de to applikasjonene er det samme: Pre-kolonnederivatisering med 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Det benyttes også samme type kolonne (C18), men med annen partikkelstørrelse og dimensjon. Det benyttes andre eluenter og en annen intern standard (norvalin i stedet for norleucin), fordi norleucin overlapper med fenylalanin i kromatogrammet. En oppsummering av metodeforskjellene er gitt i Tabell 1.

Tabell 1 En oppsummering av forskjellene mellom Waters AccQ•Tag og Waters AccQ•Tag Ultra.

Metode	HPLC, AccQ•Tag	UPLC, AccQ•Tag Ultra
Instrument	Waters Alliance 2695 separasjonsmodul, 2475 fluorescensdetektor, 2487 UV-detektor	Waters ACQUITY UPLC I-Class PLUS med fluorescens- og UV-detektor
Kolonne	AccQ•Tag, 3,9x150 mm, C18, 4 µm	AccQ•Tag Ultra, 2,1x100mm, C18, 1,7 µm
Eluent A	Vann, natriumacetat, ortofosforsyre, trietylamin, dinatrium-EDTA	80-90 % vann, 5-10 % acetonitril, 3-7 % maursyre, 1-5 % ammoniumformat (eksakt sammensetning er ikke oppgitt)
Eluent B	100 % acetonitril	97,2 % acetonitril, 1,8 % maursyre, 1,0 % vann
Eluent C	Vann	-
Intern standard	L-Norleucin	L-Norvalin
Derivatiseringsreagens*	AccQ•Fluor™ Reagens (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)	AccQ•Tag™ Ultra Reagens (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)
Deteksjon (bølgelengder, Ex./Em.) (nm)	250/395	266/473

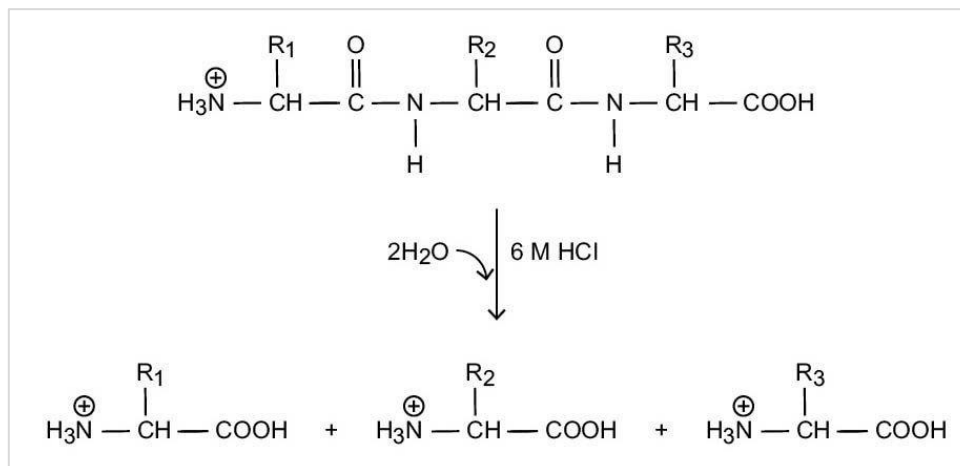
\*Samme reagens, kun nytt navn og annen kvalitetskontroll

Valideringsparametere som er omfattet av denne valideringen er: Selektivitet, linearitet, presisjon og riktighet, samt en vurdering av måleområde og måleusikkerhet.

## 2 Teori

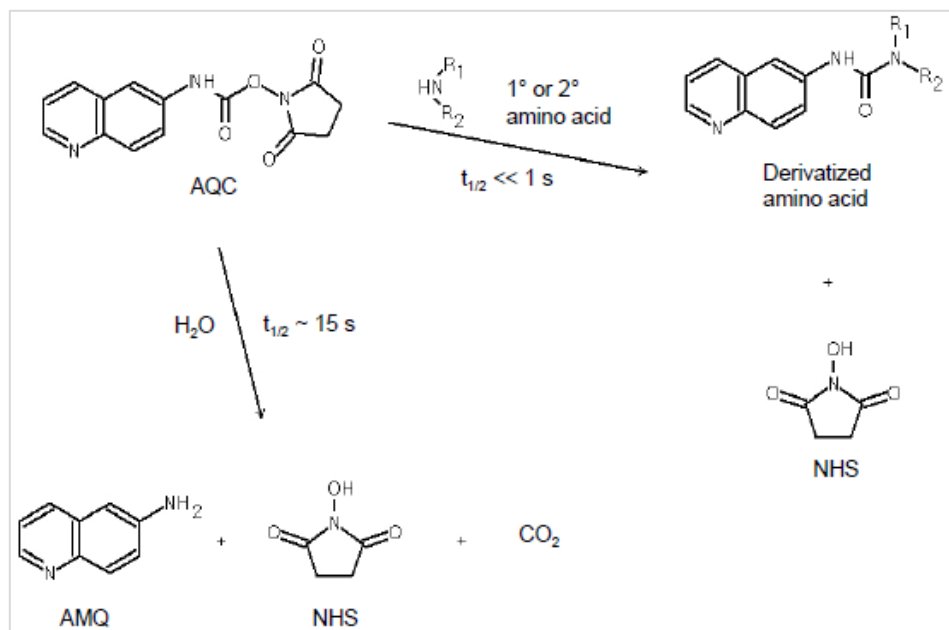
### 2.1 Prinsipp

Proteinet hydrolyseres med 6 M HCl i 22 timer ved 110 °C i varmeskap. Aminosyrene blir frigjort under hydrolysen ved spalting av peptidbindinger og tilførsel av et vannmolekyl til hver peptidbinding, som vist i Figur 1 (Waters-Corporation 2022).



Figur 1 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 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 (CO<sub>2</sub>) (Waters-Corporation 2007).



Figur 2 Reaksjon mellom AQC og primære og sekundære aminosyrer, samt hydrolyse av overskuddet av AQC til AMQ, NHS og CO<sub>2</sub> (Waters-Corporation 2007).

AMQ gir en signifikant topp som er lett oppløselig kromatografisk. NHS og CO<sub>2</sub> påvirker ikke analysen (Waters-Corporation 2007).

## 2.2 Grad av validering

Metoden A42 omfatter de 18 aminosyrene vist i Tabell 2. Alle disse er akkreditert, med unntak av hydroksyprolin og norvalin (sistnevnte brukes som intern standard). Samtlige aminosyrer skal valideres. I tillegg nevnes cysteinsyre (Cya) og cystin (Cys2), som er til stede i kalibreringsstandardene og dermed i kromatogrammene, men som omfattes av en egen metode/metodevalidering (ikke akkreditert).

Tabell 2 Enkeltkomponenter/aminosyrer som skal valideres.

Forkortelse	Aminosyre
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparagin/asparaginsyre
Glu	Glutamin/glutaminsyre
Gly	Glycin
His	Histidin
H-Pro	Hydroksyprolin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Metionin
Norval/Nor	Norvalin (intern standard)
Phe	Fenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

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

## 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 Tabell 3.

Tabell 3 Avvik fra metodereferansen (Waters-Corporation 2007).

Parameter	Waters 2007, UPLC Amino Acid Analysis Solution System Guide	BIOLAB A42 Totale aminosyrer	Kommentar
Blandingsforhold eluent A-konsentrat + vann	1 del eluent A-konsentrat + 19 deler vann	1 del eluent A-konsentrat + 10 deler vann	Sikrer god separasjon, særlig for Cya/H-Pro
Gradient	Trinn 8 i gradienten starter på 8,73 min	Trinn 8 i gradienten starter på 9,00 min	Utvaskingstrinn, forlenget tiden fordi alle aminosyrer ikke hadde eluert før løsemiddeltopp
Kolonnetemperatur	55 °C	43 °C	Sikrer god separasjon, særlig for Cya/H-Pro
Run time	9,5 min	10 min	Sikre god utvasking før neste injeksjon + trinn 8 forlenget
Holdbarhet eluent A og B, åpnet flaske	1 måned	6 måneder	Erfaring har vist at eluentene er holdbare lengre enn en måned ved oppbevaring i kjøleskap. Innen 6 måneder vil innholdet i flaskene være brukt.

## 2.4 Valideringsparametre

### 2.4.1 Selektivitet

Selektivitet uttrykker hvorvidt en metode kan bestemme de ønskede analyttene under gitte betingelser i nærvær av andre komponenter med lignende egenskaper. I kromatografiske metoder er man opptatt av separasjonselektivitet, det vil si hvor godt analyttene er separert fra hverandre og eventuelle interfererende forbindelser (Vessmann 2001).

### 2.4.2 Linearitet

Linearitet undersøkes ved bruk av regresjonsanalyse og minste kvadraters metode. Den regresjonslinjen som passer datasettet best, finner man ved å se på de minst mulige arealene av kvadratavvikene mellom det observerte punktet og den estimerte kurven. Regresjonslinjen har formelen  $y=mx + b$ , der  $m$  er stigningstallet og  $b$  er skjæringspunktet med  $y$ -aksen. Denne linjen skal ha regresjonskoeffisient nær 1. Ved å bruke datanalyseverktøyet i Microsoft Excel kan det gjøres signifikanstester for å sjekke om kurven virkelig er lineær. En ser her på  $t$ - og  $p$ -verdi for  $m$  og  $b$ :  $t$  bør være høy og  $p$  lav ( $<<0,05$ ) for  $m$ , mens for  $b$  bør  $t$  være lav og  $p>0,05$ . 95 % konfidensintervallet for  $b$  bør vise at null er en mulig verdi. I tillegg til signifikanstestene lages det residualplott som gir en grafisk framstilling av residualene, dvs. forskjellen mellom den observerte responsen og responsen beregnet fra regresjonslinjen. Residualene bør ha en tilfeldig distribusjon når de plottes mot  $x$ -variabelen (i dette tilfellet konsentrasjon).  $F$ -verdien fra  $F$ -fordelingen (forholdet mellom kvadratsummen av regresjonen og kvadratsummen av residualene) bør være høy, dvs. at punktene med 95% sannsynlighet ikke er tilfeldig spredd, men at lineær regresjon er berettiget (Løvås 2005).

Siden dette er en intern standard-metode sjekkes ikke linearitet jevnlig, men kun som en del av valideringen.



### 2.4.3 Presisjon

Presisjon beskriver samsvaret mellom uavhengige analyseresultater oppnådd på nøyaktig samme måte under spesifikke forhold, eller med andre ord: Hvor forskjellige resultatene er fra hverandre. Presisjon uttrykkes vanligvis som repeterbarhet, reproduserbarhet eller som en mellomting av disse: «intermediate precision»/intern reproduserbarhet. Sistnevnte representerer tilfeldig variasjon på samme laboratorium. Forskjellen mellom de ulike presisjonsestimaterne er gitt i Tabell 4 (Douglas A. Skoog 2004, NMKL 2009, Hovind, Magnusson et al. 2011).

Tabell 4 Oppsummering av de forskjellige typene presisjonsestimater (Douglas A. Skoog 2004, NMKL 2009, Hovind, Magnusson et al. 2011).

Presisjonsestimater	Betingelser
Repeterbarhet	Samme laboratorium Samme analytiker Samme utstyr Kort tidsintervall
«Intermediate precision»/ intern reproduserbarhet	Samme laboratorium Forskjellige analytikere Forskjellig utstyr (i den grad det er mulig) Lengre tidsintervall
Reproduserbarhet	Forskjellige laboratorier Forskjellig analytiker Forskjellig utstyr

Repeterbarhetsgrensen,  $r$ , kan beregnes ved bruk av formel 2.1.

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

der  $t$  er den tosidige  $t$ -verdien ved 95 % konfidensintervall og  $s_r$  er standardavviket til repeterbarheten. Dersom det antas at antall frihetsgrader går mot uendelig og at  $t=1,96$  vil  $r$  beregnes som vist i formel 2.2 (ISO 1994a, ISO 1994b).

$$r = 2,8 \times s_r \quad (2.2)$$

Standardavviket til repeterbarheten,  $s_r$ , beregnes som vist i formel 2.3.

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

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

Repeterbarhetsgrensen forteller hvor mye to analyseresultater produsert under repeterbarhetsbetingelser kan variere før de anses som signifikant forskjellige.

Intern reproduserbarhet kan beregnes på samme måte. I denne rapporten er  $R$  brukt som «intern reproduserbarhets-grense» og tilsvarende er  $s_R$  brukt for standardavviket til den interne reproduserbarheten.

#### 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. Biolab deltar jevnlig i SLP for metoden.

I denne metodevalideringen analyseres tre tidligere mottatte SLP-prøver; to prøver fra Masterlab (fiskemel og fiskefôr) og en prøve fra AAFCO (Association of American Feed Control Officials) (dyrefôr, «chick starter»). De rapporterte nivåene av aminosyrer i de tre prøvene er vist i Tabell 5.

Tabell 5 Rapporterte nivåer av aminosyrer i SLP-prøver oppgitt i g/100 g prøve. u=usikkerhet angitt av SLP-arrangør og n=antall deltakere.

Referansnr./ prøvetype (j.nr. Biolab)	10-0313/Fish meal (BG-2022-38-1)			06-2813/Fish feed (BG-2022-39-1)			202225/Chick starter, medicated, (BG-2022-763-1)		
	Ref.verdi	u	n	Ref.verdi	u	n	Ref.verdi	u	n
Ala	4,18	0,29	14	2,06	0,21	12	1,03	0,04	25
Arg	4,16	0,29	14	2,14	0,21	12	1,22	0,06	26
Asp	6,65	0,47	14	2,59	0,21	12	1,74	0,08	26
Glu	9,54	0,67	14	7,93	0,55	12	3,16	0,16	26
Gly	3,86	0,27	14	2,83	0,21	12	1,13	0,05	25
His	1,48	0,22	14	0,84	0,13	12	0,47	0,04	25
H-Pro	2,99	0,21	13	1,51	0,21	12	0,72	0,05	25
Ile	5,16	0,36	14	2,73	0,21	12	1,47	0,06	25
Leu	5,7	0,4	14	3,63	0,25	12	0,97	0,08	27
Lys	2,1	0,21	14	1,04	0,16	12	0,29	0,03	27
Met	2,89	0,21	14	1,66	0,21	12	0,85	0,05	25
Phe	2,66	0,21	14	3,34	0,23	12	1,19	0,05	24
Pro	2,9	0,21	14	1,92	0,21	12	0,87	0,06	25
Ser	2,93	0,21	14	1,52	0,21	12	0,70	0,03	26
Thr	2,43	0,21	13	1,19	0,18	12	0,60	0,06	22
Tyr	3,44	0,24	14	1,86	0,21	12	0,87	0,05	25

#### Bias

Ved sammenligning med SLP eller referansemateriale er det vanlig å beregne bias, som er forskjellen mellom den observerte gjennomsnittsverdien ( $\bar{x}$ ) og referanseverdien ( $x_0$ ), og angir om den systematiske analytiske feilen er signifikant. Relativ bias kan beregnes som vist i formel 2.4 (Linsinger 2008, NMKL 2012, Magnusson and Örnemark 2014).

$$b\% = \frac{\bar{x} - x_0}{x_0} \times 100 \quad (2.4)$$

For å avgjøre om bias er statistisk signifikant benyttes t-test hvor t beregnes som vist i formel 2.5 (NMKL 2012).

$$t = \frac{|\bar{x} - x_0|}{s/\sqrt{n}} \quad (2.5)$$

der s er standardavviket til observasjonene og n er antall replikater. Bias er statistisk signifikant dersom observert t er høyere enn  $t_{\text{kritisk}}$  (tabellverdi, tosidig, 95 % konfidensintervall, n-1 frihetsgrader) (NMKL 2012).

### Sammenlignende laboratorieprøving (SLP)

For å evaluere resultatene for sammenlignende laboratorieprøving benytter Biolab  $E_n$ -verdi (error normalized value).  $E_n$ -verdi beregnes som vist i formel 2.6.

$$E_n\text{-verdi} = \frac{X - X_{\text{SLP}}}{\sqrt{(U_X)^2 + \left(\frac{U_{\text{SLP}}}{\sqrt{n}}\right)^2}} \quad (2.6)$$

der X er deltakeren sitt resultat og  $X_{\text{SLP}}$  er arrangøren sitt beste estimat på resultatet i prøven,  $U_X$  og  $U_{\text{SLP}}$  er utvidet måleusikkerhet for X og  $X_{\text{SLP}}$ , og n er antall deltakere.  $E_n$ -verdier høyere/lavere enn  $\pm 1$  anses som betenkelige, mens verdier høyere/lavere enn  $\pm 2$  anses som ikke-akseptable. Den ideelle verdien er 0 (ISO 2005, Thompson 2006).

#### 2.4.5 Måleområde

Kvantifiseringsgrense/«Limit Of Quantification» (LOQ) er oppgitt til 50 fmol på kolonnen av en gitt aminosyre. Best kvantifisering fås ved 1 pmol eller høyere på kolonnen. Øvre grense bestemmes av reagensoverskudd og ikke detektoregenskaper. Det anbefalte totale volumet av prøve, buffer og reagens er 100  $\mu\text{L}$ . Maksimum injeksjonsvolum er 1  $\mu\text{L}$  (Waters-Corporation 2007). Biolabs måleområde for reelle prøver er satt til 0,10-20 g/100 g prøve, og konsentrasjonen av aminosyrer på kolonnen vil i alle tilfeller være høyere enn 1 pmol. Det gjøres derfor ikke videre undersøkelser av kvantifiserings- og deteksjonsgrense i denne valideringen.

#### 2.4.6 Måleusikkerhet

Det kan være behov for rekalkulering av metodens totale måleusikkerhet dersom presisjonen for metoden viser seg å være signifikant forskjellig fra tidligere beregnet presisjon. Måleusikkerheten til metoden evalueres årlig i forbindelse med ledelsens gjennomgåelse av kvalitetssystemet, og det er mest fornuftig å avvente rekalkulering av måleusikkerheten til vi har mer data fra SLP. Det gjøres derfor ikke i forbindelse med denne valideringen.

## 3 Eksperimentelt

### 3.1 Selektivitet

Kromatogram fra blankprøver, kalibreringsstandarder og ordinære prøver fra valideringen ble undersøkt for grad av separasjon og for interfererende forbindelser.

### 3.2 Linearitet

Dette er en intern standard-metode og normalt brukes kun en kalibreringsløsning per analyseserie. Kalibreringsløsningen lages ved å fortynne 300 µL hver av 2,5 mM aminosyrestandardblanding, 2,5 mM Nor og 2,5 mM H-Pro- og Cya-løsning med 10 mL vann. Konsentrasjonen i kalibreringsløsningen er da på 0,069 mM for hver aminosyre (før derivatisering). For å sjekke metodens linearitet ble det laget sju standardløsninger som dekker området  $\pm 20\%$  av 0,069 mM.

Det ble laget en aminosyre-stockløsning ved å fortynne 300 µL hver av 2,5 mM aminosyrestandardblanding (Waters Amino Acid Standard H, LOT nr. WJ338134), 2,5 mM Nor og 2,5 mM H-Pro- og Cya-løsning med 1 mL vann. Konsentrasjonen på stockløsningen var 0,395 mM for hver aminosyre.

Videre ble stockløsningen fortynnet som vist i Tabell 6.

Tabell 6 Standarder benyttet i linearitetsforsøk. Konsentrasjonene som er oppgitt er for hver aminosyre.

Standard	Stockløsning (µL)	Vann (µl)	Konsentrasjon (mM)
1	300	1850	0,055
2	300	1670	0,060
3	300	1520	0,065
4	300	1420	0,069
5	300	1300	0,074
6	300	1200	0,079
7	300	1135	0,083

Hver standard ble derivatisert i paralleller med 10 µL standard, 70 µL buffer og 25 µL derivatiseringsreagens (for å sikre nok derivatiseringsreagens til de mest konsentrerte standardene) og analysert på UPLC i tilfeldig rekkefølge.

### 3.3 Presisjon

For beregning av presisjon ble følgende prøvetyper brukt: Soyamel, fiskefôr, fiskefeces og fisk (laks) til beregning av repeterbarhet og intern reproducerbarhet, og fiskemel og dyrefôr («chick starter») til beregning av intern reproducerbarhet.

Alle prøvene ble analysert av to analytikere. Det ble analysert totalt 18 replikater over 3 dager for soyamel, fiskefôr, fiskefeces og fisk, og 6 replikater over 3 dager for fiskemel og dyrefôr.

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

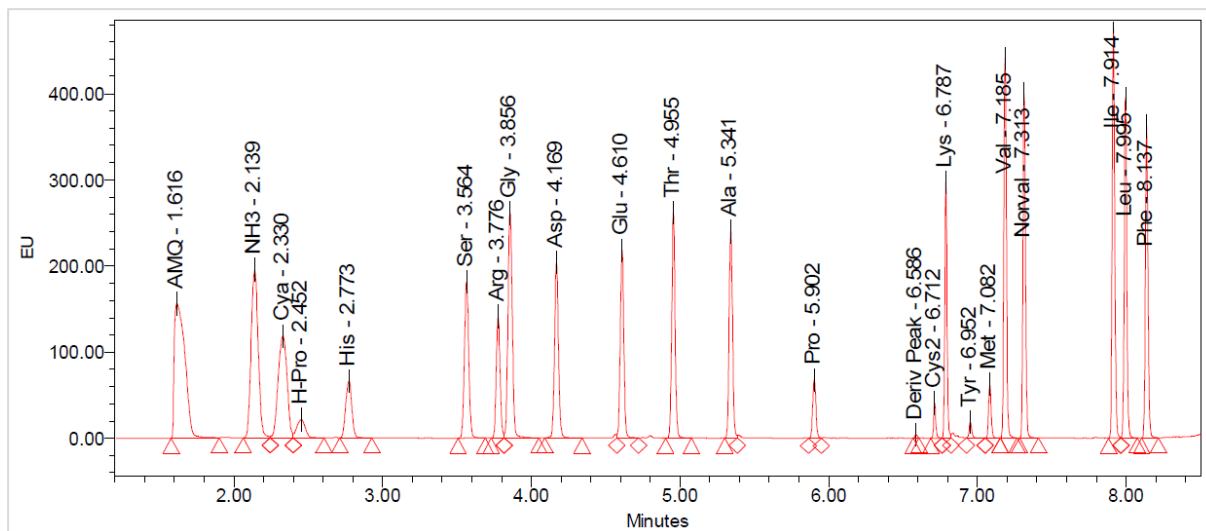
### **3.4 Riktighet**

Fiskemel og dyrefôr ble analysert i 6 replikater over 3 dager og fiskefôr ble analysert i 18 replikater over 3 dager. Analysene ble også brukt i presisjonsberegninger for metoden, se punkt 3.3.

## 4 Resultater og diskusjon

### 4.1 Selektivitet

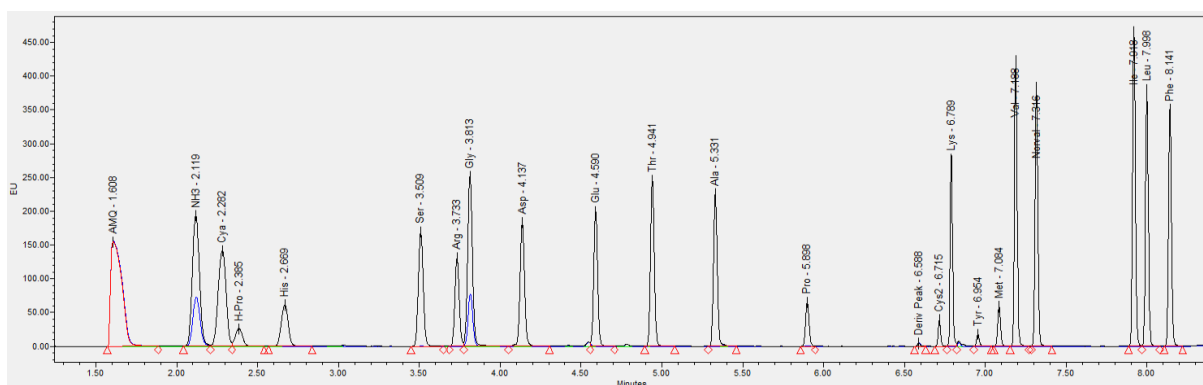
Metoden har blitt optimalisert for våre prøvetyper av Waters Danmark og kromatogrammet viser baselinjeseparasjon eller nær-baselinjeseparasjon for alle aminosyrer. Et eksempelkromatogram for en kalibreringsstandard er vist i Figur 3.



Figur 3 Eksempelkromatogram for en kalibreringsstandard.

Forbindelsene som ikke er baselinjeseparert er Cya/H-Pro, Arg/Gly og Ile/Leu, men disse har under normale betingelser god oppløsning.

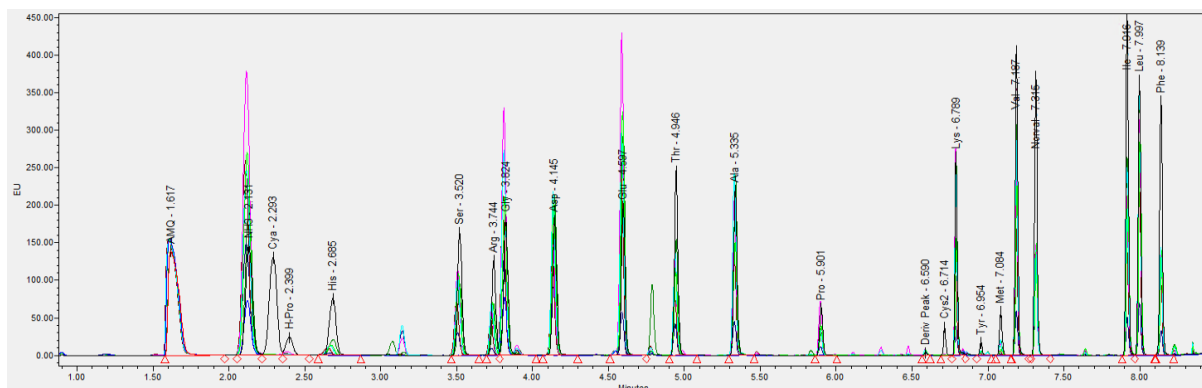
Figur 4 viser overlapp mellom en standard kalibreringsløsning (10 µL standard + 70 µL buffer + 20 µL derivatiseringsreagens), blankprøve (80 µL buffer + 20 µL derivatiseringsreagens) og buffer.



Figur 4 Overlapp mellom kalibreringsstandard (svart), blankprøve (blå) og buffer (grønn).

Figuren viser at det er en signifikant interferens for Gly i blankprøven. Dette skyldes forurensning i derivatiseringsreagensen og er en pågående reklamasjonssak med Waters. Forurensningen er konstant for hvert glass med derivatiseringsreagens, og så lenge vi tilsetter samme mengde standard og prøve vil interferensen være like stor og påvirke arealet til glycintoppen like mye. Linearitetsforsøk og riktighetsforsøk i kapittel 4.2 og 4.4 bekrefter dette. Under normale betingelser skal det ikke være noen forbindelser som overlapper med aminosyrene.

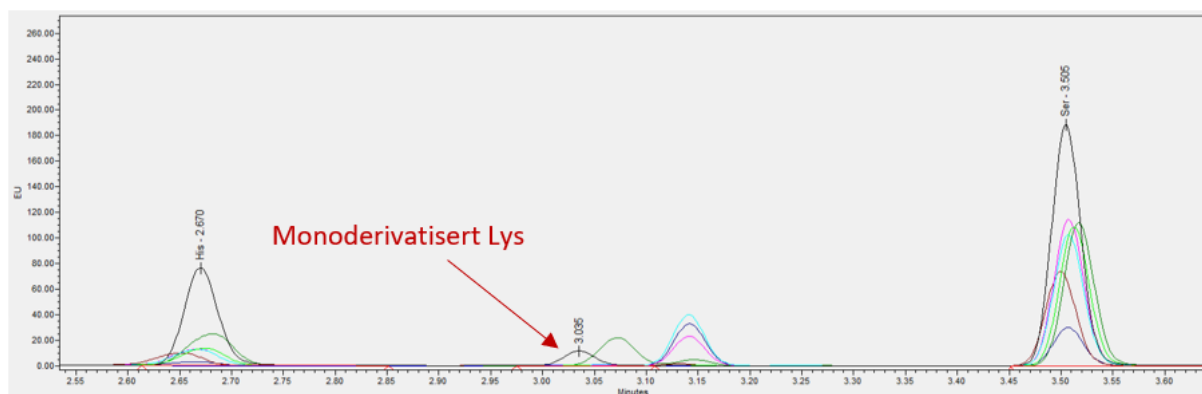
Figur 5 viser overlapp mellom kalibreringsstandard=svart, blankprøve=blå og prøvetyperne testet i denne valideringen (soyamel=lysegrønn, fiskemel=lyseblå/turkis, fiskefôr=rosa, fiskefeces=mørkeblå, fisk=mørkegrønn og dyrefôr/«chick starter»=mørkerød).



Figur 5 Overlapp mellom kalibreringsstandard=svart, blankprøve=blå og prøvetyperne testet i denne valideringen (soyamel=grønn, fiskemel=lyseblå/turkis, fiskefôr=rosa, fiskefeces=mørkeblå, fisk=mørkegrønn og dyrefôr/«chick starter»=mørkerød).

Som vist i figuren er det noen aminosyrer/forbindelser som ikke er identifisert i prøvene (f.eks. mellom His og Ser, mellom Glu og Thr, og mellom Pro og Deriv Peak=overskudd av derivatiseringsreagensen), men disse overlapper ikke med aminosyrene som omfattes av metoden.

Dersom mengden derivatiseringsreagens er for liten vil ikke Lys derivatiseres fullstendig. Dette skyldes at Lys derivatiseres på to steder ( $\alpha$ - og  $\epsilon$ -aminogruppene på sidekjedene), og at det ikke er nok derivatiseringsreagens til å derivatisere mer enn den ene aminogruppen. Monoderivatisert Lys vil vise seg som en ekstra topp mellom His og Ser, og eluerer før den ukjente forbindelsen som vises i noen prøvetyper. Et eksempel er vist i Figur 6, og viser overlapp mellom kalibreringsstandard med for lite derivatiseringsreagens (10  $\mu$ L)=svart, blankprøve=blå og prøvetyperne testet i denne valideringen (soyamel=grønn, fiskemel=lyseblå/turkis, fiskefôr=rosa, fiskefeces=mørkeblå, fisk=mørkegrønn og dyrefôr/«chick starter»=mørkerød).

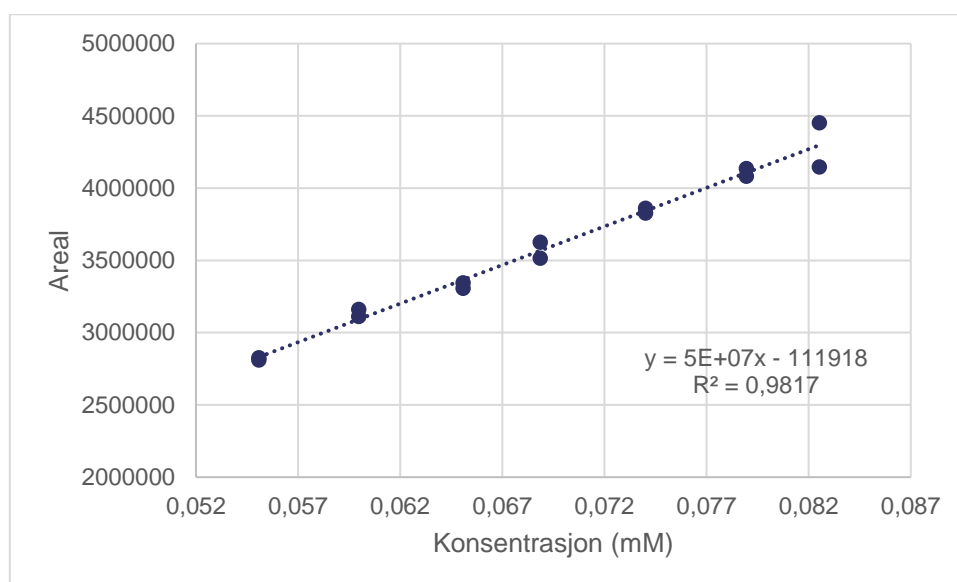


Figur 6 Plassering av monoderivatisert Lys i kromatogrammet. Figuren viser overlapp mellom kalibreringsstandard med for lite derivatiseringsreagens (10  $\mu$ L)=svart, blankprøve=blå og prøvetyperne testet i denne valideringen (soyamel=grønn, fiskemel=lyseblå/turkis, fiskefôr=rosa, fiskefeces=mørkeblå og dyrefôr/«chick starter»=mørkerød).

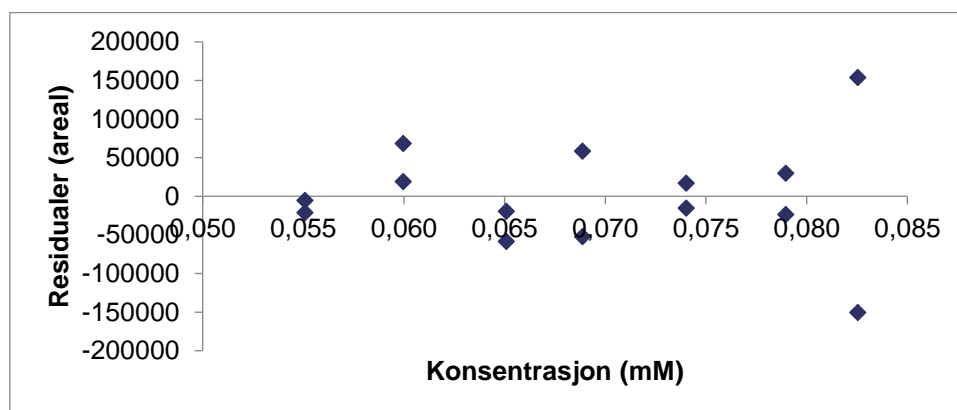
Monoderivatisert Lys overlapper altså ikke med noen andre aminosyrer, kun delvis med en forbindelse i fisk. Hvis Lys er monoderivatisert vil kontrollprøveresultatet for Lys bli for lavt. Fra erfaring med AccQ•Tag-metoden på HPLC, skjer dette svært sjelden.

## 4.2 Linearitet

Det ble analysert sju standardløsninger, som beskrevet i kapittel 3.2. Hver standardløsning ble derivatisert i parallell og deretter analysert på UPLC i tilfeldig rekkefølge. Lineær regresjon, regresjonsstatistikk og residualplott for hver aminosyre ble utarbeidet i Microsoft Excel. Lineær regresjon og residualplott for aminosyrene er vist i Figur 7 til Figur 42. Toppåreal for hver aminosyre ved hver standardkonsentrasjon er vist i Vedlegg 1, Vedleggtabell 1 til Vedleggtabell 3.

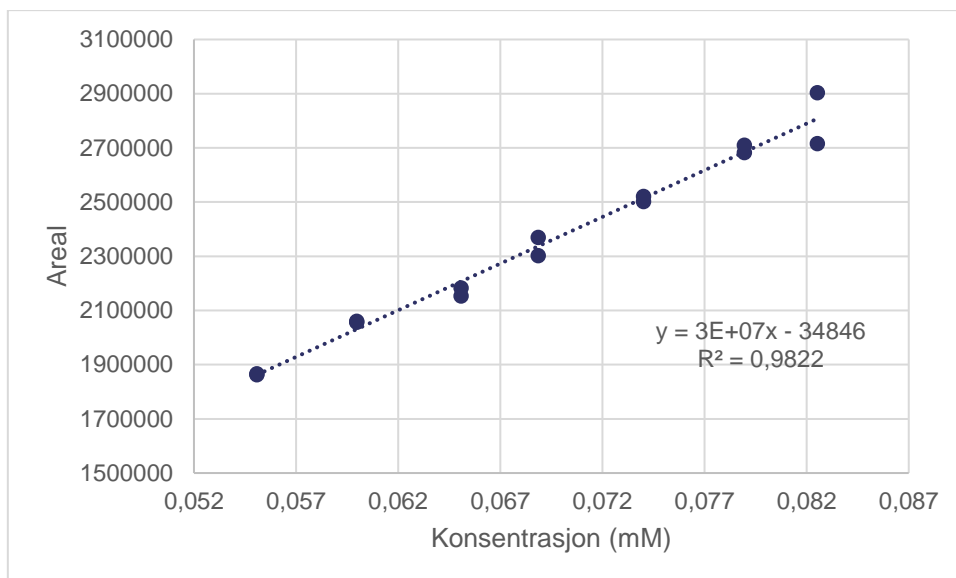


Figur 7 Lineær regresjon for Ala

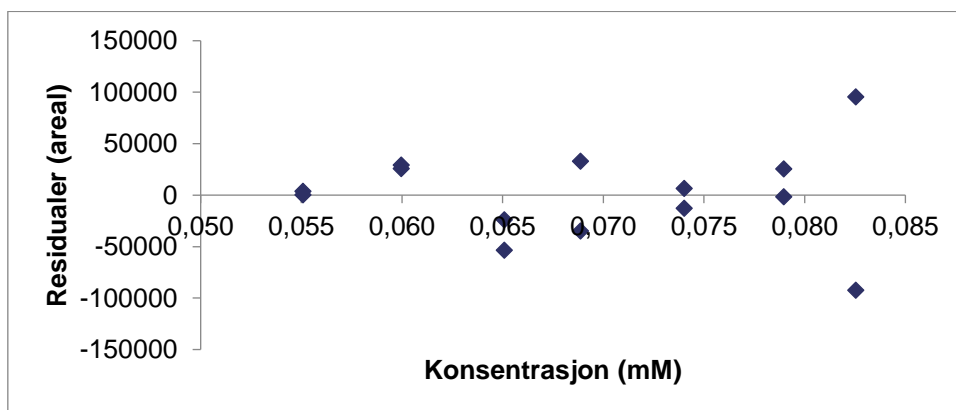


Figur 8 Residualplott for Ala

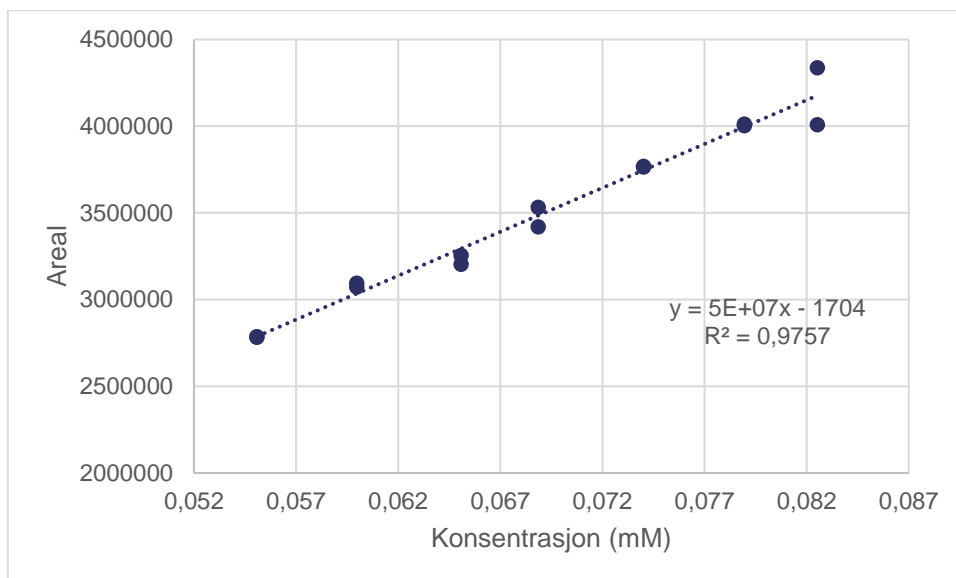




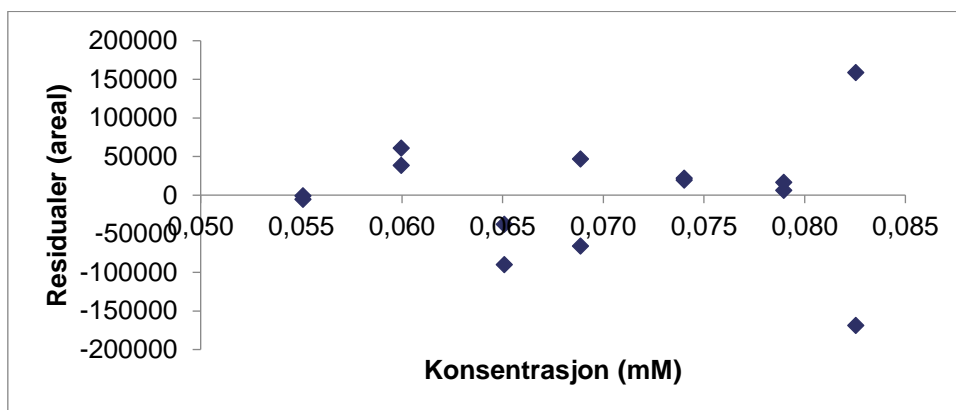
Figur 9 Lineær regresjon for Arg



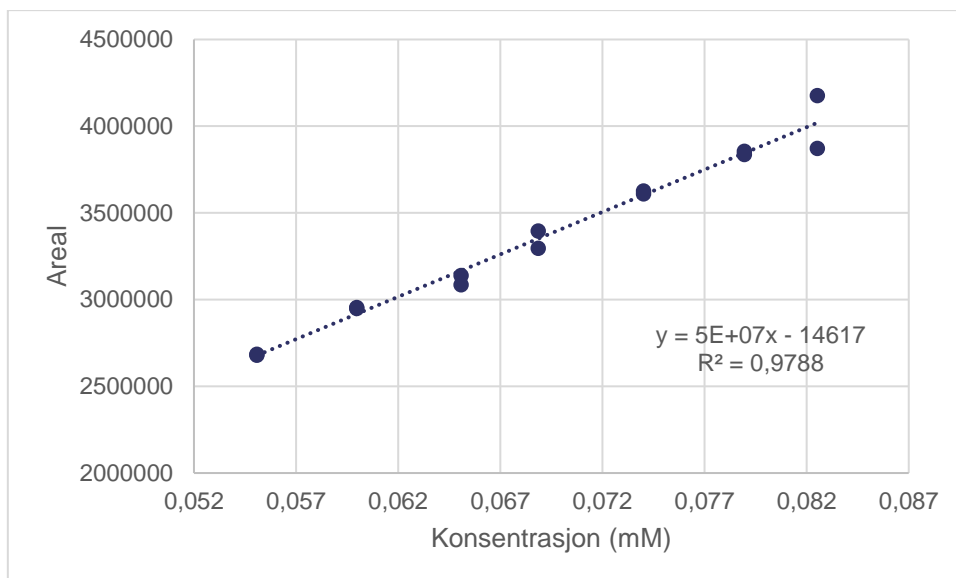
Figur 10 Residualplott for Arg



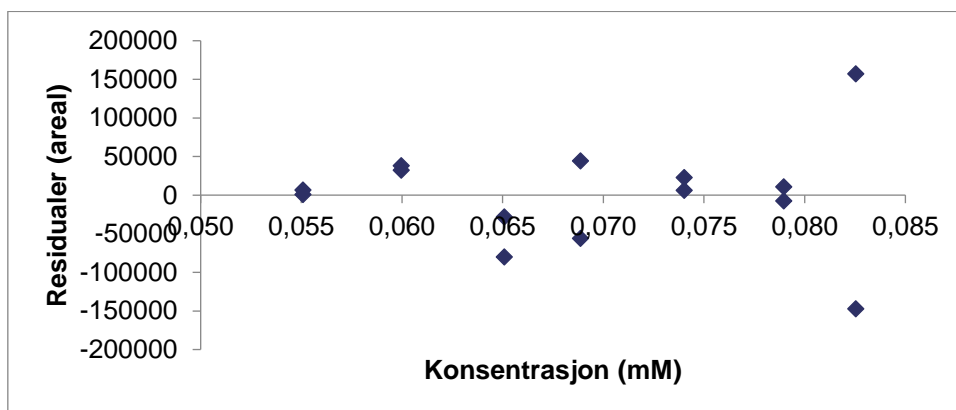
Figur 11 Lineær regresjon for Asp



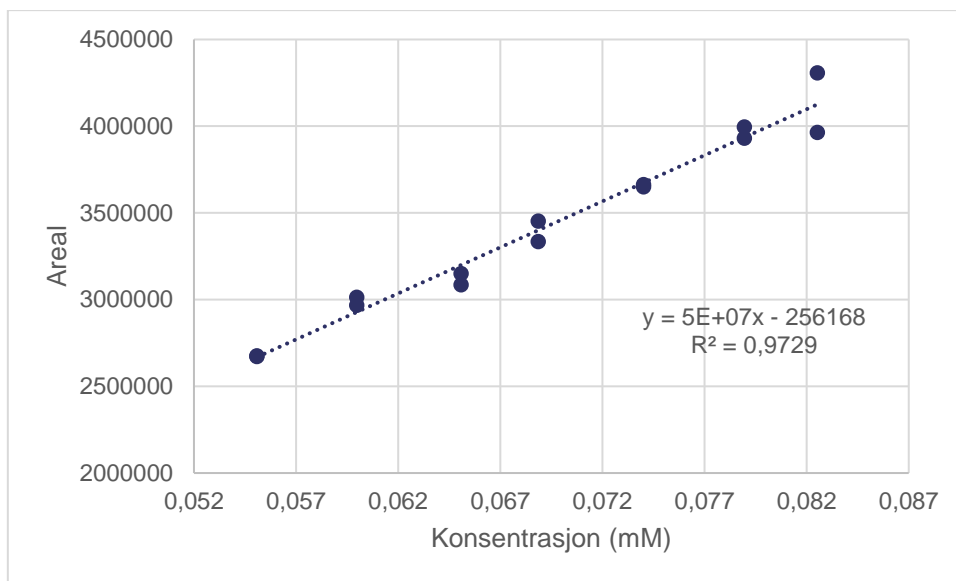
Figur 12 Residualplott for Asp



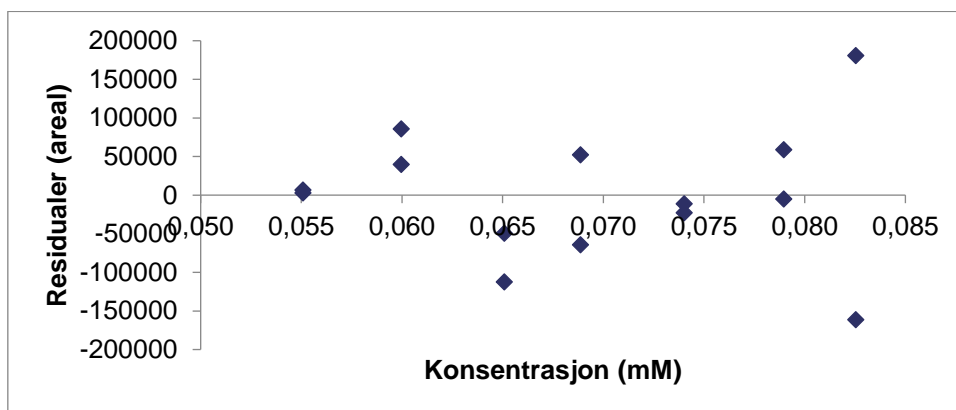
Figur 13 Lineær regresjon for Glu



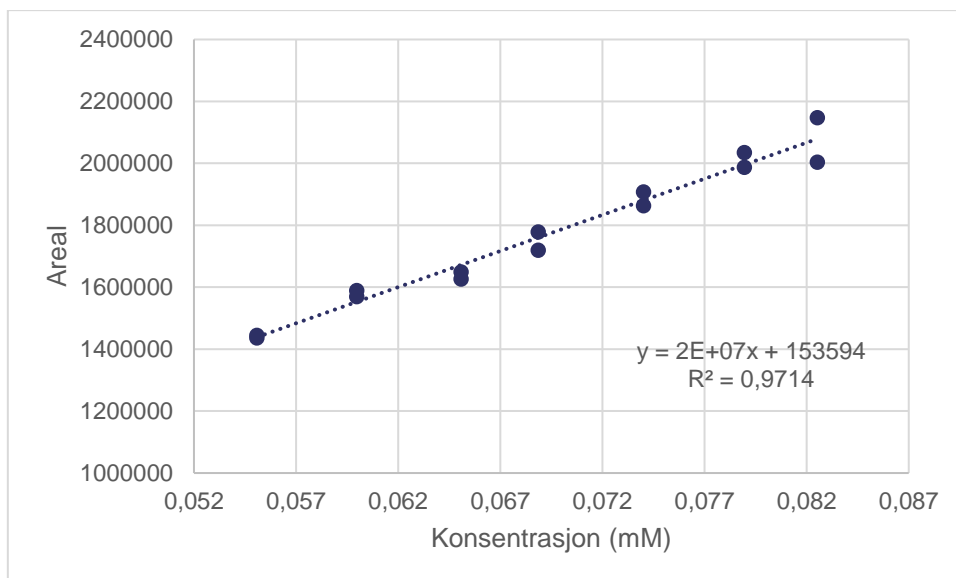
Figur 14 Residualplott for Glu



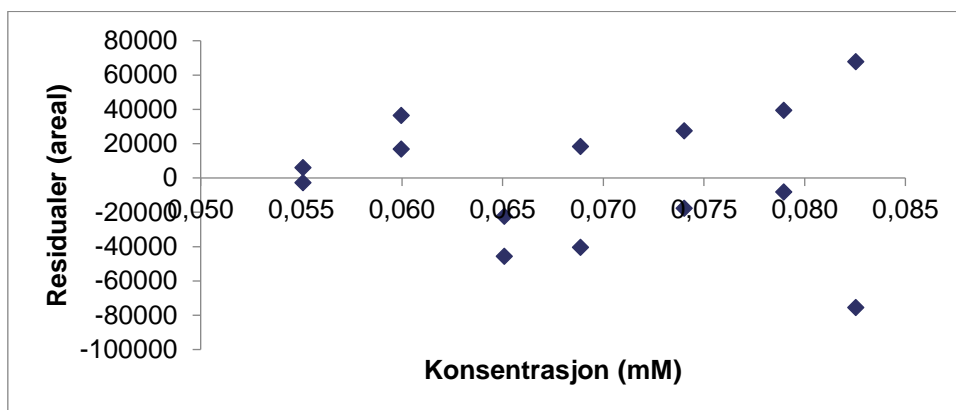
Figur 15 Lineær regresjon for Gly (arealene er korrigeret for areal i blankprøve)



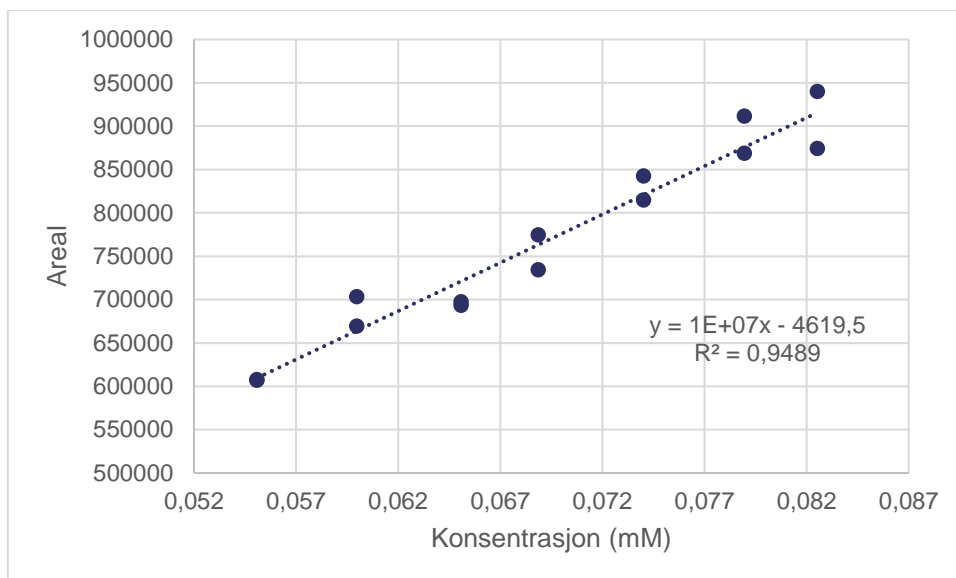
Figur 16 Residualplott for Gly



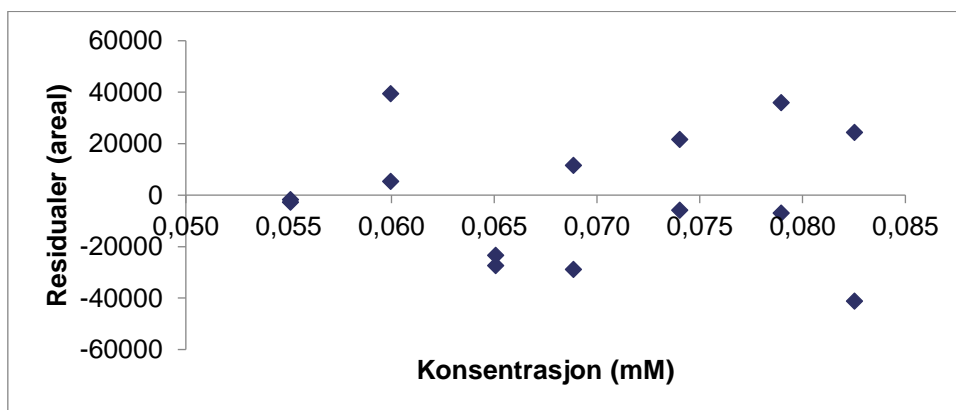
Figur 17 Lineær regresjon for His



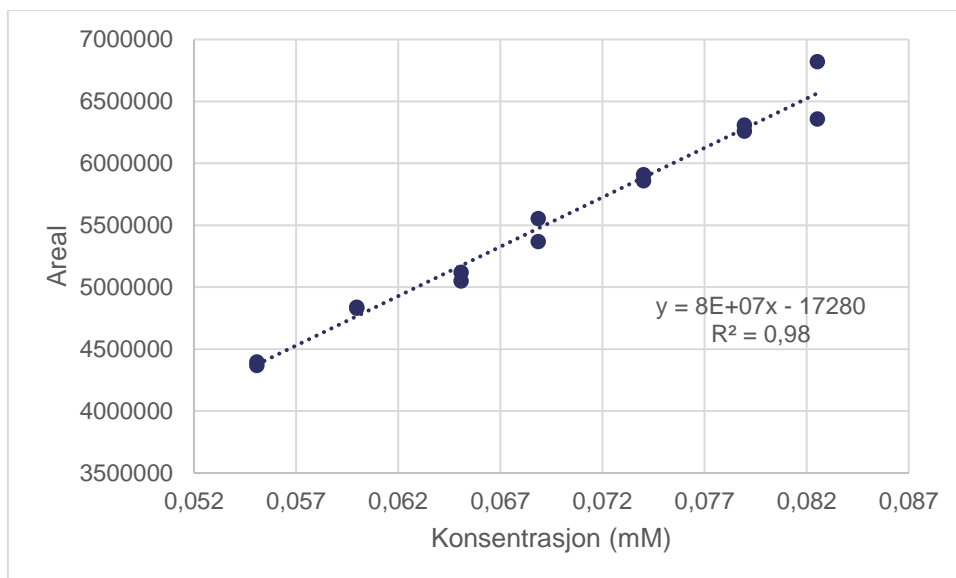
Figur 18 Residualplott for His



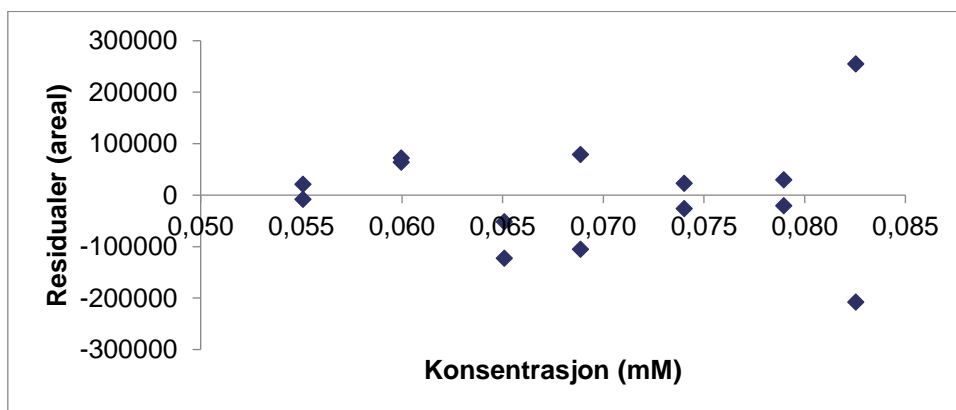
Figur 19 Lineær regresjon for H-Pro



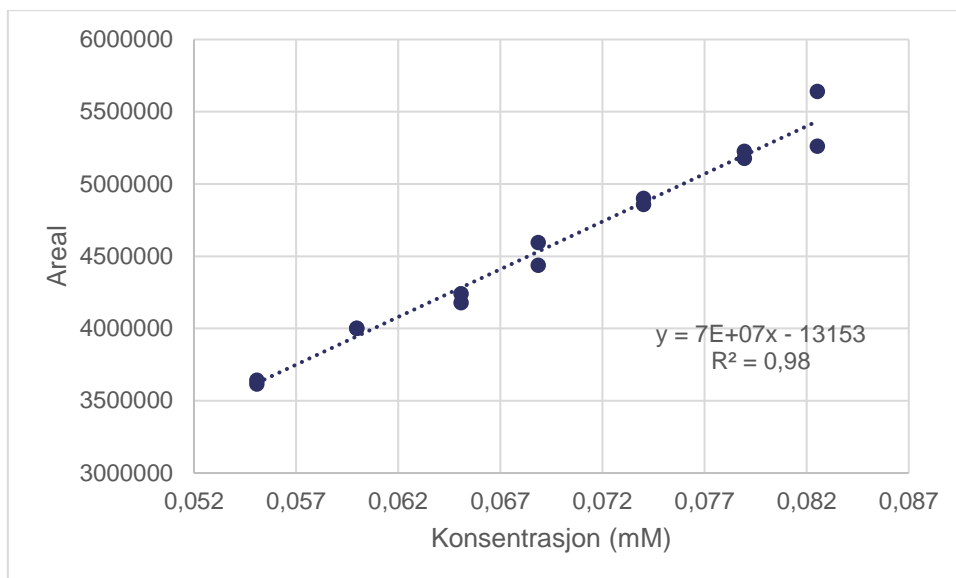
Figur 20 Residualplott for H-Pro



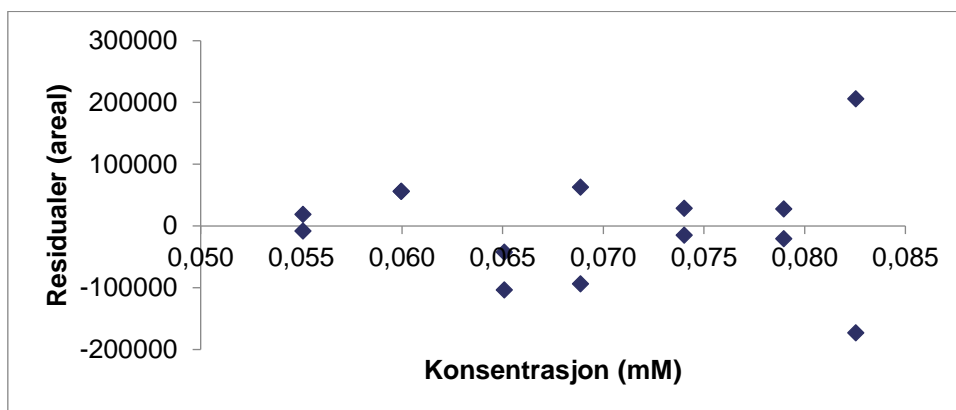
Figur 21 Lineær regresjon for Ile



Figur 22 Residualplott for Ile

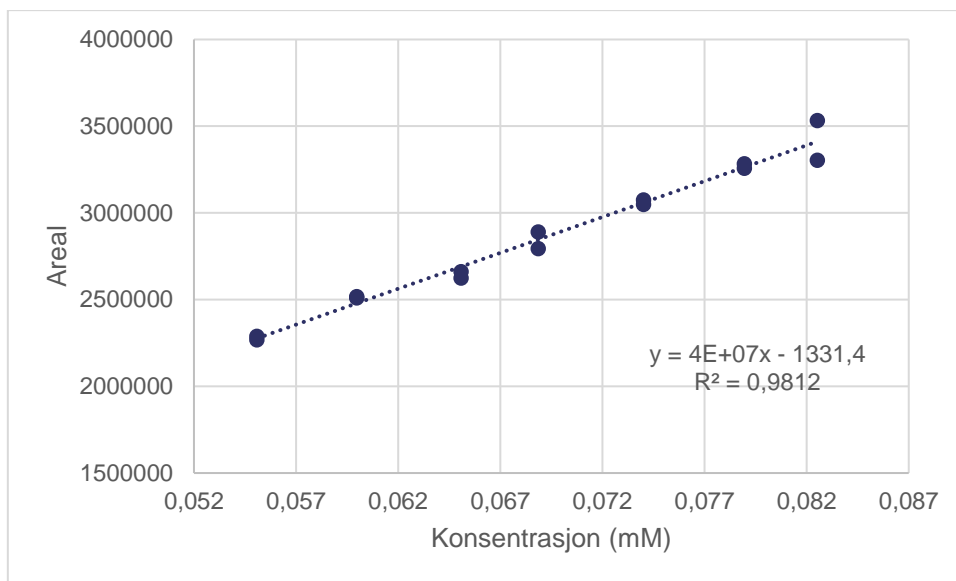


Figur 23 Lineær regresjon for Leu

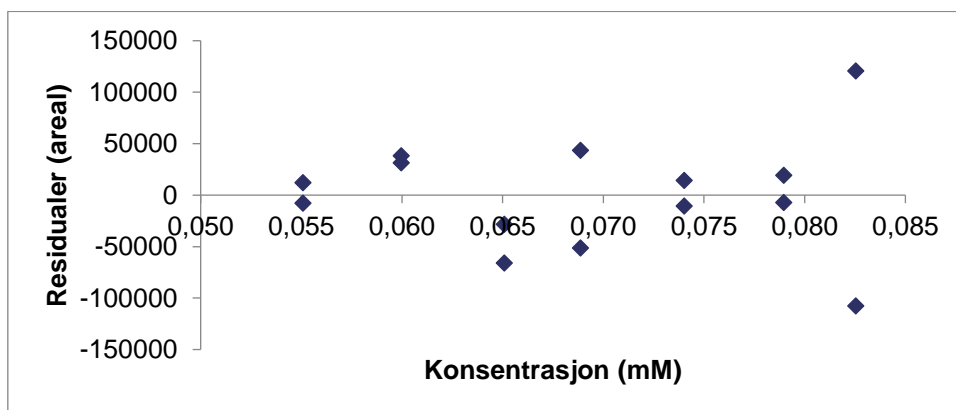


Figur 24 Residualplott for Leu

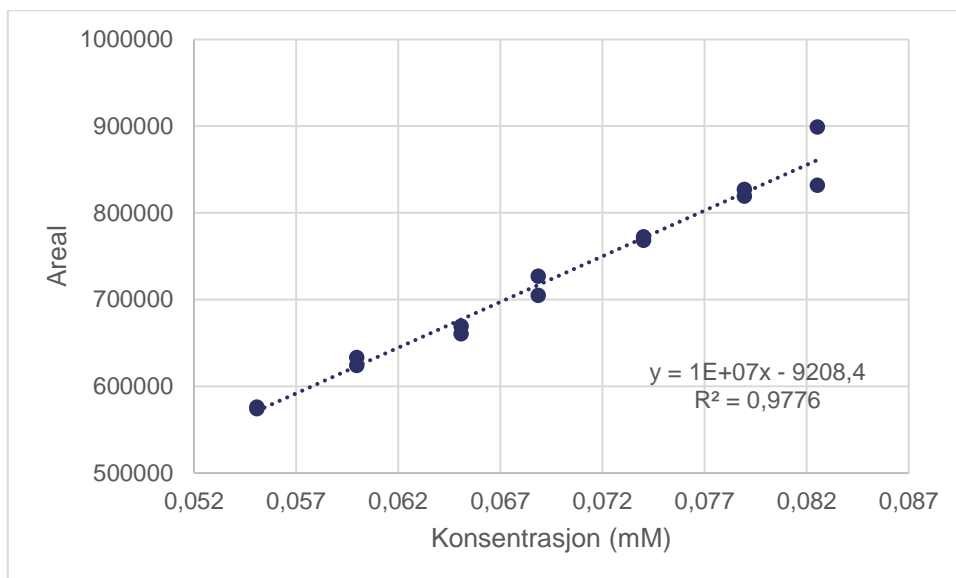




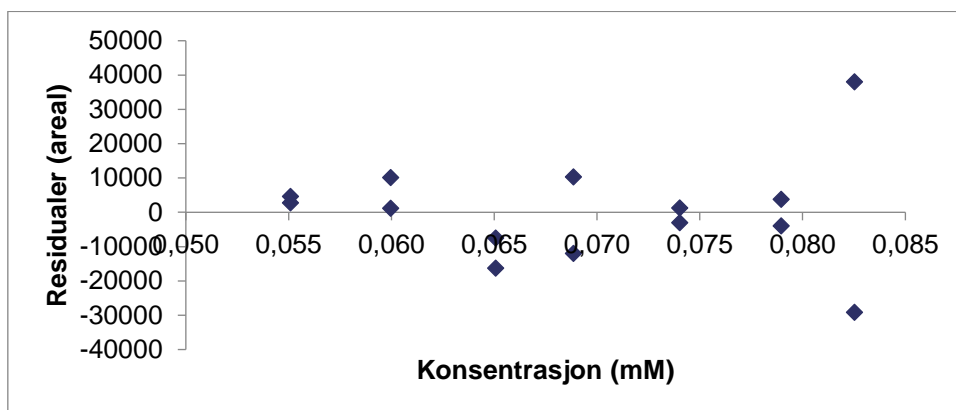
Figur 25 Lineær regresjon for Lys



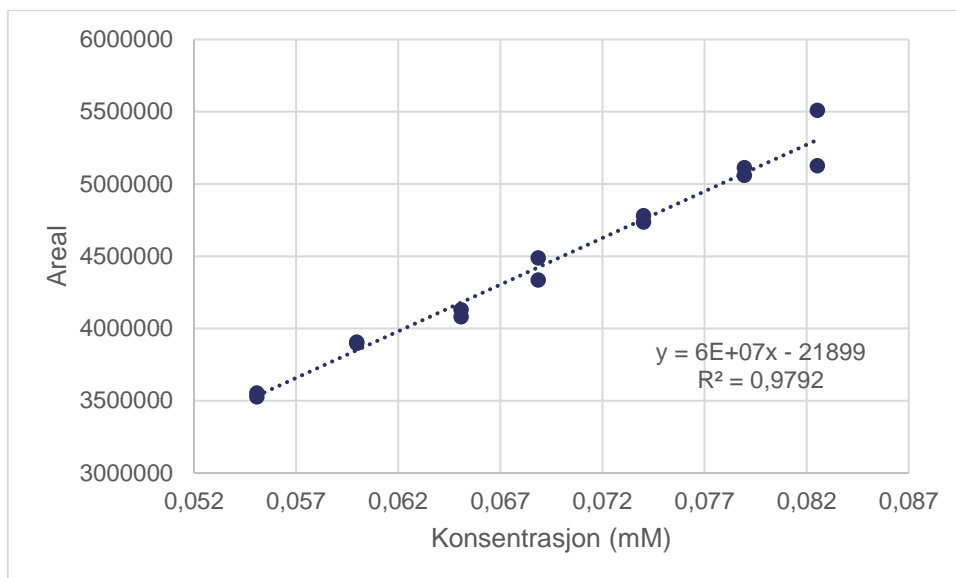
Figur 26 Residualplott for Lys



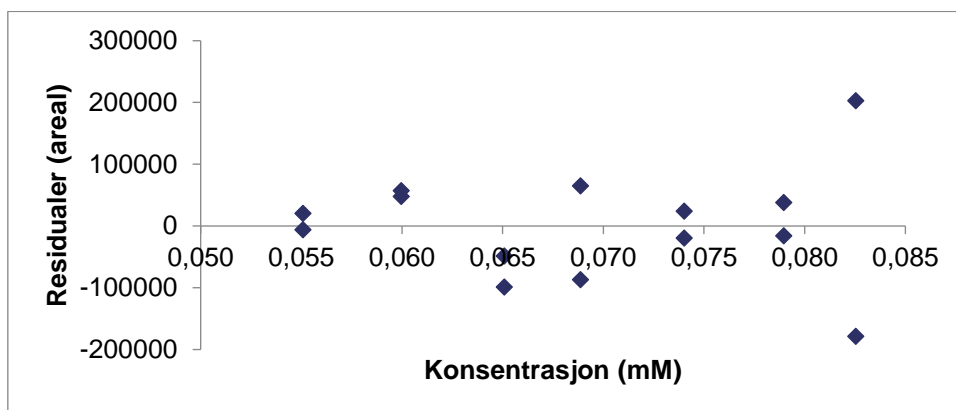
Figur 27 Lineær regresjon for Met



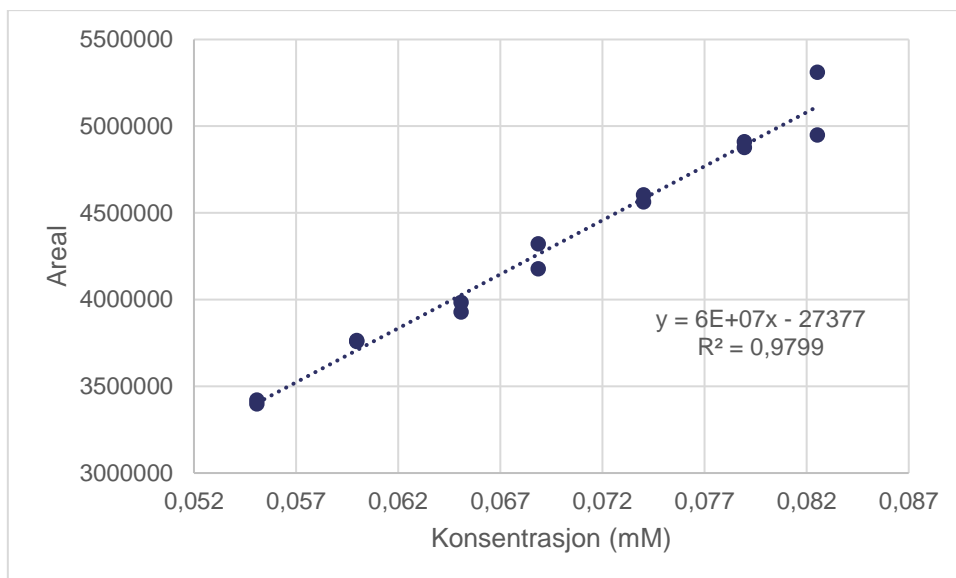
Figur 28 Residualplott for Met



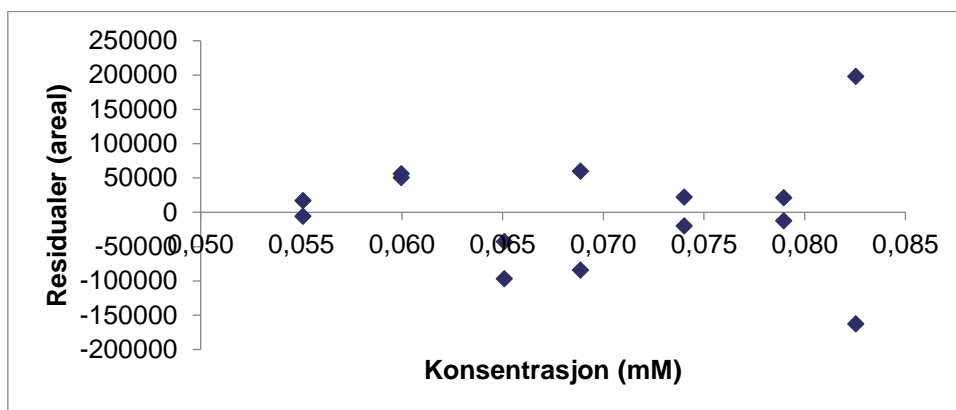
Figur 29 Lineær regresjon for Nor



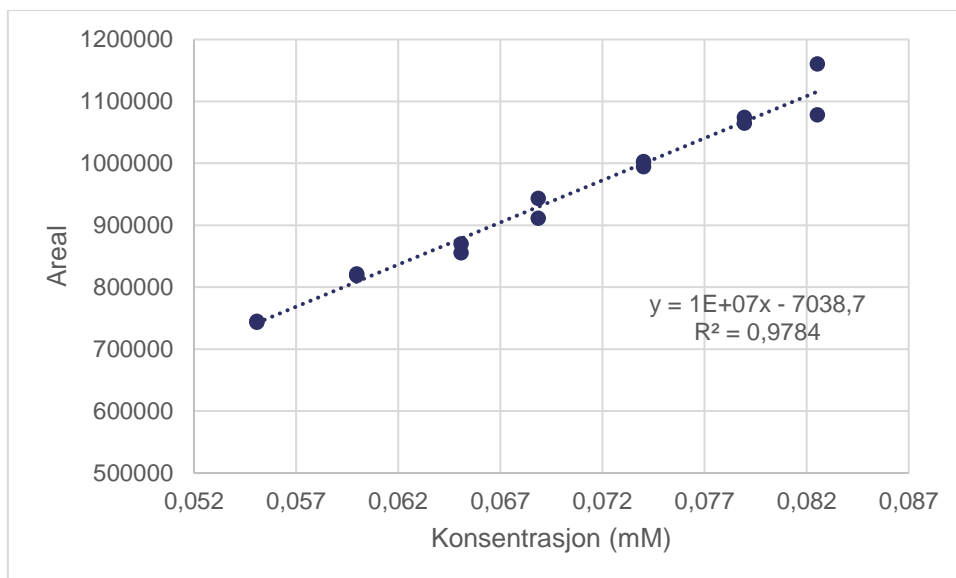
Figur 30 Residualplott for Nor



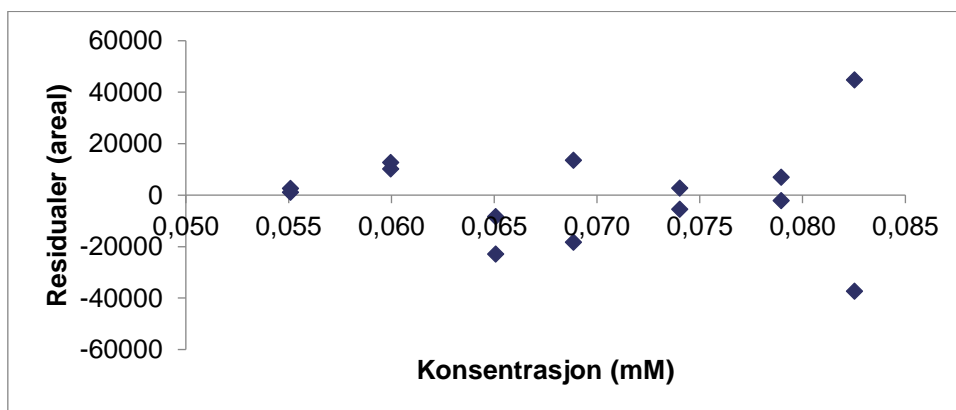
Figur 31 Lineær regresjon for Phe



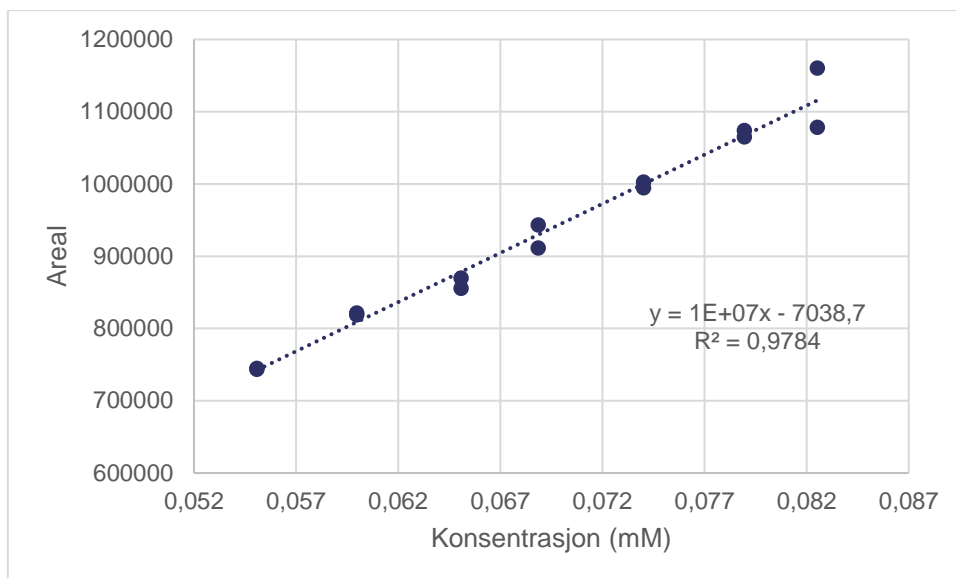
Figur 32 Residualplott for Phe



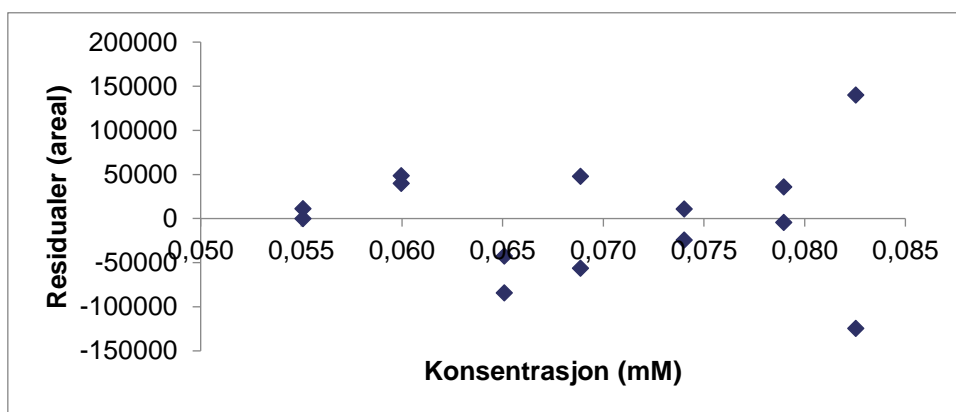
Figur 33 Lineær regresjon for Pro



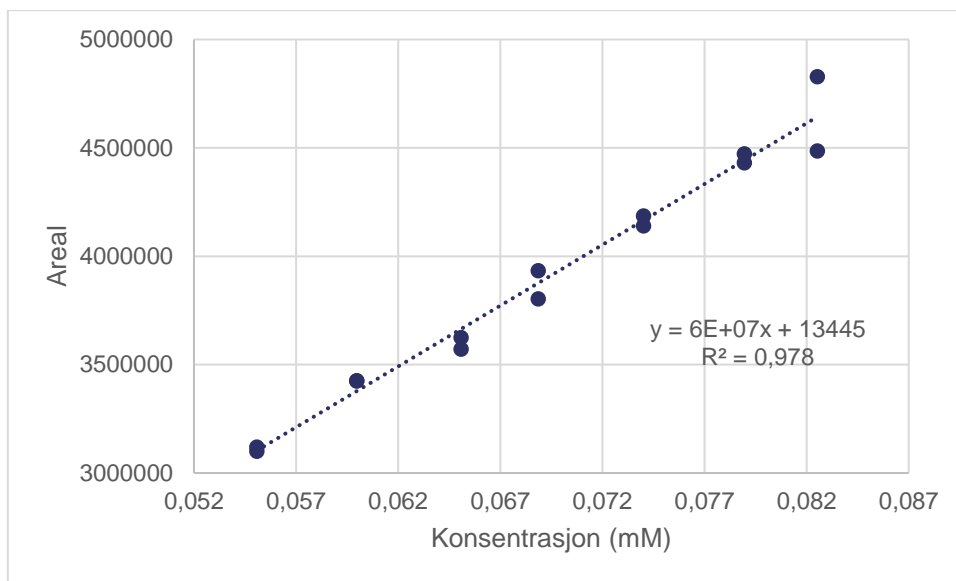
Figur 34 Residualplott for Pro



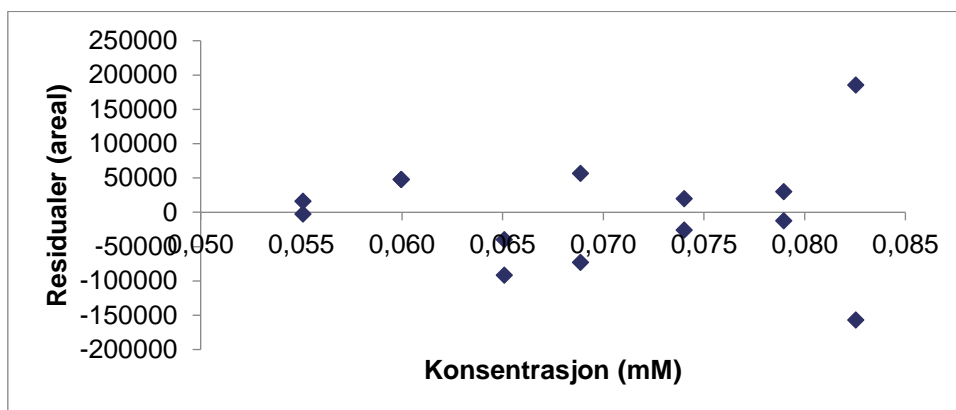
Figur 35 Lineær regresjon for Ser



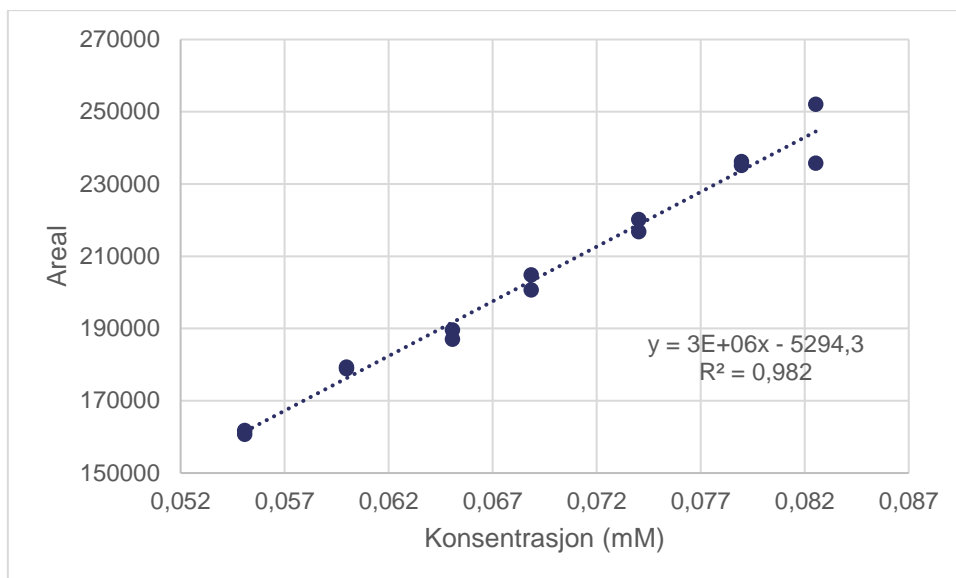
Figur 36 Residualplott for Ser



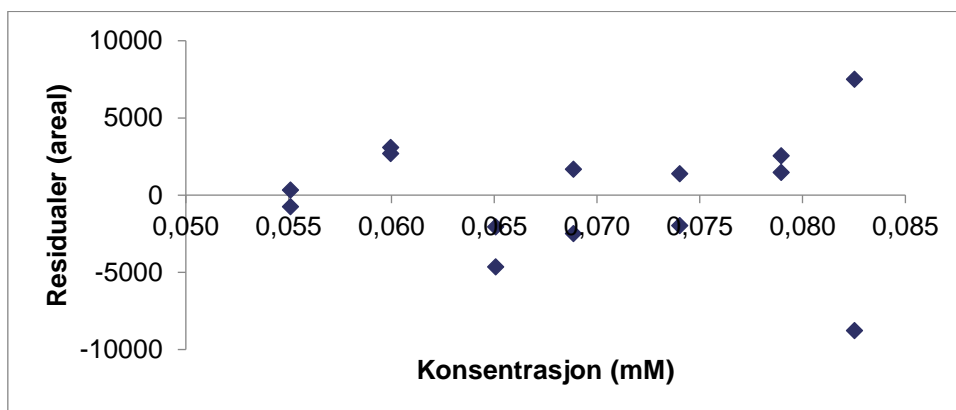
Figur 37 Lineær regresjon for Thr



Figur 38 Residualplott for Thr

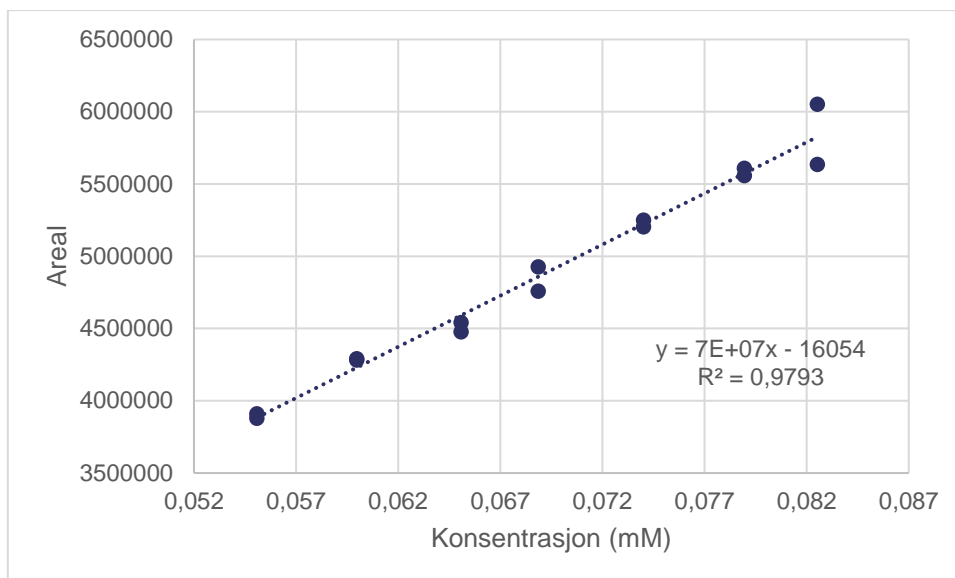


Figur 39 Lineær regresjon for Tyr

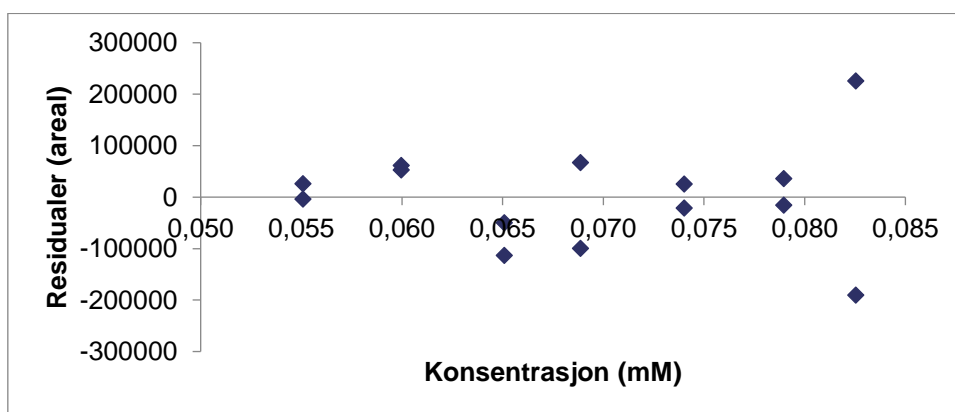


Figur 40 Residualplott for Tyr





Figur 41 Lineær regresjon for Val



Figur 42 Residualplott for Val

Alle figurer viser at kurvene er lineære med korrelasjonskoeffisienter ( $R^2$ -verdi)  $>0,97$  (med unntak av H-Pro der  $R^2=0,9489$ ) 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 hver aminosyre og %RSD for denne ( $n=14$ ) er vist i Tabell 7 og Tabell 8. Fullstendig beregning er vist i Vedlegg 1, Vedleggtabell 4 til Vedleggtabell 6.

Tabell 7 Gjennomsnittlig responsfaktor (RF) og tilhørende %RSD for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, H-Pro, Ile og Leu beregnet fra standardene i linearitetsforsøket (n=14).

RF	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	H-Pro	Ile	Leu
Snitt	2,12	0,71	1,39	1,21	2,40	0,60	0,31	2,21	1,83
%RSD	0,66	0,30	0,47	0,29	1,21	1,47	1,94	0,12	0,13

Tabell 8 Gjennomsnittlig responsfaktor (RF) og tilhørende %RSD for Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val beregnet fra standardene i linearitetsforsøket (n=14)

RF	Lys	Met	Nor	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Snitt	1,03	0,25	-	1,37	0,43	1,72	1,72	0,06	2,20
%RSD	0,15	0,42	-	0,12	0,21	0,26	0,17	0,66	0,08

Som vist er avviket mellom responsfaktorberegningene lavt, med RSD < 2 % for alle aminosyrer.

En oppsummering av regresjonsstatistikken er vist i Tabell 9 til Tabell 11. Parameterne er beskrevet i kapittel 2.4.2.

Tabell 9 Regresjonsstatistikk for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly og His.

Parameter	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly*	His
Observasjoner (n)	14	14	14	14	14	14
R <sup>2</sup> -verdi	0,9817	0,9822	0,9757	0,9788	0,9729	0,9714
F-verdi	642	661	483	553	431	407
t-verdi, b	-0,760	-0,373	-0,011	-0,101	-1,434	1,903
p-verdi, b	0,462	0,716	0,992	0,921	0,177	0,081
Nedre 95% konf.int., b	-432661	-238654	-352360	-330939	-645395	-22298
Øvre 95% konf.int., b	208826	168961	348952	301704	133059	329485
t-verdi, m	25,341	25,709	21,967	23,510	20,751	20,180
p-verdi, m	8,665×10 <sup>-12</sup>	7,308×10 <sup>-12</sup>	4,653×10 <sup>-11</sup>	2,096×10 <sup>-11</sup>	9,065×10 <sup>-11</sup>	1,257×10 <sup>-10</sup>
Nedre 95% konf.int., m	48835443	31524557	45613059	44354716	47519791	20813154
Øvre 95% konf.int., m	58023195	37362654	55657663	53415795	58669276	25851600

\*Arealene er korrigert for areal i blankprøve.

Tabell 10 Regresjonsstatistikk for H-Pro, Ile, Leu, Lys, Met og Nor.

Parameter	H-Pro	Ile	Leu	Lys	Met	Nor
Observasjoner (n)	14	14	14	14	14	14
R <sup>2</sup> -verdi	0,9489	0,9800	0,9800	0,9812	0,9776	0,9792
F-verdi	223	587	587	625	524	566
t-verdi, b	-0,089	-0,075	-0,069	-0,012	-0,286	-0,116
p-verdi, b	0,931	0,941	0,946	0,991	0,779	0,910
Nedre 95% konf.int., b	-118204	-518153	-427625	-252878	-79261	-434764
Øvre 95% konf.int., b	108965	483592	401319	250215	60844	390966
t-verdi, m	14,934	24,225	24,229	25,009	22,897	23,787
p-verdi, m	4,086×10 <sup>-9</sup>	1,473×10 <sup>-11</sup>	1,470×10 <sup>-11</sup>	1,012×10 <sup>-11</sup>	2,859×10 <sup>-11</sup>	1,826×10 <sup>-11</sup>
Nedre 95% konf.int., m	9524061	72588717	60076395	37750967	9540681	58644250
Øvre 95% konf.int., m	12777713	86936301	71949015	44956564	11547352	70470851

Tabell 11 Regresjonsstatistikk for Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val.

Parameter	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Observasjoner (n)	14	14	14	14	14	14
R <sup>2</sup> -verdi	0,9799	0,9784	0,9817	0,9780	0,9820	0,9793
F-verdi	585	545	643	534	656	567
t-verdi, b	-0,152	-0,173	-0,176	0,079	-0,642	-0,077
p-verdi, b	0,881	0,866	0,864	0,938	0,533	0,940
Nedre 95% konf.int., b	-418961	-95729	-323610	-355919	-23270	-468214
Øvre 95% konf.int., b	364208	81651	275343	382809	12682	436105
t-verdi, m	24,197	23,337	25,363	23,105	25,617	23,817
p-verdi, m	1,493×10 <sup>-11</sup>	2,287×10 <sup>-11</sup>	8,576×10 <sup>-12</sup>	2,571×10 <sup>-11</sup>	7,624×10 <sup>-12</sup>	1,799×10 <sup>-11</sup>
Nedre 95% konf.int., m	56676815	12335190	45640958	50809896	2769607	64316124
Øvre 95% konf.int., m	67893828	14875737	54219525	61390386	3284530	77268302

Alle kurvene har t-verdi < t<sub>krit</sub> (t<sub>krit</sub>=2,179 ved 95 % konfidensintervall, tosidig, n-2 frihetsgrader) og p-verdi > 0,05 for skjæringspunktet, og 95 % konfidensintervallet viser at null er en mulig verdi for skjæringen med y-aksen. For stigningstallet er t-verdi > t<sub>krit</sub> og p < 0,05. Regresjonsstatistikken viser at regresjonen er berettiget og at kurvene virkelig er lineære. Dette til tross for at det er noe høy spredning for standard 7. Hvis standard 7 fjernes fra beregningen blir korrelasjonskoeffisienten noe bedre for alle aminosyrene.

## 4.3 Presisjon

Alle rådata for beregning av repeterbarhet og intern reproduserbarhet er vist i Vedlegg 2, Vedleggstabell 7 til Vedleggstabell 12.

### 4.3.1 Repeterbarhet

Repeterbarhet for aminosyrene ble beregnet for fire av prøvetypene (soyamel, fiskefôr, fiskefeces og fisk). Beregningen er basert på 3 dobbeltbestemmelser (n=6) analysert på en dag av en analytiker. Første analysedag ble tilfeldig valg ut, dette er 16.09.22 for soyamel, fiskefôr og fiskefeces og 04.01.23 for fisk. Beregnet repeterbarhet er vist i Tabell 12 og Tabell 13.

Tabell 12 Repeterbarhet for soyamel og fiskefôr, n=6 (3 dobbeltbestemmelser på 1 dag (16.09.22), 1 analytiker).

Prøve (j.nr. Biolab)	Soyamel (kontrollprøve)				Fiskefôr (BG-2022-39-1)			
	Aminosyre	Snitt	s <sub>r</sub>	r	RSD <sub>r</sub> (%)	Snitt	s <sub>r</sub>	r
Ala	2,79	0,01	0,03	0,33	2,08	0,02	0,06	0,98
Arg	4,46	0,01	0,03	0,23	2,11	0,02	0,06	1,03
Asp	6,95	0,03	0,10	0,50	2,62	0,03	0,10	1,30
Glu	11,39	0,04	0,10	0,32	7,88	0,09	0,24	1,08
Gly	2,81	0,04	0,12	1,53	2,47	0,04	0,11	1,53
His	1,64	0,01	0,02	0,40	0,81	0,01	0,04	1,78
H-Pro	<0,10				0,53	0,02	0,06	4,32
Ile	2,94	0,02	0,07	0,80	1,52	0,03	0,07	1,74
Leu	4,96	0,01	0,04	0,29	2,76	0,03	0,09	1,17
Lys	3,91	0,01	0,02	0,15	3,63	0,04	0,11	1,06
Met	0,76	0,02	0,05	2,10	1,07	0,03	0,07	2,42
Phe	3,20	0,01	0,02	0,26	1,67	0,02	0,05	1,12
Pro	3,27	0,00	0,00	0,04	3,29	0,03	0,08	0,88
Ser	3,26	0,02	0,06	0,61	1,88	0,02	0,04	0,84
Thr	2,53	0,01	0,02	0,29	1,49	0,01	0,04	0,94
Tyr	1,87	0,02	0,05	0,89	0,96	0,03	0,09	3,25
Val	3,01	0,03	0,07	0,84	1,87	0,03	0,09	1,62

Tabell 13 Repeterbarhet for fiskefeces og fisk, n=6 (3 dobbeltbestemmelser på 1 dag (16.09.22 for fiskefeces og 04.01.23 for fisk), 1 analytiker).

Prøve (j.nr. Biolab)	Fiskefeces (BG-2022-1586-14)				Fisk (BG-2023-13-10)			
	Snitt	s <sub>r</sub>	r	RSD <sub>r</sub> (%)	Snitt	s <sub>r</sub>	r	RSD <sub>r</sub> (%)
Aminosyre								
Ala	0,47	0,00	0,00	0,15	3,51	0,04	0,10	1,0
Arg	0,34	0,00	0,00	0,40	3,50	0,03	0,08	0,8
Asp	1,72	0,01	0,04	0,74	5,67	0,04	0,10	0,6
Glu	1,15	0,01	0,02	0,57	7,94	0,05	0,15	0,7
Gly	0,89	0,02	0,07	2,63	2,71	0,09	0,25	3,2
His	0,20	0,00	0,01	1,70	1,60	0,01	0,02	0,5
H-Pro	<0,10				<0,10			
Ile	0,39	0,00	0,01	1,10	2,84	0,01	0,03	0,4
Leu	0,65	0,00	0,01	0,61	4,61	0,02	0,06	0,5
Lys	0,55	0,00	0,00	0,30	5,47	0,03	0,09	0,6
Met	0,11	0,01	0,03	8,75	1,90	0,04	0,11	2,1
Phe	0,41	0,00	0,01	0,57	2,40	0,01	0,02	0,4
Pro	0,54	0,00	0,01	0,72	2,04	0,04	0,12	2,2
Ser	0,51	0,01	0,02	1,06	2,25	0,02	0,05	0,7
Thr	0,54	0,00	0,00	0,24	2,71	0,02	0,05	0,7
Tyr	0,22	0,01	0,02	2,87	1,93	0,02	0,07	1,2
Val	0,44	0,00	0,01	1,02	3,19	0,01	0,04	0,4

Repeterbarheten for metoden er god, for de fleste aminosyrer og prøvetyper er RSD<sub>r</sub> < 2 %.

### 4.3.2 Intern reproduserbarhet

Intern reproduserbarhet ble beregnet for seks prøvetyper (soyamel, fiskefôr, fiskefeces, fisk, fiskemel og dyrefôr/«chick starter»). De fire første prøvene ble analysert ved følgende vilkår: Tre dobbeltbestemmelser over tre dager (n=18) og analysert av to analytikere. Disse er vist i Tabell 14 og Tabell 15. De to siste prøvene ble analysert ved følgende vilkår: En dobbeltbestemmelse over tre dager (n=6) og analysert av to analytikere. Disse er vist i Tabell 16.

Tabell 14 Intern reproduserbarhet for soyamel og fiskefôr, n=18 (3 dobbeltbestemmelser over 3 dager, 2 analytikere).

Prøve (j.nr. Biolab)	Soyamel (kontrollprøve)				Fiskefôr (BG-2022-39-1)			
	Snitt	SR	R	RSD <sub>R</sub> (%)	Snitt	SR	R	RSD <sub>R</sub> (%)
Aminosyre								
Ala	2,82	0,03	0,08	0,97	2,13	0,02	0,07	1,09
Arg	4,49	0,03	0,09	0,68	2,14	0,02	0,06	0,97
Asp	7,11	0,05	0,13	0,64	2,70	0,03	0,08	1,03
Glu	11,61	0,06	0,18	0,53	8,12	0,08	0,23	1,02
Gly	2,91	0,07	0,19	2,31	2,53	0,05	0,15	2,11
His	1,68	0,01	0,02	0,49	0,85	0,02	0,05	1,87
H-Pro	<0,10				0,56	0,02	0,05	3,03
Ile	2,97	0,04	0,10	1,21	1,56	0,03	0,08	1,74
Leu	5,01	0,03	0,08	0,56	2,83	0,03	0,09	1,17
Lys	3,95	0,03	0,08	0,74	3,72	0,05	0,13	1,26
Met	0,82	0,01	0,04	1,79	1,11	0,02	0,04	1,37
Phe	3,23	0,03	0,08	0,84	1,71	0,02	0,06	1,25
Pro	3,31	0,02	0,06	0,67	3,34	0,03	0,10	1,01
Ser	3,29	0,02	0,07	0,75	1,90	0,03	0,08	1,46
Thr	2,56	0,02	0,05	0,67	1,53	0,02	0,07	1,58
Tyr	1,93	0,02	0,06	1,03	1,01	0,02	0,06	2,12
Val	3,05	0,04	0,12	1,35	1,91	0,03	0,09	1,67

Tabell 15 Intern reproduserbarhet for fiskefeces og fisk, n=18 (3 dobbeltbestemmelser over 3 dager, 2 analytikere).

Prøve (j.nr. Biolab)	Fiskefeces (BG-2022-1586-14)				Fisk (BG-2023-13-10)			
	Snitt	SR	R	RSD <sub>R</sub> (%)	Snitt	SR	R	RSD <sub>R</sub> (%)
Aminosyre								
Ala	0,48	0,00	0,01	0,66	3,56	0,03	0,08	0,8
Arg	0,33	0,00	0,01	0,99	3,53	0,03	0,08	0,8
Asp	1,75	0,01	0,03	0,54	5,76	0,06	0,18	1,1
Glu	1,17	0,01	0,02	0,58	8,06	0,08	0,23	1,0
Gly	0,95	0,03	0,07	2,73	2,73	0,06	0,16	2,1
His	0,20	0,00	0,01	2,48	1,62	0,01	0,03	0,8
H-Pro	<0,10				<0,10			
Ile	0,39	0,01	0,02	1,40	2,88	0,02	0,07	0,8
Leu	0,65	0,01	0,01	0,81	4,66	0,04	0,10	0,8
Lys	0,55	0,00	0,01	0,78	5,50	0,05	0,13	0,8
Met	0,12	0,01	0,02	7,07	1,92	0,04	0,11	2,0
Phe	0,41	0,00	0,01	0,95	2,42	0,02	0,04	0,6
Pro	0,54	0,01	0,02	1,42	2,05	0,03	0,09	1,5
Ser	0,51	0,01	0,02	1,09	2,27	0,02	0,06	1,0
Thr	0,55	0,00	0,00	0,25	2,74	0,02	0,07	0,9
Tyr	0,24	0,01	0,02	2,40	2,06	0,03	0,09	1,5
Val	0,44	0,01	0,02	1,33	3,24	0,02	0,07	0,7

Tabell 16 Intern reproduerbarhet for fiskemel og dyrefôr/«chick starter», n=6 (2 replikater over 3 dager, 2 analytikere).

Prøve (j.nr. Biolab)	Fiskemel (BG-2022-38-1)				Dyrefôr, «chick starter» (BG-2022-763-1)			
	Aminosyre	Snitt	SR	R	RSD <sub>R</sub> (%)	Snitt	SR	R
Ala	4,33	0,03	0,10	0,81	1,06	0,02	0,05	1,79
Arg	4,31	0,06	0,17	1,41	1,21	0,02	0,07	1,95
Asp	6,97	0,07	0,19	0,98	1,77	0,03	0,08	1,58
Glu	9,96	0,09	0,27	0,94	3,27	0,05	0,14	1,46
Gly	3,63	0,05	0,14	1,32	1,19	0,02	0,06	1,65
His	1,50	0,03	0,09	2,05	0,49	0,02	0,04	3,21
H-Pro	<0,10				0,20	0,00	0,01	2,17
Ile	3,22	0,06	0,17	1,83	0,75	0,02	0,06	3,03
Leu	5,46	0,06	0,17	1,10	1,53	0,02	0,06	1,38
Lys	5,98	0,07	0,20	1,16	1,03	0,03	0,08	2,91
Met	2,30	0,03	0,08	1,20	0,23	0,01	0,01	2,26
Phe	3,08	0,04	0,11	1,30	0,88	0,02	0,07	2,77
Pro	2,68	0,01	0,02	0,33	1,23	0,02	0,06	1,60
Ser	2,95	0,01	0,04	0,48	0,90	0,01	0,03	1,24
Thr	3,04	0,02	0,06	0,69	0,71	0,01	0,04	1,95
Tyr	2,28	0,04	0,12	1,80	0,45	0,01	0,02	1,31
Val	3,67	0,06	0,16	1,57	0,89	0,02	0,07	2,81

Den interne reproduerbarheten er god. I likhet med RSD<sub>r</sub> er RSD<sub>R</sub> < 2 % for de fleste aminosyrer og prøvetyper. Som forventet er RSD<sub>R</sub> > RSD<sub>r</sub> for de fleste aminosyrer og prøvetypene. Unntaksvis er RSD<sub>R</sub> noe høyere enn RSD<sub>r</sub>, dette gjelder i hovedsak for aminosyrer med lave nivåer og lave toppler i kromatogrammet.

Den interne reproduerbarheten for fiskemel fra valideringen av HPLC-metoden i 2013 er vist i Tabell 17 og Tabell 18.

Tabell 17 Intern reproduerbarhet for fiskemel for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, H-Pro, Ile og Leu fra valideringen av metoden i 2013.

Presisjon	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	H-Pro	Ile	Leu
Snitt	5,51	5,79	7,96	11,63	5,67	2,21	0,70	4,11	6,99
SR	0,095	0,119	0,161	0,181	0,072	0,033	0,015	0,056	0,084
R	0,270	0,337	0,456	0,512	0,203	0,093	0,041	0,158	0,239
RSD <sub>R</sub> (%)	1,73	2,06	2,03	1,56	1,27	1,49	2,09	1,36	1,21



Tabell 18 Intern reproduserbarhet for fiskemel for Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val fra valideringen av metoden i 2013.

Presisjon	Lys	Met	Nor	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Snitt	7,76	2,78	-	3,58	4,13	3,91	3,83	2,36	4,78
SR	0,152	0,068	-	0,055	0,314	0,068	0,156	0,080	0,061
R	0,431	0,193	-	0,154	0,889	0,194	0,440	0,227	0,172
RSD <sub>R</sub> (%)	1,96	2,46	-	1,52	7,60	1,75	4,07	3,40	1,27

Sammenligningsgrunnlaget er noe snevert, men det kan se ut til at metodens presisjon er betydelig forbedret, noe som er forventet med bedre kromatografisk oppløsning. Det vil sannsynligvis være behov for å oppdatere metodens måleusikkerhet, men dette gjøres når vi har samlet mer data fra SLP – senest ved neste ledelsens gjennomgåelse av kvalitetssystemet.

#### 4.3.3 Instrumentets presisjon

Samme kalibreringsstandard ble injisert 10 ganger. Gjennomsnitt av retensjonstid (RT), areal og tilhørende %RSD for hver aminosyre er vist i Tabell 19. Alle data er vist i Vedlegg 3, Vedleggtabell 13 til Vedleggtabell 15.

Tabell 19 Gjennomsnittlig retensjonstid (RT) (min), areal og tilhørende %RSD ved 10 injeksjoner av en kalibreringsstandard.

Aminosyre	RT		Areal	
	Snitt (n=10)	%RSD	Snitt (n=10)	%RSD
Ala	5,325	0,01	3756603	0,87
Arg	3,726	0,04	2474340	0,91
Asp	4,129	0,02	3613650	1,05
Glu	4,583	0,02	3493190	0,90
Gly	3,806	0,04	5433742*	0,96
H-Pro	2,376	0,11	822110	1,48
His	2,660	0,12	1686726	1,56
Ile	7,913	0,01	5827771	0,81
Leu	7,994	0,01	4829575	0,81
Lys	6,785	0,01	2979252	0,74
Met	7,080	0,01	754798	0,79
Nor	7,311	0,01	4699230	0,86
Phe	8,136	0,01	4537608	0,73
Pro	5,892	0,01	991758	0,87
Ser	3,501	0,04	3620316	1,00
Thr	4,934	0,02	4075130	0,94
Tyr	6,949	0,01	215060	0,94
Val	7,183	0,01	5147078	0,87

\*Arealene er ikke korrigert for areal i blankprøve

Som vist i tabellen er presisjonen til instrumentet meget god.

## 4.4 Riktighet

All rådata for beregning av riktighet er vist i Vedlegg 2, Vedleggtabell 7 til Vedleggtabell 12.

### 4.4.1 Kontrollprøve

Alle kontrollprøvene som ble analysert (n=18) ble plottet i metodens kontrollkort. Disse er vist i Tabell 20 og Tabell 21.

Tabell 20 Kontrollprøveresultater for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile og Leu (oppgitt i g/100g).

Aminosyre		Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Ile	Leu
Øvre aksjonsgrense (3s)		3,02	4,99	8,43	13,47	3,02	1,80	3,28	5,56
Øvre alarmgrense (2s)		2,92	4,84	8,09	12,96	2,94	1,74	3,19	5,40
Midtlinje		2,73	4,53	7,43	11,95	2,77	1,61	3,01	5,10
Nedre alarmgrense (2s)		2,54	4,22	6,76	10,93	2,61	1,49	2,83	4,79
Nedre aksjonsgrense (3s)		2,44	4,07	6,42	10,43	2,52	1,43	2,74	4,64
Analytiker	Dato	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Ile	Leu
IAVE	16.09.2022	2,79	4,47	6,98	11,39	2,80	1,65	2,94	4,97
IAVE	16.09.2022	2,79	4,45	6,98	11,42	2,84	1,65	2,91	4,96
IAVE	16.09.2022	2,78	4,45	6,96	11,41	2,78	1,65	2,93	4,95
IAVE	16.09.2022	2,80	4,46	6,95	11,39	2,86	1,64	2,97	4,98
IAVE	16.09.2022	2,78	4,45	6,88	11,32	2,82	1,63	2,96	4,96
IAVE	16.09.2022	2,79	4,46	6,96	11,40	2,76	1,64	2,94	4,96
IAVE	21.09.2022	2,77	4,45	6,95	11,41	3,02	1,61	2,92	4,97
IAVE	21.09.2022	2,77	4,47	7,02	11,50	2,90	1,64	2,88	4,99
IAVE	21.09.2022	2,79	4,49	7,04	11,55	2,93	1,63	2,93	5,01
IAVE	21.09.2022	2,79	4,51	7,04	11,55	3,08	1,62	3,01	5,04
IAVE	21.09.2022	2,80	4,46	7,08	11,55	2,93	1,64	2,97	5,03
IAVE	21.09.2022	2,80	4,48	7,00	11,45	2,94	1,64	2,99	5,02
GUHO	29.09.2022	2,96	4,65	7,36	11,94	3,08	1,77	3,03	5,08
GUHO	29.09.2022	2,85	4,55	7,28	11,81	2,91	1,76	2,93	4,99
GUHO	29.09.2022	2,90	4,51	7,43	12,04	2,92	1,79	3,06	5,09
GUHO	29.09.2022	2,89	4,47	7,38	11,96	2,95	1,80	3,02	5,07
GUHO	29.09.2022	2,87	4,46	7,33	11,89	2,93	1,77	3,04	5,04
GUHO	29.09.2022	2,91	4,53	7,44	12,03	2,95	1,78	3,05	5,10

Tabell 21 Kontrollprøveresultater for Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val (oppgitt i g/100g).

Aminosyre		Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Øvre aksjonsgrense (3s)		4,45	1,05	3,52	3,51	3,89	2,89	2,19	3,40
Øvre alarmgrense (2s)		4,29	0,97	3,42	3,42	3,72	2,79	2,07	3,31
Midtlinje		3,97	0,82	3,23	3,22	3,38	2,61	1,83	3,12
Nedre alarmgrense (2s)		3,64	0,66	3,04	3,03	3,04	2,42	1,59	2,93
Nedre aksjonsgrense (3s)		3,48	0,58	2,94	2,93	2,87	2,33	1,48	2,84
Analytiker	Dato	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
IAVE	16.09.2022	3,91	0,79	3,20	3,29	3,28	2,54	1,80	3,01
IAVE	16.09.2022	3,90	0,75	3,19	3,29	3,30	2,54	1,83	2,98
IAVE	16.09.2022	3,91	0,76	3,20	3,27	3,27	2,53	1,90	3,00
IAVE	16.09.2022	3,92	0,78	3,21	3,27	3,25	2,53	1,87	3,05
IAVE	16.09.2022	3,90	0,75	3,19	3,26	3,23	2,51	1,89	3,04
IAVE	16.09.2022	3,91	0,76	3,20	3,26	3,26	2,53	1,91	3,01
IAVE	21.09.2022	3,88	0,83	3,20	3,29	3,32	2,54	1,89	2,99
IAVE	21.09.2022	3,92	0,81	3,22	3,31	3,34	2,56	1,86	2,95
IAVE	21.09.2022	3,94	0,84	3,25	3,30	3,33	2,56	1,93	3,01
IAVE	21.09.2022	3,95	0,81	3,25	3,30	3,28	2,54	1,89	3,09
IAVE	21.09.2022	3,97	0,82	3,24	3,26	3,31	2,56	1,90	3,04
IAVE	21.09.2022	3,95	0,81	3,23	3,29	3,28	2,54	1,95	3,07
GUHO	29.09.2022	4,05	0,96	3,31	3,44	3,36	2,64	2,10	3,12
GUHO	29.09.2022	3,95	0,93	3,21	3,37	3,33	2,59	2,09	3,00
GUHO	29.09.2022	4,02	0,85	3,28	3,33	3,28	2,59	1,99	3,15
GUHO	29.09.2022	4,02	0,86	3,26	3,33	3,30	2,60	1,98	3,11
GUHO	29.09.2022	4,01	0,85	3,25	3,30	3,25	2,56	1,96	3,12
GUHO	29.09.2022	4,06	0,86	3,29	3,34	3,31	2,60	2,00	3,12

De fleste resultatene er innenfor normalområdet og kun to verdier for Gly er utenfor aksjonsområdet. Dette kan være relatert til glycinproblematikken beskrevet i kapittel 4.1. For eksisterende metode på HPLC har vi sett at ved å derivatisere analyseserien på nytt får vi ofte verdier for Gly i normalområdet.

Resultater for GUHO er marginalt høyere enn for IAVE, men godt innenfor måleusikkerheten til de ulike aminosyrene.

#### 4.4.2 Sammenlignende laboratorieprøving

To SLP-prøver fra Masterlab og en fra AAFCO ble analysert, og  $E_n$ -verdi ble beregnet. Resultatene er vist i Tabell 22.

Tabell 22 Oppnådde snittverdier og  $E_n$ -verdier for tre ringtestprøver.

Prøvetype (j.nr. Biolab)	Fiskemel (BG-2022-38-1)		Fiskefôr (BG-2022-39-1)		Dyrefôr/«chick starter» (BG-2022-763-1)	
	Snitt (n=6)	$E_n$ -verdi	Snitt (n=18)	$E_n$ -verdi	Snitt (n=6)	$E_n$ -verdi
Aminosyre						
Ala	4,33	0,33	2,13	0,27	1,06	0,30
Arg	4,31	0,33	2,14	0,02	1,21	-0,11
Asp	6,97	0,43	2,70	0,37	1,77	0,17
Glu	9,96	0,40	8,12	0,22	3,27	0,33
Gly	3,63	-0,58	2,53	-1,09	1,19	0,51
His	1,50	0,11	0,85	0,09	0,49	0,33
Ile	3,22	0,67	1,56	0,26	0,75	0,42
Leu	5,46	0,52	2,83	0,31	1,53	0,38
Lys	5,98	0,44	3,72	0,24	1,03	0,59
Met	2,30	0,80	1,11	0,51	0,23	-1,16
Phe	3,08	0,57	1,71	0,23	0,88	0,33
Pro	2,68	0,08	3,34	0,00	1,23	0,33
Ser	2,95	0,15	1,90	-0,11	0,90	0,28
Thr	3,04	0,35	1,53	0,03	0,71	0,14
Tyr	2,28	-0,42	1,01	-0,99	0,45	-1,60
Val	3,67	0,60	1,91	0,24	0,89	0,15

Alle tre SLP-prøver hadde  $E_n$ -verdier innenfor normalområdet ( $\pm 1$ ) med unntak av Gly i fiskefôr (BG-2022-39-1) og Met og Tyr i dyrefôr/«chick starter» (BG-2022-763-1). Ingen  $E_n$ -verdier var utenfor akseptabelt område ( $\pm 2$ ).

Bias og t-verdi ble beregnet for alle tre prøvene, resultatene er vist Tabell 23.

Tabell 23 Bias og t-verdi for tre SLP-prøver.

Prøvetype (j.nr. Biolab)	Fiskemel (BG-2022-38-1)					Fiskefôr (BG-2022-39-1)					Dyrefôr/"chick starter" (BG-2022-763-1)				
	Ref	Snitt (n=6)	s	b%	t	Ref	Snitt (n=18)	s	b%	t	Ref	Snitt (n=6)	s	b%	t
Ala	4,18	4,33	0,04	4	9,3	2,06	2,13	0,06	3	5,1	1,03	1,06	0,04	3	2,2
Arg	4,16	4,31	0,07	4	5,8	2,14	2,14	0,04	0	0,4	1,22	1,21	0,03	-1	-1,1
Asp	6,65	6,97	0,10	5	8,0	2,59	2,70	0,11	4	4,4	1,74	1,77	0,06	2	1,2
Glu	9,54	9,96	0,12	4	8,5	7,93	8,12	0,27	2	3,0	3,16	3,27	0,10	4	2,7
Gly	3,86	3,63	0,08	-6	-7,0	2,83	2,53	0,07	-11	-19,7	1,13	1,19	0,05	6	3,3
His	1,48	1,50	0,06	2	0,8	0,84	0,85	0,05	1	0,9	0,47	0,49	0,03	4	1,2
Ile	2,99	3,22	0,05	8	12,2	1,51	1,56	0,05	3	4,7	0,72	0,75	0,02	5	3,3
Leu	5,16	5,46	0,05	6	14,0	2,73	2,83	0,07	4	6,2	1,47	1,53	0,03	4	4,6
Lys	5,70	5,98	0,06	5	12,0	3,63	3,72	0,10	3	4,1	0,97	1,03	0,04	7	4,3
Met	2,10	2,30	0,02	10	21,3	1,04	1,11	0,04	7	7,2	0,29	0,23	0,02	-19	-8,6
Phe	2,89	3,08	0,04	6	11,8	1,66	1,71	0,04	3	5,2	0,85	0,88	0,03	4	2,6
Pro	2,66	2,68	0,01	1	6,1	3,34	3,34	0,06	0	0,0	1,19	1,23	0,02	3	5,0
Ser	2,90	2,95	0,03	2	3,5	1,92	1,90	0,04	-1	-2,9	0,87	0,90	0,02	3	3,5
Thr	2,93	3,04	0,02	4	13,1	1,52	1,53	0,05	0	0,6	0,70	0,71	0,02	1	1,2
Tyr	2,43	2,28	0,08	-6	-4,8	1,19	1,01	0,05	-15	-15,2	0,60	0,45	0,02	-25	-17,0
Val	3,44	3,67	0,05	7	12,6	1,86	1,91	0,05	3	4,2	0,87	0,89	0,03	2	1,2

$t_{\text{kritisk}}$  (tosidig, 95 % konfidensintervall, n-1 frihetsgrader) er 2,571 for n=6 og 2,110 for n=18. t-testen viser at bias er signifikant for de fleste aminosyrer. Av erfaring er det noe spredning i aminosyreresultater på grunn av at deltakerne anvender ulike metodeprinsipp og at for eksempel hydrolysebetingelsene ikke er standardiserte. Totalt sett må det sies at riktigheten til metoden er god.

## 5 Konklusjon

Basert på resultatene oppnådd i denne valideringen og de statistiske beregningene som er foretatt er instrumentet godkjent for analyse av totale aminosyrer (BIOLAB A42). Metoden er selektiv for de aktuelle aminosyrene. Det er kun Gly som har en interfererende forurensning, men dette er en pågående reklamasjonssak. Så lenge forurensningen er konstant for hver analyseserie skal ikke denne forurensningen påvirke resultatene, og det demonstrerte også den videre valideringen. Lineariteten til instrumentet er god for samtlige aminosyrer. Repeterbarhet og intern reproducerbarhet for samtlige prøvetyper som er undersøkt er god, det samme er instrumentets presisjon. Riktigheten av det gamle instrumentet er demonstrert gjennom flere år med gode SLP-resultater, og analyse av kontrollprøven og tre SLP-prøver viser at den er tilsvarende god for det nye instrumentet. Metodens måleområde beholdes som det er og metodens måleusikkerhet oppdateres når det er samlet mer data fra SLP. Rapporten er gjennomgått av Norsk Akkreditering og instrumentet er godkjent for akkrediterte analyser av fôr, fôringredienser, fisk og fiskefeces fra og med 31. januar 2023.

## 6 Referanser

- Douglas A. Skoog, D. M. W., F. James Holler, Stanley R. Crouch (2004). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. USA, Thomson Learning, Inc.
- Hovind, H., et al. (2011). *Internal Quality Control - Handbook for Chemical laboratories (Trollboken - Troll book) (NT TECHN REPORT 569)*: 52.
- ISO (1994a). *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 (1994b). *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.
- Linsinger, T. P. J. (2008). "Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(10): 916-923.
- Løvås, G. G. (2005). *Statistikk for universiteter og høyskoler*, Universitetsforlaget.
- Magnusson, B. and U. e. Örnemark (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- 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.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2006). "The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report)." *Pure Appl. Chem.* 78(1): 145-196.
- Vessmann, J., Stefan, R.I., Van Staden, J.F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D.T., Fajgelj, A., Müller, H. (2001). "Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001), International Union of Pure and Applied Chemistry." *Pure Appl. Chem.* 73(8): 1381-1386.
- 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 til Vedleggstabell 3 viser konsentrasjoner og toppareal for aminosyrene i linearitetsforsøkene.

*Vedleggstabell 1 Konsentrasjoner og toppareal for linearitetsforsøk for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly og His. Arealene for Gly er korrigert for arealet i blankprøven.*

Std.	Kons. (mM)	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His
Blank	0	-	-	-	-	1438665	-
Std 1A	0,055	2825430	1865956	2786204	2684510	2670973	1435975
Std 1B	0,055	2809897	1862561	2781697	2678762	2674917	1444759
Std 2A	0,060	3110735	2059430	3095164	2948743	3013293	1569453
Std 2B	0,060	3160226	2056279	3073020	2954795	2967273	1589029
Std 3A	0,065	3305880	2152783	3202720	3085939	3085888	1626131
Std 3B	0,065	3345059	2182337	3255315	3138079	3148892	1649464
Std 4A	0,069	3514432	2301787	3418419	3295060	3334939	1719610
Std 4B	0,069	3624846	2369466	3531465	3395542	3451641	1778345
Std 5A	0,074	3827292	2501752	3765306	3609776	3650749	1862869
Std 5B	0,074	3859525	2520763	3768074	3626237	3662303	1907948
Std 6A	0,079	4135888	2709670	4012474	3855631	3994328	2035040
Std 6B	0,079	4082579	2682790	4001886	3837293	3930263	1987459
Std 7A	0,083	4146743	2715203	4008201	3872197	3964118	2003609
Std 7B	0,083	4451159	2903057	4335732	4176686	4306245	2146866

*Vedleggstabell 2 Konsentrasjoner og toppareal for linearitetsforsøk for H-Pro, Ile, Leu, Lys, Met og Nor.*

Std.	Kons. (mM)	H-Pro	Ile	Leu	Lys	Met	Nor
Blank	0	-	-	-	-	-	-
Std 1A	0,055	606843	4397183	3641638	2288608	576162	3554346
Std 1B	0,055	607807	4367531	3614552	2268475	574289	3527722
Std 2A	0,060	669302	4829202	4001269	2509668	624151	3896942
Std 2B	0,060	703392	4837027	4001060	2516287	633132	3906248
Std 3A	0,065	693566	5049786	4178588	2623268	660519	4079953
Std 3B	0,065	697463	5120634	4239708	2661058	669316	4129801
Std 4A	0,069	734252	5368985	4438254	2794390	704743	4335703
Std 4B	0,069	774685	5553183	4594419	2889306	727033	4487719
Std 5A	0,074	814795	5859880	4857781	3048873	768177	4736516
Std 5B	0,074	842365	5908914	4901176	3073645	772422	4780076
Std 6A	0,079	911699	6309528	5226125	3282686	827009	5112630
Std 6B	0,079	868687	6259401	5177749	3256285	819264	5058758
Std 7A	0,083	874392	6357182	5261462	3303701	831788	5127002
Std 7B	0,083	939939	6819856	5640391	3531902	898952	5508445

Vedleggtabell 3 Konsentrasjoner og toppareal for linearitetsforsøk for Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val.

Std.	Kons. (mM)	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Blank	0	-	-	-	-	-	-
Std 1A	0,055	3420349	744907	2737473	3119365	161769	3909041
Std 1B	0,055	3397538	743481	2726118	3100591	160686	3879377
Std 2A	0,060	3757777	821350	3018321	3425023	178902	4281196
Std 2B	0,060	3763301	818933	3009588	3424880	179293	4290170
Std 3A	0,065	3928587	855364	3140529	3571813	187024	4477009
Std 3B	0,065	3982668	869878	3182274	3623750	189600	4540268
Std 4A	0,069	4176657	911393	3357453	3802852	200625	4758396
Std 4B	0,069	4320987	943241	3461728	3932648	204790	4925258
Std 5A	0,074	4562618	994494	3647195	4139577	216770	5201974
Std 5B	0,074	4604663	1002644	3682329	4185383	220139	5249042
Std 6A	0,079	4910828	1074005	3953611	4472302	235160	5608575
Std 6B	0,079	4877273	1064951	3913418	4429986	236235	5557103
Std 7A	0,083	4949877	1078337	3971896	4485929	235730	5635480
Std 7B	0,083	5310540	1160527	4236559	4828373	252020	6051431

Vedleggtabell 4 til Vedleggtabell 6 viser beregnede responsfaktorer (RF) fra linearitetsforsøk.

Vedleggtabell 4 Beregnede responsfaktorer (RF) fra linearitetsforsøk for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly og His.

RF	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His
Std 1A	2,091	0,706	1,380	1,203	2,346	0,610
Std 1B	2,095	0,710	1,388	1,209	2,367	0,618
Std 2A	2,100	0,711	1,398	1,205	2,414	0,608
Std 2B	2,128	0,708	1,385	1,205	2,371	0,614
Std 3A	2,131	0,710	1,382	1,205	2,361	0,602
Std 3B	2,130	0,711	1,388	1,210	2,380	0,603
Std 4A	2,132	0,714	1,388	1,210	2,401	0,599
Std 4B	2,124	0,710	1,385	1,205	2,401	0,598
Std 5A	2,125	0,710	1,399	1,214	2,406	0,594
Std 5B	2,124	0,709	1,388	1,208	2,391	0,603
Std 6A	2,128	0,713	1,382	1,201	2,439	0,601
Std 6B	2,123	0,713	1,393	1,208	2,425	0,593
Std 7A	2,127	0,712	1,376	1,203	2,413	0,590
Std 7B	2,125	0,709	1,386	1,208	2,440	0,589
<b>Snitt</b>	<b>2,12</b>	<b>0,71</b>	<b>1,39</b>	<b>1,21</b>	<b>2,40</b>	<b>0,60</b>
%RSD	0,66	0,30	0,47	0,29	1,21	1,47

Vedleggtabell 5 Beregnede responsfaktorer (RF) fra linearitetsforsøk for H-Pro, Ile, Leu, Lys og Met.

RF	H-Pro	Ile	Leu	Lys	Met	Nor
Std 1A	0,305	2,210	1,830	1,032	0,255	-
Std 1B	0,308	2,212	1,830	1,031	0,256	-
Std 2A	0,307	2,214	1,834	1,032	0,252	-
Std 2B	0,322	2,212	1,830	1,032	0,255	-
Std 3A	0,304	2,211	1,830	1,031	0,254	-
Std 3B	0,302	2,215	1,834	1,033	0,255	-
Std 4A	0,303	2,212	1,829	1,033	0,255	-
Std 4B	0,308	2,211	1,829	1,032	0,254	-
Std 5A	0,307	2,210	1,832	1,032	0,255	-
Std 5B	0,315	2,208	1,832	1,031	0,254	-
Std 6A	0,319	2,205	1,826	1,029	0,254	-
Std 6B	0,307	2,210	1,828	1,032	0,254	-
Std 7A	0,305	2,215	1,833	1,033	0,255	-
Std 7B	0,305	2,212	1,829	1,028	0,256	-
Snitt	<b>0,31</b>	<b>2,21</b>	<b>1,83</b>	<b>1,03</b>	<b>0,25</b>	-
%RSD	1,94	0,12	0,13	0,15	0,42	-

Vedleggtabell 6 Beregnede responsfaktorer (RF) fra linearitetsforsøk for Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val.

RF	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Std 1A	1,365	0,427	1,717	1,727	0,059	2,201
Std 1B	1,366	0,429	1,723	1,729	0,059	2,200
Std 2A	1,368	0,429	1,727	1,729	0,059	2,198
Std 2B	1,367	0,427	1,718	1,725	0,059	2,198
Std 3A	1,366	0,427	1,716	1,722	0,059	2,196
Std 3B	1,368	0,429	1,718	1,726	0,059	2,200
Std 4A	1,366	0,428	1,726	1,726	0,060	2,196
Std 4B	1,366	0,428	1,720	1,724	0,059	2,196
Std 5A	1,366	0,427	1,717	1,719	0,059	2,198
Std 5B	1,366	0,427	1,717	1,723	0,060	2,197
Std 6A	1,362	0,428	1,724	1,721	0,059	2,195
Std 6B	1,368	0,429	1,725	1,723	0,060	2,198
Std 7A	1,369	0,428	1,727	1,721	0,059	2,199
Std 7B	1,368	0,429	1,715	1,724	0,059	2,198
Snitt	<b>1,37</b>	<b>0,43</b>	<b>1,72</b>	<b>1,72</b>	<b>0,06</b>	<b>2,20</b>
%RSD	0,12	0,21	0,26	0,17	0,66	0,08

## Vedlegg 2 – Rådata

Vedleggstabell 7 til Vedleggstabell 12 viser rådata brukt for å beregne repeterbarhet, intern reproducerbarhet og riktighet.

Vedleggstabell 7 Rådata for beregning av repeterbarhet, intern reproducerbarhet og riktighet for soyamel (kontrollprøve.)

Dato	16.09.2022		16.09.2022		16.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		29.09.2022		29.09.2022		29.09.2022	
Analysert av	IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		GUHO		GUHO		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	2,79	2,79	2,78	2,80	2,78	2,79	2,77	2,77	2,79	2,79	2,80	2,80	2,96	2,85	2,90	2,89	2,87	2,91
Arg	4,47	4,45	4,45	4,46	4,45	4,46	4,45	4,47	4,49	4,51	4,46	4,48	4,65	4,55	4,51	4,47	4,46	4,53
Asp	6,98	6,98	6,96	6,95	6,88	6,96	6,95	7,02	7,04	7,04	7,08	7,00	7,36	7,28	7,43	7,38	7,33	7,44
Glu	11,39	11,42	11,41	11,39	11,32	11,40	11,41	11,50	11,55	11,55	11,55	11,45	11,94	11,81	12,04	11,96	11,89	12,03
Gly	2,80	2,84	2,78	2,86	2,82	2,76	3,02	2,90	2,93	3,08	2,93	2,94	3,08	2,91	2,92	2,95	2,93	2,95
His	1,65	1,65	1,65	1,64	1,63	1,64	1,61	1,64	1,63	1,62	1,64	1,64	1,77	1,76	1,79	1,80	1,77	1,78
H-Pro	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Ile	2,94	2,91	2,93	2,97	2,96	2,94	2,92	2,88	2,93	3,01	2,97	2,99	3,03	2,93	3,06	3,02	3,04	3,05
Leu	4,97	4,96	4,95	4,98	4,96	4,96	4,97	4,99	5,01	5,04	5,03	5,02	5,08	4,99	5,09	5,07	5,04	5,10
Lys	3,91	3,90	3,91	3,92	3,90	3,91	3,88	3,92	3,94	3,95	3,97	3,95	4,05	3,95	4,02	4,02	4,01	4,06
Met	0,79	0,75	0,76	0,78	0,75	0,76	0,83	0,81	0,84	0,81	0,82	0,81	0,96	0,93	0,85	0,86	0,85	0,86
Phe	3,20	3,19	3,20	3,21	3,19	3,20	3,20	3,22	3,25	3,25	3,24	3,23	3,31	3,21	3,28	3,26	3,25	3,29
Pro	3,29	3,29	3,27	3,27	3,26	3,26	3,29	3,31	3,30	3,30	3,26	3,29	3,44	3,37	3,33	3,33	3,30	3,34
Ser	3,28	3,30	3,27	3,25	3,23	3,26	3,32	3,34	3,33	3,28	3,31	3,28	3,36	3,33	3,28	3,30	3,25	3,31
Thr	2,54	2,54	2,53	2,53	2,51	2,53	2,54	2,56	2,56	2,54	2,56	2,54	2,64	2,59	2,59	2,60	2,56	2,60
Tyr	1,80	1,83	1,90	1,87	1,89	1,91	1,89	1,86	1,93	1,89	1,90	1,95	2,10	2,09	1,99	1,98	1,96	2,00
Val	3,01	2,98	3,00	3,05	3,04	3,01	2,99	2,95	3,01	3,09	3,04	3,07	3,12	3,00	3,15	3,11	3,12	3,12

Vedleggstabell 8 Rådata for beregning av repeterbarhet, intern reproducerbarhet og riktighet for fiskefôr (BG-2022-39-1.)

Dato	16.09.2022		16.09.2022		16.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		29.09.2022		29.09.2022		29.09.2022	
Analysert av	IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		GUHO		GUHO		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	2,09	2,04	2,12	2,11	2,07	2,07	2,10	2,10	2,09	2,11	2,10	2,12	2,19	2,18	2,21	2,21	2,24	2,16
Arg	2,11	2,07	2,15	2,13	2,11	2,09	2,14	2,13	2,12	2,13	2,13	2,14	2,19	2,16	2,21	2,20	2,22	2,16
Asp	2,62	2,56	2,71	2,66	2,58	2,59	2,61	2,63	2,64	2,66	2,66	2,68	2,85	2,81	2,87	2,85	2,85	2,79
Glu	7,91	7,72	8,04	7,98	7,81	7,86	7,93	8,00	8,06	8,04	7,98	8,08	8,44	8,43	8,52	8,49	8,57	8,32
Gly	2,47	2,40	2,55	2,51	2,47	2,42	2,56	2,48	2,57	2,51	2,53	2,55	2,49	2,57	2,61	2,58	2,67	2,51
His	0,82	0,80	0,80	0,83	0,81	0,82	0,82	0,83	0,82	0,83	0,82	0,82	0,92	0,91	0,89	0,92	0,94	0,90
H-Pro	0,51	0,53	0,56	0,53	0,49	0,54	0,55	0,58	0,56	0,58	0,57	0,57	0,57	0,58	0,56	0,59	0,59	0,57
Ile	1,54	1,48	1,55	1,53	1,52	1,51	1,56	1,53	1,56	1,54	1,56	1,54	1,60	1,60	1,64	1,62	1,65	1,57
Leu	2,78	2,71	2,80	2,79	2,75	2,75	2,83	2,81	2,81	2,82	2,79	2,81	2,90	2,87	2,93	2,91	2,95	2,84
Lys	3,64	3,55	3,68	3,67	3,62	3,62	3,68	3,70	3,72	3,72	3,70	3,74	3,84	3,80	3,85	3,88	3,91	3,75
Met	1,08	1,06	1,03	1,09	1,06	1,08	1,10	1,11	1,11	1,12	1,11	1,11	1,15	1,15	1,17	1,18	1,17	1,17
Phe	1,68	1,64	1,69	1,70	1,67	1,67	1,71	1,70	1,70	1,70	1,69	1,70	1,75	1,73	1,78	1,76	1,78	1,71
Pro	3,30	3,24	3,35	3,32	3,26	3,28	3,32	3,32	3,33	3,36	3,30	3,35	3,39	3,37	3,42	3,42	3,45	3,34
Ser	1,87	1,85	1,92	1,91	1,84	1,87	1,88	1,91	1,86	1,93	1,85	1,90	1,94	1,89	1,92	1,96	1,94	1,91
Thr	1,49	1,46	1,50	1,51	1,47	1,48	1,51	1,53	1,50	1,54	1,51	1,52	1,57	1,64	1,57	1,56	1,59	1,54
Tyr	0,99	0,95	0,97	0,93	0,93	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	1,00	1,08	1,04	1,07	1,08	1,07	1,07
Val	1,89	1,82	1,90	1,88	1,87	1,85	1,92	1,87	1,91	1,89	1,90	1,89	1,96	1,96	2,01	1,98	2,02	1,93

Vedleggstabell 9 Rådata for beregning av repeterbarhet og intern reproduserbarhet for fiskefeces (BG-2022-1586-14).

Dato	16.09.2022		16.09.2022		16.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		21.09.2022		29.09.2022		29.09.2022		29.09.2022	
Analysert av	IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		IAVE		GUHO		GUHO		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,48	0,48	0,48	0,48	0,47	0,47	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Arg	0,33	0,34	0,34	0,34	0,33	0,33	0,34	0,33	0,33	0,34	0,33	0,33	0,34	0,33	0,35	0,35	0,33	0,33
Asp	1,70	1,72	1,72	1,73	1,71	1,73	1,74	1,74	1,74	1,74	1,71	1,73	1,79	1,79	1,78	1,80	1,79	1,80
Glu	1,14	1,15	1,16	1,16	1,14	1,16	1,16	1,17	1,16	1,16	1,15	1,16	1,20	1,19	1,20	1,21	1,20	1,19
Gly	0,89	0,86	0,91	0,88	0,91	0,88	1,02	0,98	0,99	0,94	0,99	0,94	1,03	0,99	0,96	0,98	0,97	0,96
His	0,19	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,20
H-Pro	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Ile	0,39	0,39	0,39	0,39	0,38	0,38	0,40	0,39	0,41	0,40	0,37	0,37	0,40	0,39	0,39	0,40	0,38	0,38
Leu	0,66	0,65	0,66	0,65	0,65	0,64	0,66	0,66	0,67	0,66	0,64	0,64	0,66	0,65	0,66	0,67	0,65	0,64
Lys	0,55	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,56	0,56	0,55	0,56	0,54	0,55	0,56	0,55	0,55	0,56	0,56	0,55
Met	0,11	0,10	0,13	0,11	0,10	0,09	0,13	0,12	0,12	0,13	0,12	0,11	0,13	0,13	0,16	0,13	0,13	0,12
Phe	0,42	0,41	0,42	0,42	0,41	0,41	0,42	0,42	0,42	0,42	0,40	0,41	0,42	0,41	0,42	0,43	0,41	0,41
Pro	0,54	0,53	0,54	0,54	0,54	0,54	0,53	0,53	0,54	0,54	0,53	0,54	0,56	0,53	0,54	0,54	0,54	0,54
Ser	0,50	0,51	0,50	0,52	0,51	0,51	0,50	0,50	0,49	0,50	0,51	0,52	0,51	0,51	0,51	0,51	0,52	0,51
Thr	0,54	0,55	0,54	0,55	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Tyr	0,23	0,22	0,23	0,22	0,22	0,21	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,23	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24
Val	0,45	0,44	0,45	0,44	0,43	0,43	0,45	0,45	0,46	0,45	0,42	0,43	0,45	0,44	0,44	0,45	0,44	0,43

Vedleggstabell 10 Rådata for beregning av repeterbarhet og intern reproduserbarhet for fisk (BG-2023-13-10).

Dato	04.01.23		04.01.23		04.01.23		06.01.23		06.01.23		06.01.23		09.01.23		09.01.23		09.01.23	
Analysert av	GUHO		GUHO		GUHO		GUHO		GUHO		GUHO		GUHO		GUHO		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	3,49	3,51	3,53	3,53	3,55	3,46	3,59	3,62	3,58	3,63	3,59	3,61	3,50	3,55	3,56	3,54	3,60	3,57
Arg	3,47	3,48	3,53	3,52	3,53	3,46	3,52	3,56	3,53	3,57	3,52	3,55	3,49	3,54	3,55	3,53	3,59	3,55
Asp	5,66	5,64	5,73	5,68	5,68	5,61	5,81	5,92	5,86	5,95	5,81	5,90	5,61	5,77	5,72	5,72	5,83	5,73
Glu	7,95	7,87	8,00	8,00	7,96	7,85	8,15	8,28	8,17	8,27	8,11	8,23	7,93	8,08	8,05	8,03	8,21	8,02
Gly	2,63	2,77	2,68	2,69	2,84	2,68	2,75	2,71	2,67	2,72	2,72	2,72	2,70	2,72	2,74	2,74	2,75	2,84
His	1,60	1,59	1,63	1,62	1,60	1,58	1,63	1,63	1,62	1,63	1,61	1,63	1,61	1,63	1,63	1,62	1,65	1,62
H-Pro	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Ile	2,84	2,82	2,88	2,87	2,82	2,81	2,89	2,89	2,91	2,91	2,87	2,90	2,88	2,88	2,93	2,89	2,97	2,88
Leu	4,63	4,58	4,66	4,66	4,58	4,57	4,67	4,72	4,70	4,73	4,66	4,70	4,63	4,68	4,70	4,67	4,76	4,66
Lys	5,43	5,39	5,60	5,58	5,44	5,38	5,54	5,63	5,60	5,56	5,44	5,53	5,41	5,48	5,50	5,48	5,59	5,48
Met	1,87	1,90	1,94	1,93	1,94	1,84	1,87	1,99	1,91	1,93	1,94	1,97	1,93	1,94	1,90	1,90	1,94	1,96
Phe	2,39	2,38	2,42	2,42	2,39	2,37	2,42	2,44	2,43	2,45	2,41	2,44	2,40	2,42	2,43	2,43	2,46	2,42
Pro	2,00	2,04	2,02	2,04	2,11	2,01	2,04	2,07	2,04	2,08	2,07	2,07	2,02	2,06	2,06	2,04	2,08	2,09
Ser	2,24	2,25	2,27	2,27	2,26	2,22	2,27	2,32	2,27	2,31	2,29	2,30	2,23	2,29	2,26	2,27	2,29	2,28
Thr	2,72	2,70	2,74	2,75	2,71	2,67	2,75	2,81	2,76	2,79	2,76	2,77	2,72	2,76	2,75	2,74	2,78	2,73
Tyr	1,93	1,88	1,94	1,96	1,95	1,92	1,99	1,96	1,96	1,97	1,99	1,94	2,32	2,30	2,19	2,29	2,31	2,34
Val	3,18	3,17	3,24	3,22	3,18	3,16	3,25	3,27	3,26	3,27	3,24	3,26	3,24	3,23	3,28	3,23	3,32	3,25

Vedleggstabell 11 Rådata for beregning av intern reproduserbarhet og riktighet for fiskemel (BG-2022-38-1).

Dato	16.09.2022		21.09.2022		29.09.2022	
Analysert av	IAVE		IAVE		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B
Ala	4,29	4,31	4,35	4,30	4,40	4,33
Arg	4,38	4,31	4,38	4,30	4,31	4,20
Asp	6,91	6,90	6,97	6,89	7,15	7,00
Glu	9,84	9,85	10,01	9,95	10,17	9,95
Gly	3,55	3,53	3,73	3,61	3,69	3,68
His	1,48	1,45	1,47	1,45	1,54	1,61
H-Pro	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
Ile	3,24	3,19	3,26	3,18	3,28	3,17
Leu	5,47	5,45	5,51	5,47	5,50	5,37
Lys	5,98	6,00	6,03	5,98	6,04	5,88
Met	2,31	2,32	2,32	2,29	2,32	2,27
Phe	3,12	3,06	3,11	3,07	3,08	3,01
Pro	2,69	2,68	2,69	2,68	2,69	2,67
Ser	2,95	2,96	2,97	2,97	2,93	2,89
Thr	3,03	3,04	3,07	3,05	3,06	3,01
Tyr	2,29	2,30	2,22	2,17	2,39	2,31
Val	3,68	3,65	3,72	3,64	3,73	3,63



Vedleggstabel 12 Rådata for beregning av intern reproduserbarhet og riktighet for dyrefôr/«chick starter» (BG-2022-736-1).

Dato	16.09.2022		21.09.2022		29.09.2022	
Analysert av	IAVE		IAVE		GUHO	
Parallell	A	B	A	B	A	B
Ala	1,05	1,04	1,04	1,05	1,13	1,08
Arg	1,21	1,18	1,19	1,19	1,26	1,21
Asp	1,75	1,72	1,73	1,74	1,88	1,82
Glu	3,22	3,19	3,21	3,23	3,45	3,33
Gly	1,14	1,13	1,21	1,19	1,25	1,21
His	0,48	0,46	0,45	0,47	0,54	0,51
H-Pro	0,19	0,18	0,19	0,19	0,24	0,23
Ile	0,74	0,73	0,75	0,74	0,80	0,75
Leu	1,51	1,50	1,52	1,52	1,59	1,54
Lys	1,02	1,00	1,01	1,02	1,10	1,03
Met	0,22	0,21	0,23	0,23	0,25	0,25
Phe	0,87	0,86	0,87	0,87	0,94	0,88
Pro	1,23	1,22	1,22	1,23	1,27	1,23
Ser	0,90	0,89	0,87	0,89	0,93	0,91
Thr	0,70	0,69	0,69	0,70	0,74	0,71
Tyr	0,42	0,43	0,45	0,44	0,47	0,47
Val	0,88	0,86	0,89	0,87	0,94	0,88

### Vedlegg 3 – Instrumentets presisjon

Vedleggstabell 13 til Vedleggstabell 15 viser retensjonstider (RT) (min) og toppareal ved 10 injeksjoner av samme kalibreringsstandard.

Vedleggstabell 13 Retensjonstider (RT) (min) og toppareal for Ala, Arg, Asp, Glu, Gly og His ved 10 injeksjoner av samme kalibreringsstandard.

Aminosyre Inj.nr.	Ala		Arg		Asp		Glu		Gly		His	
	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal
1	5,325	3737183	3,729	2455392	4,130	3582251	4,584	3474001	3,808	5396147*	2,666	1668434
2	5,324	3733731	3,725	2457815	4,128	3577930	4,582	3480669	3,805	5394487*	2,659	1653753
3	5,325	3828648	3,728	2520801	4,130	3692569	4,584	3565374	3,808	5543375*	2,666	1728779
4	5,325	3767126	3,727	2493365	4,129	3639233	4,583	3498952	3,806	5479245*	2,661	1684853
5	5,325	3734961	3,726	2471166	4,129	3596312	4,583	3478357	3,805	5416398*	2,658	1673548
6	5,324	3754429	3,726	2473208	4,129	3612429	4,582	3496072	3,805	5426155*	2,660	1683625
7	5,325	3713267	3,725	2438638	4,128	3565853	4,582	3450898	3,805	5360999*	2,657	1665844
8	5,324	3761368	3,725	2473682	4,128	3625183	4,582	3493014	3,804	5437540*	2,657	1699540
9	5,324	3788673	3,725	2487145	4,128	3645267	4,582	3520516	3,805	5469637*	2,659	1732801
10	5,326	3746641	3,727	2472185	4,130	3599477	4,584	3474046	3,807	5413437*	2,659	1676087
Snitt	<b>5,325</b>	<b>3756603</b>	<b>3,726</b>	<b>2474340</b>	<b>4,129</b>	<b>3613650</b>	<b>4,583</b>	<b>3493190</b>	<b>3,806</b>	<b>5433742*</b>	<b>2,660</b>	<b>1686726</b>
SD	0,001	32835	0,001	22627	0,001	38100	0,001	31445	0,001	52078	0,003	26275
%RSD	0,01	0,87	0,04	0,91	0,02	1,05	0,02	0,90	0,04	0,96	0,12	1,56

\*Arealene er ikke korrigert for areal i blankprøve

Vedleggstabell 14 Retensjonstider (RT) (min) og toppareal for H-Pro, Ile, Leu, Lys, Met og Nor ved 10 injeksjoner av samme kalibreringsstandard.

Aminosyre	H-Pro		Ile		Leu		Lys		Met		Nor	
Inj.nr.	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal
1	2,380	843415	7,913	5799962	7,994	4803228	6,785	2964214	7,080	752726	7,312	4673783
2	2,375	816719	7,913	5804362	7,994	4811728	6,785	2965232	7,079	752407	7,311	4677423
3	2,381	834770	7,913	5933082	7,994	4917130	6,785	3023376	7,080	767839	7,311	4790141
4	2,376	821136	7,913	5844572	7,994	4850516	6,785	3001968	7,080	759356	7,311	4720028
5	2,374	834697	7,913	5801397	7,994	4807101	6,785	2971338	7,080	751867	7,311	4676492
6	2,376	818100	7,913	5821099	7,993	4819087	6,784	2976730	7,079	754356	7,311	4691966
7	2,374	802698	7,913	5759922	7,994	4775996	6,785	2943158	7,080	745775	7,311	4644644
8	2,373	816384	7,912	5829017	7,993	4831058	6,784	2979281	7,079	753422	7,310	4702757
9	2,376	820798	7,912	5870074	7,993	4862848	6,785	2991400	7,079	758556	7,311	4732103
10	2,375	812387	7,914	5814220	7,995	4817054	6,787	2975822	7,081	751677	7,313	4682961
Snitt	<b>2,376</b>	<b>822110</b>	<b>7,913</b>	<b>5827771</b>	<b>7,994</b>	<b>4829575</b>	<b>6,785</b>	<b>2979252</b>	<b>7,080</b>	<b>754798</b>	<b>7,311</b>	<b>4699230</b>
SD	0,003	12132	0,001	47155	0,001	39255	0,001	22153	0,001	5933	0,001	40452
%RSD	0,11	1,48	0,01	0,81	0,01	0,81	0,01	0,74	0,01	0,79	0,01	0,86

Vedleggstabell 15 Retensjonstider (RT) (min) og toppareal for Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr og Val ved 10 injeksjoner av samme kalibreringsstandard.

Aminosyre	Phe		Pro		Ser		Thr		Tyr		Val	
Inj.nr.	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal	RT	Areal
1	8,136	4515961	5,893	985533	3,503	3591519	4,935	4050976	6,949	212103	7,183	5121318
2	8,136	4518802	5,892	987122	3,500	3594982	4,934	4053246	6,949	213768	7,183	5118452
3	8,136	4608938	5,893	1010193	3,503	3702965	4,935	4162058	6,949	219037	7,183	5247172
4	8,136	4558915	5,893	994616	3,501	3641489	4,934	4091950	6,950	215585	7,183	5167035
5	8,136	4518904	5,892	985448	3,500	3609254	4,934	4052429	6,949	215331	7,183	5120601
6	8,135	4531928	5,892	989653	3,500	3612569	4,934	4067786	6,949	216619	7,182	5140757
7	8,136	4488610	5,892	980592	3,499	3575117	4,934	4025106	6,949	212605	7,183	5086370
8	8,135	4540454	5,892	993640	3,499	3621034	4,933	4077656	6,949	214530	7,182	5148815
9	8,135	4562209	5,891	1001156	3,500	3646505	4,934	4109078	6,949	216285	7,183	5185012
10	8,137	4531355	5,894	989630	3,502	3607725	4,936	4061014	6,951	214739	7,185	5135251
Snitt	<b>8,136</b>	<b>4537608</b>	<b>5,892</b>	<b>991758</b>	<b>3,501</b>	<b>3620316</b>	<b>4,934</b>	<b>4075130</b>	<b>6,949</b>	<b>215060</b>	<b>7,183</b>	<b>5147078</b>
SD	0,001	32998	0,001	8651	0,001	36241	0,001	38487	0,001	2025	0,001	44607
%RSD	0,01	0,73	0,01	0,87	0,04	1,00	0,02	0,94	0,01	0,94	0,01	0,87

