

Matilde Hustad
Kristine Rosnes

Bestemmelse av vanninnhold i marine restråstoffprodukter

Metodevalidering av et Karl Fischer-titreringsinstrument for bestemmelse av vanninnhold i fiskeolje

Bacheloroppgave i bachelor i bioingeniørfag
Mai 2019

Matilde Hustad
Kristine Rosnes

Bestemmelse av vanninnhold i marine restråstoffprodukter

Metodevalidering av et Karl Fischer-
titreringsinstrument for bestemmelse av
vanninnhold i fiskeolje

Bacheloroppgave i bachelor i bioingeniørfag
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en del av utdanningen bachelor i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven er utført hos SINTEF Industri, avdeling for bioteknologi og nanomedisin, forskningsgruppe for massespektrometri. Prosjektet ble gjennomført våren 2019.

Vi ønsker å rette en stor takk til våre faglige veiledere ved SINTEF Industri; Anna Nordborg (forsker, SINTEF) og Trude Guldborg (Master of science, SINTEF), for bidrag med gode faglige tilbakemeldinger, rådgivning og støtte. Retter også en takk til de andre ansatte ved SINTEF Industri for god imøtekommenhet og hjelp til laboratoriearbeid. I tillegg vil vi takke Margareth Nupen, (førstelektor ved institutt for bioingeniørfag, NTNU) som har vært vår prosessveileder i dette prosjektet, for god oppfølging gjennom perioden.

Trondheim, 19. mai 2019

Matilde Hustad

Matilde Hustad

Kristine Rosnes

Kristine Rosnes

Sammendrag

For optimal utnyttelse av avfallet fra sjømatindustrien, blir det dannet restråstoffprodukter. Disse produktene brukes blant annet som kosttilskudd til mennesker og dyrefôr, og et eksempel på restråstoff er fiskeolje. Restråstoff kan inneholde miljøgifter, eksempelvis tungmetaller og dioksiner. Miljøgifter i høye doser er helseskadelig for mennesker og dyr. Derfor har Den europeiske union satt en grense for maksimal mengde tillatt miljøgifter i restråstoffprodukter. Verdien for mengden miljøgifter skal utgis ved standardbenevning $\mu\text{g/g}$ 12 % moisture content, slik at det er et felles sammenligningsgrunnlag. Vannmengden i marine restråstoffprodukter bestemmes av den grunn, for å kunne omregne til standardbenevningen.

Vanninnholdet i restråstoffprodukter bestemmes blant annet ved å benytte en metode kalt Karl Fischer-titrering. Karl Fischer-titrering er en redokstitrering som baserer seg på en kjemisk reaksjon mellom vann og jod, samt en base, en alkohol og svoveldioksid. Titreringen foregår enten volumetrisk eller coulometrisk, og deteksjonen tar utgangspunkt i redoksparet jod og jodid. Den forbrukte mengden av jod tilsvarer vannmengden i produktet.

Hensikten med oppgaven er å metodevalidere et Karl Fischer-titreringsinstrument; TitroLine® 7500 KF. Ulike marine restråstoffprodukter; fiskeolje, fiskemel, ensilasje og vannfraksjon, ble analysert for å undersøke om matriksene er egnet til bruk på dette instrumentet. Metodevalideringen ble gjennomført med fiskeolje. Valideringsparametrene som ble testet var linearitet, riktighet, nøyaktighet, repeterbarhet, reproduserbarhet, holdbarhet og robusthet. Resultatet fra valideringen var at alle analysene var innenfor de fastsatte kravene for valideringen og instrumentet kan derfor tas i bruk.

Fiskeolje er en egnet matriks for dette instrumentet. Fiskemel er ikke et egnet prøvemateriale, da det ikke løses opp tilstrekkelig. Ensilasje og vannfraksjon er egnede prøvematerialer, men det ligger usikkerhet i oppnådde resultater, da det ikke har blitt utført metodevalidering på disse matriksene. For å sikre resultatene må det gjennomføres metodevalideringsanalyser med disse matriksene.

Abstract

To achieve optimum use of the waste created from the seafood industry, marine by-products are manufactured. These products can be used as food supplement to humans and animals, and an example is fish oil. Marine by-products can contain environmental contaminants, in example heavy metals or dioxins. Contaminants in high doses are not health beneficial for humans and animals. Therefore, the European union has decided a maximum allowed quantity of these contaminants in marine by-products. The quantity of contaminants is to be given with the standard unit pg/g 12 % moisture content; this creates a basis for comparison. The water content must be determined to do a conversion to the standard unit.

Water content in marine by-products can be determined by using Karl Fischer titration. Karl Fischer titration is a redox titration that is based on a chemical reaction between iodine and water, in addition to an alcohol, sulfur dioxide and a base. The titration can be either volumetric or coulometric, and the detection is based on the redox pair consisting of iodine and iodide. The amount of consumed iodine is equal to the amount of water in the marine by-products.

The purpose of this study is to validate a Karl Fischer titrator; TitroLine® 7500 KF. Different marine by-products: fish oil, fishmeal, silage and water fraction, were analysed to study these matrixes' suitability with use of this instrument. The validation was completed with fish oil. The validation parameters that were tested were linearity, accuracy, trueness, repeatability, reproducibility, storage stability and robustness. All the parameters were acceptable, and the instrument can therefore be taken in to use.

Fish oil is a suitable matrix for this instrument. Fish meal is not suitable, because it does not dissolve adequately. Silage and water fraction are suitable matrixes, but there lies an uncertainty in the achieved results, since a validation have not been executed with these matrixes. To ensure the results, it is necessary to perform method validation analyses with these matrixes.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	III
ABSTRACT	V
1.0 BAKGRUNN	1
1.1 MARINT RESTRÅSTOFF	1
1.2 METODER FOR BESTEMMELSE AV VANNINNHold	2
1.3 KARL FISCHER-TITRERING	3
1.3.1 Kjemisk reaksjon.....	3
1.3.2 Deteksjon.....	4
1.3.3 Løsemiddel	5
1.3.4 Standardisering.....	6
1.3.5 TitroLine® 7500 KF	6
1.3.6 Beregning.....	6
1.3.7 Eliminering av interferenser.....	7
1.4 METODEVALIDERING	8
1.4.1 Riktighet og nøyaktighet	8
1.4.2 Presisjon	8
1.4.3 Linearitet.....	9
1.4.4 Overdraging.....	9
1.4.5 Gjenfinning	9
1.4.6 Spesifisitet	10
1.4.7 Holdbarhet	10
1.4.8 Robusthet.....	10
2.0 PROBLEMSTILLINGER	11
3.0 MATERIALER OG METODER	12
3.1 PRØVEMATERIALER	12
3.2 REAGENSER	12
3.3 UTSTYR	12
3.4 FREMGANGSMÅTE	13
3.5 METODEVALIDERING	13
3.5.1 Valg av valideringsparametre.....	13
3.5.2 Fremgangsmåte.....	14
3.6 BEREGNINGSFORMLER.....	15
4.0 RESULTATER OG DISKUSJON	16
4.1 METODEVALIDERING – KARL FISCHER-TITRERING	16
4.1.1 Riktighet	16
4.1.2 Linearitet.....	19
4.1.3 Nøyaktighet og repeterbarhet	22
4.1.4 Reproduserbarhet	23
4.1.5 Holdbarhet	24
4.1.6 Robusthet.....	25

4.1.7 Samlet vurdering av metodevalideringen	26
4.2 BESTEMMELSE AV VANNINNHOLD I FISKEOLJE, ENSILASJE, VANNFRAKSJON OG FISKEMEL	27
5.0 KONKLUSJONER	29
6.0 REFERANSER.....	30
7.0 VEDLEGG	32
7.1 RÅDATA.....	32
7.2 PROSEDYRE	36

1.0 Bakgrunn

Den blå økonomien, og økt økonomisk gevinst fra havet, er forventet å være en stor del av Norges økonomi i kommende år og dette stiller krav til forbedret bruk av havets ressurser. I tillegg til 'rene' fiskeprodukter brukt til mat og fôr, er såkalt restråstoff en viktig inntektskilde for den norske sjømatindustrien. I 2013 ga norsk restråstoff en omsetning på 2,5 milliarder norske kroner, og i 2016 ble det anslått at 688 000 tonn restråstoff ble utnyttet fra fiskeri- og havbruksnæringen i Norge [1]. Men selv om fisk og sjømat er å betrakte som sunn mat, så inneholder disse produktene også stoffer som ikke er ønskelige for human konsumpsjon eller i fôr. Dette kan være miljøgifter som for eksempel tungmetaller og dioksiner, som har negativ effekt på menneskelig helse [2].

Den europeiske union (EU) har satt en grense for maksimalt innhold av ulike miljøgifter i marine restråstoffprodukter [2]. Grensen EU har satt er oppgitt i pg/g 12 % moisture content. For å kunne sammenligne målte verdier av miljøgifter opp mot grensen til EU, er det nødvendig å ha samme benevnelse på resultatene. Vannmengden i produktene må være kjent for å kunne regne om til 12% moisture content [3][4].

Det finnes flere måter å bestemme vanninnholdet på, én av dem er Karl Fischer-titrering [5]. Et instrument som benytter seg av Karl Fischer-titrering er TitroLine® 7500 KF [6]. Hensikten med denne oppgaven er å metodevalidere dette instrumentet for å sikre metodens analytiske kvalitet og pålitelighet til å finne vannmengden i fiskeolje.

1.1 Marint restråstoff

Marint restråstoff er rester fra fisk og skalldyr, eksempelvis bein, hoder og annet slo, etter at ønskede deler har blitt fjernet, til eksempelvis matproduksjon [7]. Restproduktene fra fiskeindustrien kan benyttes til å produsere blant annet fiskeolje, gjødsel og dyrefôr [8]. Fiskeolje består i stor grad av mettede og umettede fettsyrer, og benyttes som kosttilskudd for humant bruk og som tilsetning i dyrefôr [9][10]. Vanninnholdet i fiskeolje forventes å være lite [11]. Ved tillaging av fiskeolje, kokes og presses rester fra fisk sammen. Ved pressing, vil væsken bestående av vann, olje og små fiskerester bli tilgjengelig. Fiskerestene fjernes, og vann og olje separeres før videre tilberedelse av oljen kan foregå. Vannet som fjernes kalles vannfraksjon [12]. Videre kan vannfraksjonen fordampes og tørkes, slik at proteinene er gjenværende. Proteinene brukes videre i tillaging av for eksempel fiskemel [13].

Andre marine restråstoffprodukt er ensilasje og fiskemel. Ensilasje består av hakkede fiskeprodukter og et konserveringsmiddel. Konserveringsmiddelet tilsettes for å bevare produktet, og det som brukes oftest er maursyre. Ensilasje blir benyttet i fôr og som gjødsel [14]. Fiskemel har et høyt proteininnhold og brukes i fôr til husdyr og oppdrettsfisk [15].

Restråstoffprodukter kan bli kontaminert under oppbevaring, transport og produksjon, eller på grunn av forurensing i marine økosystemer [16]. Miljøgifter er kjemikalier som er giftige og har lang nedbrytningstid i naturen [17]. Etter bestemmelse av miljøgiftmengden i restråstoffprodukter, bestemmes vanninnholdet for å omregne verdien til 12 % moisture content.

1.2 Metoder for bestemmelse av vanninnhold

Det finnes primære og sekundære metoder for å bestemme vanninnholdet i en prøve. Primære metoder måler faktisk vannmengde. Eksempler på metoder er destillasjon og tørking, som er fysisk separasjon av vann. Andre primære metoder er kvantitative kjemiske reaksjoner med vann, der to eksempler er Karl Fischer-titrering og produksjon av acetylen (C_2H_2) eller hydrogengass (H_2) [5].

Destillasjon er en ikke selektiv metode for vannbestemmelse, da andre vannløselige stoffer, eksempelvis etanol og glyserol, kan opptre på samme vis som vann i destillasjonsprosessen og føre til falskt forhøyet vanninnhold [18]. Tørkemetoder er enkle analyser å utføre, men ulempen med slike analyser er at massen av prøven før tørkeprosessen minus massen etter tørkeprosessen nødvendigvis ikke gir eksakt verdi på vanninnholdet, da andre flyktige stoffer også kan ha fordampet slik vann gjør [5]. Dette vil gi falskt forhøyet vanninnhold.

I den kjemiske metoden der gassene C_2H_2 eller H_2 blir produsert, reagerer vann henholdsvis med stoffene kalsiumkarbid (CaC_2) og kalsiumhydrid (CaH_2). Mengden gass som ansamles er proporsjonal med vanninnholdet. Ulempen med denne metoden er at gassvolumet er avhengig av temperatur og trykk.

Sekundære metoder gir et estimat over vanninnholdet. Slike analyser kan være fysisk bestemmelse av egenskaper som er avhengig av vannmengden, et eksempel er densitometri. Andre analyser er måling av karakteristiske egenskaper til vannmolekylet, her kan for eksempel NMR spektroskopi brukes. Analyser der det bestemmes egenskaper som er avhengig av vannmengden gir ofte uspesifikke mål på vanninnholdet, og kan kun benyttes ved prøver som

inneholder få komponenter. Analyser som måler karakteristiske egenskaper til vannmolekylet, registrerer for det meste kun fritt vann i prøven og derfor ikke faktisk vanninnhold [5].

Karl Fischer-titrering er en kvantitativ kjemisk metode som baserer seg på en spesifikk reaksjon med vann, ved bruk av redokstitrering. Den spesifikke reaksjonen er mellom vann og jod, samt svoveldioksid, en base og en alkohol. Metoden er selektiv og sammenlignet med andre metoder brukt til vannbestemmelse, vil ikke andre flyktige stoffer interferere eller ta del i reaksjonen under analysen. Titreringsmetoden er også sensitiv, det betyr at også små mengder av vann kan detekteres. Det er hensiktsmessig når prøvematerialet som skal analyseres inneholder lite vann, som for eksempel fiskeolje [18].

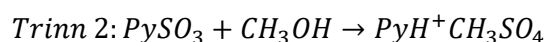
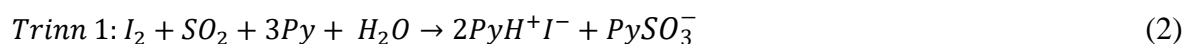
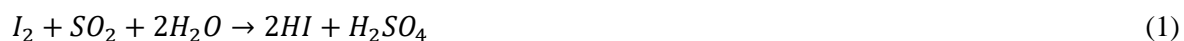
1.3 Karl Fischer-titrering

Karl Fischer-titrering er en titreringsmetode. Titrering er en kvantitativ kjemisk analyseteknikk som benytter en kjemisk reaksjon for å finne ukjent konsentrasjon av en analytt i en løsning [19]. En titrant, som er en løsning med kjent konsentrasjon, tilsettes løsningen med analytten, og det skjer en reaksjon mellom titrant og analytt. Tilsettelse av titrant skjer frem til reaksjonen har nådd endepunktet, hvor alt av analytten er omgjort. Reaksjonen i en titrering kan være en syre-base-reaksjon, en utfellingsreaksjon eller en redoksreaksjon [20]. Karl Fischer-titrering er en type redokstitrering [11].

En redoksreaksjon består av en oksidasjon og en reduksjon. Et molekyl vil gi fra seg elektroner, elektron donor, og blir selv oksidert, og et molekyl vil motta elektronene, elektronmottaker, og blir selv redusert. Dette prinsippet benyttes innen Karl Fischer-titrering, ved at det skjer en redoksreaksjon mellom jod og jodid [21].

1.3.1 Kjemisk reaksjon

Karl Fischer-titreringsprinsippet ble utviklet av kjemikeren Karl Fischer [11]. I utviklingen av prinsippet tok Fischer utgangspunkt i Bunsen-reaksjonen, se formel 1. For å nøytralisere syreproduktene svovelsyre (H_2SO_4) og hydrogenjodid (HI), ble basen pyridin (C_5H_5N , Py) tilsatt. Dette var nødvendig for å skyve likevekten mot høyre, på grunn av Le Châteliers prinsipp [22][20]. Ved tilsettelse av pyridin kom Fischer frem til en ny formel, men denne viste seg å ha ukorrekt støkiometrisk forhold. Smith, Bryant og Mitchell kom frem til det korrekte støkiometriske forholdet som er $H_2O : I_2 : SO_2 : \text{pyridin} : CH_3OH = 1 : 1 : 1 : 3 : 1$, vist i en tottrinsreaksjon, se formel 2 [23].



Verhoef og Barendrecht oppdaget senere at svoveldioksid (SO₂) ikke er den reaktive komponenten i reagenset, men heller forbindelsen (SO₃CH₃⁻) som svoveldioksid danner med metanol (CH₃OH) vist i formel 3. Pyridin, som tidligere ble benyttet til å nøytralisere syrer, kan byttes ut med andre egnede baser, da pyridin ikke har annen kjemisk effekt enn å være en buffer. Sammen med valgt base (RN) danner SO₂ og metanol et kompleks, vist i formel 4. Dette komplekset er med i den fullstendige ligningen som Verhoef og Barendrecht kom frem til, vist i formel 5 [23].



I formel 5 er metanol benyttet som alkohol, men metanol kan erstattes av andre egnede alkoholer uten at det vil påvirke støkiometrien. Dermed kan den mer generelle likningen vist i formel 6 benyttes. ROH er egnet alkohol og RN er egnet base [22]. R er en forkortelse for en alkyl- eller en arylgruppe [20].



Den generelle reaksjonsligningen viser at alkohol danner et kompleks med svoveldioksid, basen og oksygenet fra vannmolekylet. Jod reduseres til jodid og binder seg til basen. Siden det støkiometriske forholdet mellom jod og vann er 1:1, vil mengde detektert jod være proporsjonal med mengde vann i prøven [5].

1.3.2 Deteksjon

Prinsippet til Karl Fischer-titrering går ut på å benytte jod og jodid som redokspaar, for å bestemme vannmengden i en prøve. I en Karl Fischer-titrering kan det benyttes ulike teknikker for å detektere redoksreaksjonen til jod/jodid. Teknikkene er volumetrisk titrering og coulometrisk titrering [22].

Volumetrisk Karl Fischer-titrering foretrekkes når forventet vanninnhold i en prøve er 100 parts per million (ppm) til 100%. Prinsippet for volumetrisk titrering er at jod blir tilsatt prøven via en byrette under titreringen. Volumetrisk titrering benytter blant annet amperometrisk

detektering til å bestemme mengden analytt i prøven. Det betyr at spenning tilføres til en dobbel platinelektrode og det vil gå en strøm mellom elektrodene, som måles.

Når jod tilsettes til prøvekompartimentet, skjer det en reduksjon av jod til jodid ved katoden og ved anoden vil jodid bli oksidert til jod, se formel 7 og 8. Elektroner vandrer i kretsen, og det blir økt strøm. Når alt jod er redusert til jodid, går det ikke elektroner mellom elektrodene og strømmen vil falle til null, såkalt «dead stop». Dette fordi reduksjonen ved katoden opphører og det blir en økning i motstanden mellom elektrodene. I «dead stop» har titreringen nådd endepunktet [23][11].



Coulometrisk titrering er en annen teknikk for å detektere vanninnholdet i en prøve, og foretrekkes når forventet vanninnhold er mellom 1 ppm til 5%. Prinsippet for deteksjonen er at jod blir generert elektrokjemisk under titreringen, ved oksidasjon av jodid til jod ved anoden. Vanninnholdet i prøven vil være proporsjonal med mengden jod som genereres i den elektrokjemiske cellen og uttrykkes i elektrisk strøm (C) [22].

1.3.3 Løsemiddel

I utførelsen av en Karl Fischer-titrering er valg av korrekt løsemiddel en viktig faktor. Det er nødvendig at løsemiddelet har evne til å frigi vannet i prøven, da det kun er fritt vann som kan detekteres ved bruk av Karl Fischer-titrering [22]. Løsemiddelet som benyttes må være i støkiometrisk forhold 1:1 til analytten, og må ha evnen til å løse opp komponenter i prøven og produkter fra titreringen.

Metanol har god evne til å løse opp vann som er bundet til andre molekyler i prøven, og har også evne til å løse opp produktene som dannes under titreringen. Dermed hindrer metanol utfellinger som kan avsettes på elektroden og interferere med deteksjonen. Propanol og heksanol er løsemidler som er egnet for lipidiske stoffer, enten alene eller i løsning med metanol, og kan derfor være nødvendig å benytte ved titrering av oljer, som for eksempel fiskeolje [11] [22]. For uløselige faste stoffer, eksempelvis fiskemel, er det nødvendig med en ekstraksjonsprosess for å frigi vannet i prøven. Til ekstraksjonen kan prøven blandes med løsemiddelet formamid. I tillegg kan prøven mekanisk blandes eller være i ultrasonisk vannbad i en viss tid, for å ytterligere akselerere ekstraksjonsprosessen [22].

1.3.4 Standardisering

En standardisering, også kalt en titerbestemmelse, gjøres for å undersøke om konsentrasjonen til titranten er over oppgitt verdi for effektivitet [24]. Konsentrasjonen måles ved å se om et gitt volum av titranten vil finne en eksakt verdi av vann i prøven. Det benyttes en standardisert prøve med kjent konsentrasjon av vann til dette [25]. Konsentrasjonen til titranten kan endres hvis den blir utsatt for luft eller temperaturendringer, og derfor gjennomføres titerbestemmelse regelmessig. I tillegg til å finne konsentrasjonen til titranten vil en titerbestemmelse gi en indikasjon på om byretten fungerer, om titreringssystemet er tett og om endepunktet detekteres [22].

1.3.5 TitroLine® 7500 KF

TitroLine® 7500 KF er et automatisert Karl Fischer-titreringsinstrument som benytter volumetrisk titrering til bestemmelse av vanninnhold. Instrumentet består blant annet av en motorisert pistonbyrette, dobbel platinumelektrode og annet nødvendig titreringsutstyr. Instrumentet benytter seg av to typer reagenser; titrant og løsemiddel, såkalt «solvent». Titreringen gjennomføres med enten 1-komponent eller 2-komponent reagenser [6].

I 1-komponent reagens vil alle de reaktive komponentene være tilstede i titranten. Titranten inneholder jod, svoveldioksid og en base løst i en alkohol. Eksempelvis er en egnet base imidazole ($C_3H_4N_2$) og en egnet alkohol metanol. Løsemiddelet, «solvent», inneholder kun metanol. I 2-komponent reagens er de reaktive komponentene fordelt i to løsninger; titranten og løsemiddelet. Titranten inneholder kun jod løst i metanol, mens løsemiddelet inneholder svoveldioksid og imidazole løst i metanol.

Fordelen med 1-komponent reagens er at de er billigere å bruke, men de har mindre stabilitet og titreringen tar lengre tid enn med 2-komponent reagens. 2-komponent reagens har derimot stabilitet over lengre tid, som gir bedre holdbarhet, og blir derfor foretrukket.

Ulike titranter kan inneholde ulik mengde jod, eksempelvis Titrant 2, som inneholder 2 mg/mL jod, og Titrant 5, som inneholder 5 mg/mL jod. Titrant 2 benyttes når den forventede vannmengden er mindre enn 1000 ppm og Titrant 5 benyttes når den forventede vannmengden er 1000 ppm til 100% [22].

1.3.6 Beregning

For beregning av målt vannmengde ved bruk av Karl Fischer-titrering, benyttes formel 10. Det kreves en korrekt titerverdi til beregningen av vanninnholdet. For å bestemme denne verdien utføres det en titerbestemmelse med en vannstandard. Titerverdien bestemmes ved bruk av

formel 9. TitroLine® 7500 KF tar utgangspunkt i formlene nedenfor når vanninnholdet skal bestemmes, i tillegg benytter instrumentet konverteringsfaktorer. Instrumentet har muligheten til å gi ut vanninnholdet med benevningene (mL), (%) og (ppm) [6].

$$\text{Titerverdi (mg/mL)} = \frac{\text{Vannvekt (mg)}}{\text{Forbrukt volum titrant (mL)}} \quad (9)$$

$$\% - \text{vann} = \frac{\text{Forbrukt volum av titrant (mL)} * \text{titerverdi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * 100\%}{\text{Prøvevekt (g)}} \quad (10)$$

1.3.7 Eliminasjon av interferenser

Fuktighet

Siden Karl Fischer-titrering detekterer vann, vil fuktighet fra luften være en interfererende faktor. Fuktighet vil ha mulighet til å trenge inn i prøvekommeret ved tilsettelse av prøve eller trenge inn i reagenser ved preparering av analyseinstrumentet [11]. Dette vil påvirke analyseresultatet. For å eliminere dette, gjennomfører instrumentet TitroLine® 7500 KF en pretitrering, såkalt «conditioning», der det beregnes en drift-verdi [6]. Drift-verdien oppgis i µg/min og indikerer mengden vann som kommer inn i titreringssystemet over en gitt tid. Den beregnede drift-verdien trekkes fra det beregnede vanninnholdet i prøven. I tillegg har instrumentet et tørkemiddel, molekylsikt, som vil absorbere fuktighet fra både prøvekommer og reagenser [22].

pH

Karl Fischer-titrering utføres i pH-området 5,5 til 8. Basen imidazole forhindrer eventuelle dannelser av syreprodukter, og sørger for en stabil pH. pH under det optimale området fører til langsom titreringsreaksjon eller at titreringsreaksjonen ikke når endepunktet. En pH som er høyere enn 8 gjør at vanddeteksjon ikke er mulig, da et alkalisk miljø gir interferenser i form av sidereaksjoner [11].

Sidereaksjoner

Spesifikk deteksjon av vann er nødvendig for at det ikke dannes sidereaksjoner. Det er hovedsakelig tre sidereaksjoner som kan oppstå under en Karl Fischer-titrering; med metanol, med vann og med jod. Disse sidereaksjonene kan føre til at det detekteres falskt forhøyede eller falskt for lave mengder av vann i prøven [22]. Sidereaksjoner oppstår sjeldent [11].

En mulig sidereaksjon er mellom metanol og aldehyd, ketoner eller karboksylsyrer. Metanol kan reagere med aldehyder (acetaldannelse), ketoner (ketaldannelse) eller karboksylsyrer i prøven, og det dannes H₂O. Dette vil føre til falskt forhøyede verdier. For å eliminere disse sidereaksjonene brukes andre alkoholer enn metanol i løsemiddelet.

En annen mulig sidereaksjon er med vannet i prøven. Vann kan forbrukes ved at ketoner og aldehyder reagerer med svoveldioksid og basen i prøven, og danner bisulfitt, hvilket gir falskt for lav vannmengde. For å korrigere for sidereaksjonen kan titreringen blant annet startes rett etter tilsettelse av prøven, slik at bisulfitt ikke dannes [22].

Hvis prøvematerialet inneholder et oksidasjonsmiddel som kan oksidere jodid til jod, eksempelvis Cu^{2+} , Fe^{3+} og Cl_2 , vil jod som har blitt produsert reagere med vann i prøven og det vil detekteres falskt for lavt vanninnhold. Sidereaksjoner med jod kan også gi falskt forhøyede vannverdier og dette kan oppstå hvis prøvematerialet inneholder reduksjonsmidler, eksempelvis ammoniakk, eller ioner av thallium (Tl^+) eller tinn (Sn^{2+}), som fører til reduksjon av jod til jodid. Eliminering av sidereaksjoner med jod er vanligvis ikke mulig, og derfor bør det benyttes andre metoder til vannbestemmelse når det mistenkes at prøven inneholder oksidasjons- eller reduksjonsmidler [26].

1.4 Metodevalidering

Metodevalidering er undersøkelser av en metodes evne til å oppnå ønsket formål, og i hvor stor grad av sikkerhet analysesvaret kan sies å være korrekt. Eksempler på tester utført ved en metodevalidering er testing av parametre som riktighet, presisjon, spesifisitet, linearitet og robusthet. Hvilke parametre det testes på og antall ulike parametre som testes, avhenger av behovet til instrumentet eller metoden som skal valideres [27].

1.4.1 Riktighet og nøyaktighet

Riktighet er forskjellen mellom sann verdi og middelverdien til et utvalg prøver. Riktigheten testes for å undersøke om metoden gir korrekt svar. Dette gjøres ved å analysere prøver med kjent konsentrasjon. Konsentrasjonen til de kjente prøvene skal ha høy sikkerhet og dokumentert sporbarhet. Nøyaktighet tilsier i hvilken grad et svar avviker fra en kjent verdi. Nøyaktighet kan blant annet undersøkes ved å pipettere 20 paralleller av en prøve med kjent verdi [27].

1.4.2 Presisjon

Presisjon er et mål på overensstemmelsen mellom uavhengige paralleller av samme prøve. Presisjon angis som variasjonskoeffisient (CV) eller standardavvik (SD). Metodens presisjon vurderes ved å gjennomføre to ulike analyser; repeterbarhet og reproduserbarhet. Repeterbarhet er innen-serie presisjon. Denne kan undersøkes ved å se på differansen mellom verdiene til flere paralleller av den samme prøven. Differansen mellom parallellene må være lavere enn et satt

krav til analysens presisjon. Det er en forutsetning at målingene er utført med samme betingelser. Reproduserbarheten er mellom-serie presisjon og testes ved å utføre flere målinger av samme prøve med ulike betingelser, differansen mellom målingene må også falle innenfor et satt presisjonskrav [27].

1.4.3 Linearitet

Linearitet undersøkes med avhengige data for å kartlegge variablenes sammenheng. Linearitet kan undersøkes ved å velge prøver med kjent verdi, som strekker seg over et bredt konsentrasjonsområde, for deretter å plote verdiene inn i et diagram. En trendlinje trekkes mellom punktene i diagrammet, og ut ifra denne linjen vises en determinasjonskoeffisient (R^2) og en regresjonsligning. Determinasjonskoeffisienten benyttes til å beregne korrelasjonskoeffisienten (r) [27].

Korrelasjonskoeffisienten er et matematisk tall fra -1 til 1 som tilsier sammenhengen mellom to variabler. En verdi på 1 tilsvarer et fullstendig positivt lineært forhold mellom variablene, en verdi på -1 tilsvarer et fullstendig negativt lineært forhold, og en verdi på 0 tilsvarer et ikke-lineært forhold [28]. Ved ikke-lineære forhold kan det være at korrelasjonskoeffisienten ikke uttrykker noe meningsfullt. En verdi over $0,9975$ regnes som god korrelasjon, og vil si at det er et lineært forhold mellom variablene. Regresjonsligningen ($y = ax + b$) består av to konstanter a og b , der a er stigningstall og b er skjæringspunkt [27]. Hvis a har en verdi på 0 , betyr det at forholdet mellom x og y ikke er lineært avhengig. En forandring i x -verdier vil ikke påvirke y -verdier [29].

1.4.4 Overdraging

Overdraging, såkalt carry-over, er kontaminasjon fra tidligere målte prøver i instrumenter der det benyttes samme prøvekuvette eller prøvekammer. Ved høye konsentrasjoner av gitt analytt, kan det oppstå oppsamling i kuvetten. Det vil påvirke den neste prøven som skal analyseres på instrumentet. For å undersøke carry-over, kan det analyseres vekselvis prøver med høye og lave konsentrasjoner, og beregnes en verdi [27].

1.4.5 Gjenfinning

For å undersøke om det i løpet av preparering av prøven har blitt en redusert mengde analytt eller at sidereaksjoner har ført til en økning av analytten, kan det testes på metodens gjenfinning, såkalt «recovery». Dette gjøres ved å tilsette en kjent mengde analytt til prøven og undersøke hvor stor mengde av den samme analytten metoden klarer å gjenfinne [30].

1.4.6 Spesifisitet

Spesifisitet er metodens evne til å detektere kun det den skal detektere. Eksempelvis vil det si at ved måling av vannmengden, skal ikke andre analytter påvirke resultatet hvis metodens spesifisitet er god. For å undersøke metodens spesifisitet kan det tilsettes en kjent mengde analytt til en prøve og så måles konsentrasjonen til denne analytten. Deretter sammenlignes målt konsentrasjon med tilsatt konsentrasjon [27].

1.4.7 Holdbarhet

Undersøkelse av holdbarhet innebærer å se om lagring av prøven vil påvirke analyseresultatet. Dette gjøres ved å analysere en prøve rett etter prøvetaking, og sammenligne resultatet med resultatet fra målinger gjort på prøver som har stått til lagring. Betingelser for lagring, som for eksempel tidsrom eller oppbevaringssted, må bestemmes etter behov [27].

1.4.8 Robusthet

Robusthet vil si en metodes evne til å tåle endringer, uten at det påvirker resultatet. Endringer betyr fysikalske faktorer som spiller inn på det ytre forhold. Eksempler på faktorer er transport av prøver, skifte av reagenser, temperatur og pH. Eksempelvis vil en robust metode kunne detektere riktig analysesvar selv om reagenset skiftes [27].

2.0 Problemstillinger

Målet med oppgaven er å metodevalidere det automatiserte instrumentet TitroLine® 7500 KF som benytter Karl Fischer-titrering, samt å skrive en prosedyre for bruk av instrumentet. Følgende problemstillinger er utarbeidet:

- *Kan instrumentet TitroLine® 7500 KF valideres, med bruk av fiskeolje som prøvemateriale, ut ifra de kravene som er satt til de ulike metodevalideringsparametrene; riktighet, linearitet, nøyaktighet, repeterbarhet, reproduserbarhet, holdbarhet og robusthet?*
- *I hvilken grad er TitroLine® 7500 KF et egnet instrument til å bestemme vanninnholdet i de ulike marine restråstoffproduktene; fiskeolje, ensilasje, vannfraksjon og fiskemel?*

3.0 Materialer og metoder

3.1 Prøvematerialer

Matriksen som ble benyttet til de ulike analysene for metodevalideringen var fiskeolje. Fiskeoljen har batchnummer 63151904, og var allerede fordelt i alikvoter i små beholdere. Ved innledende forsøk, ble det oppdaget at vanninnholdet i de ulike beholderne varierte i betydelig grad. Det ble derfor bestemt å blande innholdet i beholderne i én stor beholder, kalt stor batch. I forsøket ble også fiskemel benyttet som prøvemateriale. I tillegg ble det analysert reelle prøver av fiskeolje, ensilasje og vannfraksjon.

3.2 Reagenser

Reagenser brukt for prøveopparbeidelse og titrering var alle Aquastar® reagens for Karl Fischer-titrering fra Merck (EMD Millipore Corporation, Tyskland). To forskjellige løsemiddel ble brukt; Solvent solvent for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents (Aquastar®. Nr.: 188015. Holdbarhet: 31.03.2020) og Solvent Oils & Fats Solvent for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents for oils and fats (Aquastar® Nr.: 188016. Holdbarhet: 31.08.2019). To forskjellige titranter ble også brukt; Titrant 2 titrant for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents 1 ml \triangleq ca. 2 mg H₂O (Aquastar®. Nr.: 188011. Holdbarhet: 30.11.2019) og Titrant 5 titrant for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents 1 ml \triangleq ca. 5 mg H₂O (Aquastar® Nr.: 188010. Holdbarhet: 31.03.2020). Til titerbestemmelse ble standardprøven Water Standard 1% (Aquastar®. Lot: HC72408552. Holdbarhet: 31.03.2022) benyttet. Til ekstraksjon av vann i fiskemel ble det brukt Formamide for analysis (EMSURE®. Nr.: 109684. 30.09.2019).

3.3 Utstyr

Utstyr som ble brukt var TitroLine® 7500 KF instrumentering for volumetrisk Karl Fischer-titrering (SI Analytics, Tyskland. Nr.: 10016557). Alle innveiinger av prøver ble utført med finvekt (Mettler Toledo, Sveits. Nr.: XE205TDR). Til uthenting av prøvemateriale ble det benyttet sprøyter (eks. 5 mL NORM-JECT Luer Look Henke Sass Wolf. Lot: 16G18C8. Holdbarhet: 2021-07). Til sentrifugering ble det benyttet en sentrifuge (Thermo Scientific, Tyskland. Nr.:41836389). Til ekstraksjon av vann i fiskemel ble det benyttet ultrasonisk vannbad (VWR Ultrasonic cleaner, Malaysia. Nr.: T2023SR 21662) og mekanisk blander (Heidolph Shakers & Mixers, Tyskland. Nr.: 200134538 0118).

3.4 Fremgangsmåte

Før de første prøvene ble analysert, ble det gjennomført en rensing av slangene, deretter ble det utført en titerbestemmelse av Titrant 2 (2 mg/mL I₂) og Titrant 5 (5 mg/mL I₂). Løsemiddelet var Solvent og Water Standard 1% ble benyttet som prøvemateriale, med et prøvevolum innenfor området 0,5 – 1 g for Titrant 2 og 1,5 – 2,0 g for Titrant 5. Tre paralleller ble benyttet til titerbestemmelsen og instrumentet beregnet automatisk middelvei og relativt standardavvik av de tre titer-verdiene. Ved analysing av fiskeolje ble Titrant 2 benyttet, siden vannmengden er forventet å være tilnærmet 0. Solvent for Oils and Fats ble benyttet som løsemiddel. Prøvevolumet var mellom 2 - 10 g. Prøvene som var i væskeform ble tatt opp med sprøyte. Vekten til prøven ble bestemt ved å veie sprøyten med prøvemateriale, før og etter tilsetning til instrumentets prøvekommer. Prøvens vekt ble lagt inn i instrumentet. Vanninnholdet i prøven bestemmes med volumetrisk titrering med amperometrisk deteksjon. Til analysing av fiskeolje ble det benyttet en sprøyte uten nål, siden fiskeolje er viskøst. Ved bruk av Water Standard 1% som prøvemateriale ble det benyttet sprøyte med nål. Til analysing av ensilasje og vannfraksjon ble prøvene sentrifugert (4000 RPM, 10 min) og supernatanten ble benyttet.

3.5 Metodevalidering

3.5.1 Valg av valideringsparametre

Følgende valideringsparametre ble valgt; linearitet, riktighet, nøyaktighet, holdbarhet, repeterbarhet, reproduserbarhet og robusthet. Linearitet ble valgt for å undersøke sammenhengen mellom vekten til prøven og detektert vannmengde. Riktighet ble valgt for å se om den valgte metoden har evnen til å finne sann verdi av Water Standard 1%, siden den blir benyttet i bestemmelsen av titer-verdien. Faller riktighetsanalysen innenfor de oppgitte kravene, kan detektert mengde vann i prøver antas å være det samme som faktisk mengde vann i prøven. Nøyaktighet ble deretter undersøkt for å vite om vannmengden i fiskeoljen er korrekt. Holdbarhet ble undersøkt for å se om ulike betingelser for oppbevaring av fiskeoljen, gir endret vanninnhold. For å undersøke om metoden har god presisjon, ble det valgt å undersøke metodens repeterbarhet. Reproduserbarheten er også et mål for presisjon og ble valgt for å undersøke om vannmengden i prøvene ble det samme når to ulike analytikere analyserte samme prøve over tre ulike dager. For å undersøke om en endring i prøvevolumet vil påvirke den detekterte vannmengde i fiskeolje, ble robustheten undersøkt. Det ble ikke valgt å gjøre en undersøkelse av carry-over da instrumentet gjennomfører en «conditioning» før hver analyse,

og denne vil fjerne vannet som er igjen fra forrige prøve. Recovery- og spesifisitetsundersøkelse ble ikke utført grunnet at en oljestandardprøve ikke var tilgjengelig.

3.5.2 Fremgangsmåte

Riktighet

Riktighetsanalysen ble utført ved å analysere åtte paralleller av Water Standard 1% med både Titrant 2 og Titrant 5. Sann verdi for Water Standard 1 % er 1,00 %. Til analysen der Titrant 2 ble benyttet, ble det brukt et prøvevolum på 0,5 – 1 g. Ved bruk av Titrant 5 ble det benyttet et prøvevolum på 1,5 – 2 g. Kravet til riktighetsanalysen er et %-avvik fra sann verdi på $\pm 15 \%$ og en CV (%) $\leq 10 \%$.

Linearitet

En linearitetsanalyse ble utført ved å analysere seks paralleller av fiskeolje i seks ulike vektnivå. Ifølge applikasjonen «Water determination according to Karl Fischer in organic liquids» utarbeidet av SI Analytics, anbefales det en prøvemengde innenfor området 2 til 10 g, hvis det forventes å finne en vannmengde på 100 til 500 ppm i prøven [31]. Det ble valgt fire vektnivåer innenfor det anbefalte området, henholdsvis 3 g, 5 g, 7 g og 9 g. I tillegg ble det testet på to vektnivåer utenfor den anbefalte volummengden, et lavere, 1 g, og et høyere enn anbefalt område, 11 g. Det ble valgt å ta vektnivåer utenfor og innenfor det anbefalte område for å undersøke om lineariteten til metoden er god innenfor anbefalt volumområde, og om denne lineariteten endres med bruk av volum utenfor dette volumområdet. Kravet til korrelasjonskoeffisienten er $r \geq 0,9975$.

Nøyaktighet og repeterbarhet

En nøyaktighetsanalyse og en repeterbarhetsanalyse ble utført ved å analysere seks paralleller av fiskeolje, med et prøvevolum på 3 g. CV mellom parallellene ble beregnet for å få grad av repeterbarhet. Kravet til repeterbarhet er CV (%) på $\leq 10 \%$. Kravet til nøyaktighetsanalysen er en middelverdi på $\pm 15 \%$ fra teoretisk verdi. Siden teoretisk verdi for fiskeoljen ikke er tilgjengelig, har det blitt valgt å sammenligne resultatet med et annet laboratorium, SINTEF Ocean, som benytter samme metode (Karl Fischer-titrering) og prøve (fiskeolje). %-avvik mellom resultatene ble beregnet for å få grad av nøyaktighet.

Reproduserbarhet

En reproduserbarhetsanalyse ble utført ved å analysere seks paralleller av fiskeolje, med et prøvevolum på 3 g, og gjenta dette to dager til. Resultatene fra dag 1, dag 2 og dag 3 sammenlignes og variasjonskoeffisienten beregnes. Analysen utføres av to ulike analytikere, og resultatene fra analyseringen til hver analytiker sammenlignes med hverandre og %-avvik

mellom middelverdiene beregnes. Kravet til analysen er en CV (%) på $\leq 20\%$ og et %-avvik på $\leq 20\%$.

Holdbarhet

En holdbarhetsanalyse ble utført ved å analysere seks paralleller av fiskeolje (dag 0), med et prøvevolum på 3 g. Prøven ble splittet i to alikvoter og oppbevart syv dager i kjøleskap fra dag 0, den ene med lokk og den andre uten lokk. Etter syv dager ble seks paralleller av begge alikvotene analysert, og sammenlignet med resultatene fra dag 0. Kravet til holdbarhetsanalysen er et %-avvik fra dag 0 $\leq 15\%$.

Robusthet

Robusthetsanalysen ble utført ved å analysere seks paralleller av fiskeolje med et prøvevolum på 3 g og 9 g. Kravet til denne analysen er et %-avvik på $\leq 20\%$ mellom middelverdien til prøvevolumene.

3.6 Beregningsformler

Beregning av middelerdi (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (11)$$

Beregning av standardavvik (SD):

$$SD = \sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (12)$$

Beregning av variasjonskoeffisient (CV):

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\% \quad (13)$$

Beregning av %-avvik fra sann verdi (bias):

$$Bias (\%) = \frac{|\bar{x} - x_{sann}|}{x_{sann}} * 100\% \quad (14)$$

Beregning av korrelasjonskoeffisient (r):

$$r = \sqrt{R^2} \quad (15)$$

Beregning av %-avvik:

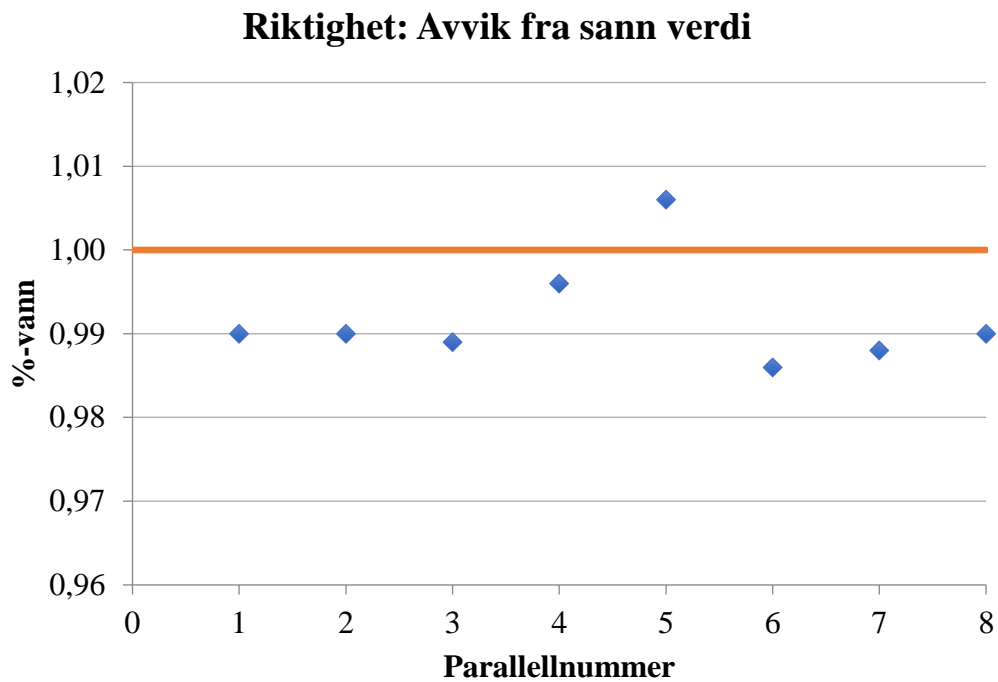
$$\% - avvik = \frac{X_1 - X_2}{\left(\frac{X_1 + X_2}{2}\right)} * 100\% \quad (16)$$

4.0 Resultater og diskusjon

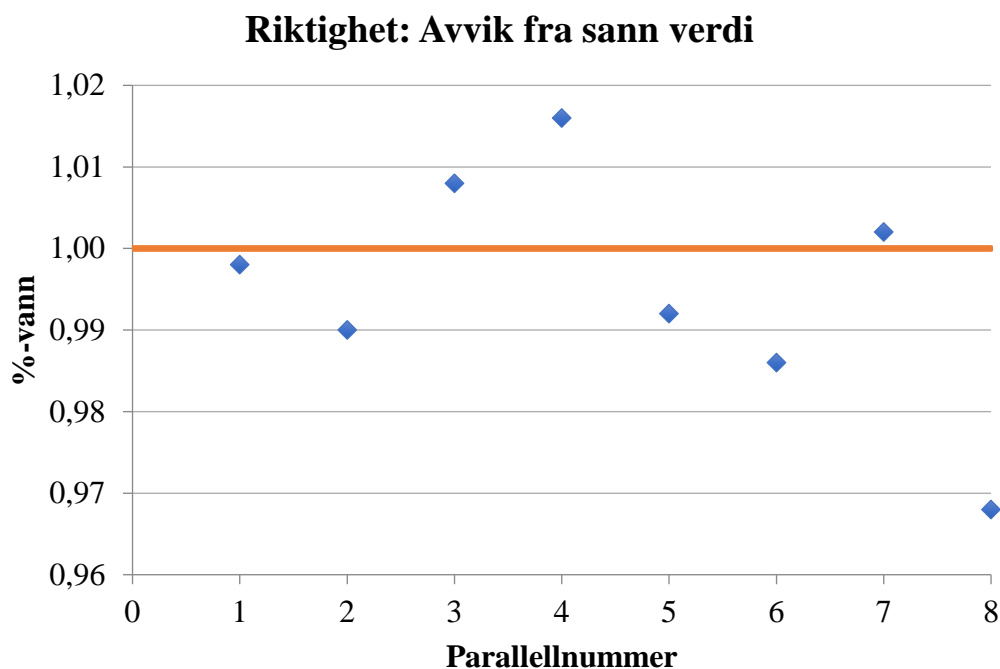
4.1 Metodevalidering – Karl Fischer-titrering

4.1.1 Riktighet

Vanninnholdet i åtte paralleller av Water Standard 1% ble bestemt for å undersøke riktighet. Dette ble gjort med både Titrant 2 og med Titrant 5 som titrant. Figur 1 og figur 2 viser avviket fra sann verdi for de åtte parallellene av Water Standard 1%. Sann verdi for standarden er 1,00%.



Figur 1: Avvik fra sann verdi for åtte paralleller av Water Standard 1% titrert med Titrant 2, for undersøkelse av graden av riktighet. Den oransje linjen viser sann verdi til Water Standard 1%, som er 1,00%.



Figur 2: Avvik fra sann verdi for åtte paralleller av Water Standard 1% titrert med Titrant 5, for undersøkelse av graden av riktighet. Den oransje linjen viser sann verdi til Water Standard 1%, som er 1,00%.

Tabell 1 viser beregnet %-bias og CV for Water Standard 1% titrert med Titrant 2 og Titrant 5. Verdiene av %-vann og beregnet middelerverdi vises i vedlegg 7.1 Rådata.

Tabell 1: Riktighet uttrykt som bias og presisjon uttrykt som CV.

Titrant	n	Bias (%)	CV (%)
Titrant 2	8	0,81	0,64
Titrant 5	8	0,50	1,48

n = antall paralleller. Karl Fischer-titrering med bruk av Water Standard 1% som prøvemateriale. Titrant 2 inneholder 2 mg/mL jod. Titrant 5 inneholder 5 mg/mL jod.

Til beregning av CV (%) benyttes middelerverdi og standardavvik.

Beregningseksempel av middelerverdi, tallene er parallellene analysert med Titrant 2:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{0,990 + 0,990 + 0,989 + 0,996 + 1,006 + 0,986 + 0,988 + 0,990}{8} = 0,992$$

Beregningseksempel av SD, beregnet ut fra verdiene målt med bruk av Titrant 2:

$$\begin{aligned}SD &= \sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \\&= \sqrt{\frac{(0,990 - 0,992)^2 + (0,990 - 0,992)^2 + (0,989 - 0,992)^2 + (0,996 - 0,992)^2 + (1,006 - 0,992)^2 + (0,986 - 0,992)^2 + (0,988 - 0,992)^2 + (0,990 - 0,992)^2}{8}} \\&= 5,97 * 10^{-3}\end{aligned}$$

Årsaken til at SD ikke er lik som i tabell 1, er fordi det benyttes en middelvei med flere desimaler i Excel, enn i eksempelet over.

Beregningseksempel av CV (%):

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\% = \frac{6,38E-03}{0,992} * 100\% = 0,64\%$$

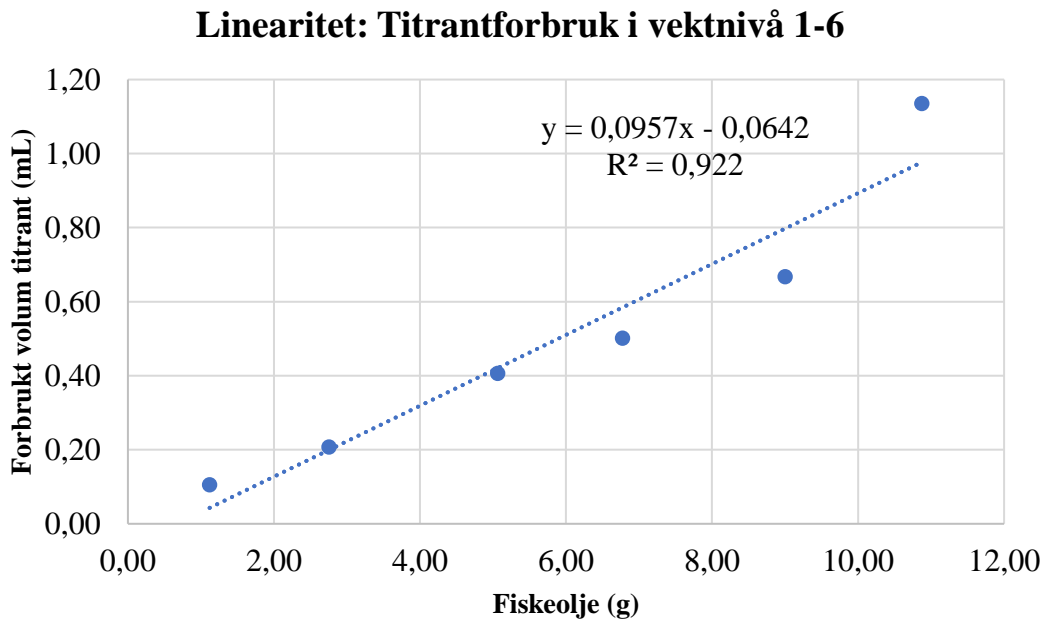
Beregningseksempel for bias (%):

$$Bias (\%) = \frac{|\bar{x} - x_{sann}|}{x_{sann}} * 100\% = \frac{|0,992\% - 1,00\%|}{1,00\%} * 100\% = 0,81\%$$

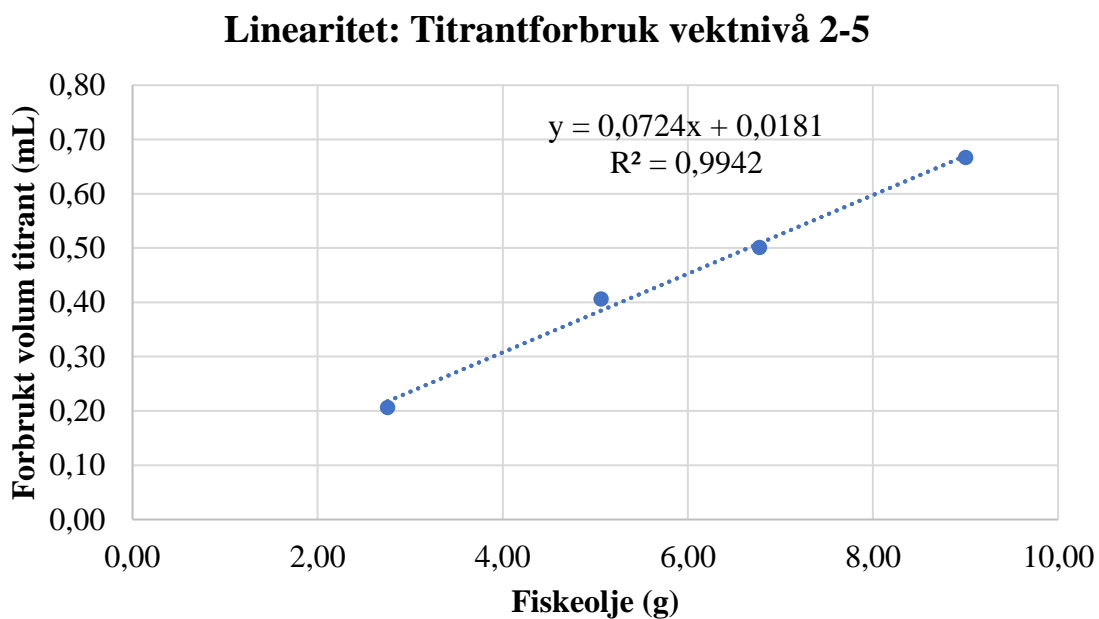
Riktighetsundersøkelsen viser god riktighet ved bruk av både Titrant 2 og Titrant 5 som titrant og Water Standard 1 % som vannstandard, se figur 1 og 2. Beregnet %-bias ved bruk av Titrant 2 ble 0,81 %, og beregnet %-bias ved bruk av Titrant 5 ble 0,50 %, se tabell 1, noe som er innenfor angitt krav på $\pm 15\%$ av sann verdi. God riktighet betyr i praksis at metoden har god evne til å detektere vannmengden som er kjent fra vannstandard, både ved bruk av Titrant 2 og Titrant 5. Begge variasjonskoeffisientene, se tabell 1, er innenfor kravet på $CV (\%) \leq 10\%$. Dette viser at variasjonen mellom parallellene er lav, noe som underbygger påliteligheten til %-bias verdiene.

4.1.2 Linearitet

Linearitetsanalysen ble utført med seks ulike vektnivå; fire nivåer innenfor og to nivåer utenfor det anbefalte vektområdet på 2-10 gram. Figur 3 og figur 4 viser korrelasjonen mellom vekt av fiskeolje (g) og forbrukt volum titrant (mL) i henholdsvis vektnivå 1-6 og vektnivå 2-5.



Figur 3: Korrelasjonen mellom vekt av fiskeolje (g) og forbrukt volum titrant (mL) med resulterende regresjonsligning og determinasjonskoeffisient (R^2). Seks paralleller er analysert i hvert nivå med bruk av Karl Fischer-titrering.



Figur 4: Korrelasjonen mellom vekt av fiskeolje (g) og forbrukt titrant (mL). Seks paralleller er analysert i hvert nivå, med bruk av Karl Fischer-titrering.

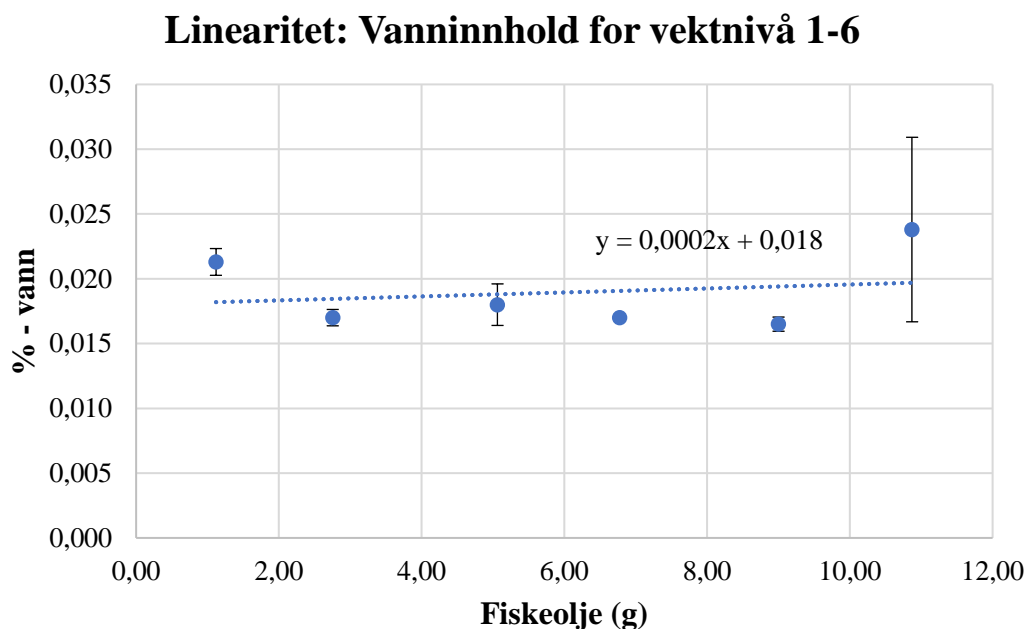
Determinasjonskoeffisienten til regresjonsligningen er 0,922, i figur 3. Ut ifra determinasjonskoeffisienten ble korrelasjonskoeffisienten beregnet.

$$r = \sqrt{R^2} = \sqrt{0,922} = 0,960$$

Korrelasjonskoeffisienten er på 0,960. Kravet for optimal korrelasjon er $r \geq 0,9975$. Det indikerer at det ikke er optimal korrelasjon mellom vekt av fiskeolje og forbrukt volum av titrant for vektnivå 1-6. Årsaken kan skyldes at det i linearitetsanalysen ble valgt å ta med to vektnivåer utenfor det anbefalte området.

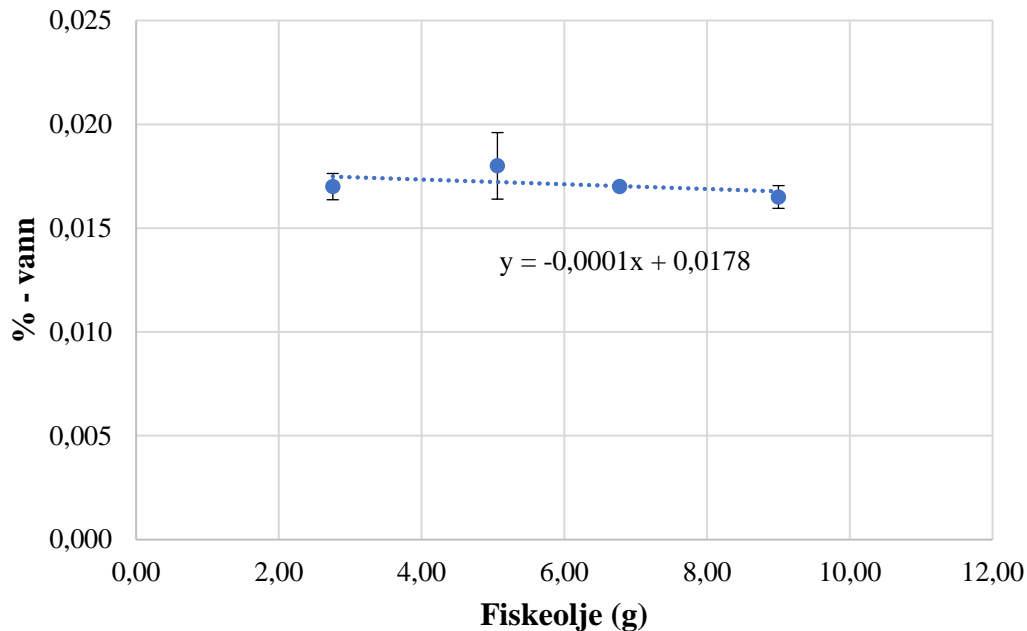
Determinasjonskoeffisienten, i figur 4, er 0,9942, det gir en korrelasjonskoeffisient på 0,9971. Dette er ikke innenfor kravet. Denne korrelasjonskoeffisienten er høyere enn den for vektnivå 1-6 og dette kan skyldes at sistnevnte inneholder vektnivåer som er utenfor det anbefalte området. Da korrelasjonen mellom forbrukt volum titrant og vekt av prøven ikke sier noe om detektert vannmengde, er korrelasjonskoeffisientene trolig ikke av stor betydning i metodens pålitelighet til å detektere vanninnhold.

Figur 5 og figur 6 viser korrelasjonen mellom henholdsvis vektnivå 1-6 og 2-5 av fiskeolje og vanninnhold.



Figur 5: Korrelasjonen mellom vekt av fiskeolje (g) og vanninnhold (%) med resulterende regresjonsligning. Analyserte seks paralleller per vektnivå, der to nivå er utenfor og fire nivå er innenfor anbefalt vektområde, med bruk av Karl Fischer-titrering. Variasjonen til hvert punkt vises i diagrammet.

Linearitet: Vanninnhold for vektnivå 2-5



Figur 6: Korrelasjonen mellom vekt av fiskeolje (g) og vanninnhold (%) med resulterende regresjonslikning. Analyserte seks paralleller per nivå, der alle fire nivå er innenfor anbefalt vektområde, med bruk av karl Fischer-titrering. Variasjonen til hvert punkt vises i diagrammet.

Tabell 2 viser presisjonen mellom de ulike nivåene i linearitetsanalysen.

Tabell 2: Presisjon uttrykt som CV i linearitetsanalysen av fiskeolje med Karl Fischer-titrering.

Vekt av fiskeolje	n	Vanninnhold, \bar{x} (%)	SD	CV (%)
Nivå 1-6	6	0,019	2,95E-03	15,59
Nivå 1-5	6	0,018	1,94E-03	10,83
Nivå 2-5	6	0,017	6,29E-04	3,67

Nivå 1 = 1 g. Nivå 2 = 3 g. Nivå 3 = 5 g. Nivå 4 = 7 g. Nivå 5 = 9 g. Nivå 6 = 11 g.

n = antall paralleller i hvert nivå.

Linearitetsanalysen tilsier at det ikke er et lineært forhold mellom målt %-vannmengde og vekt av fiskeolje, se figur 5 og 6. Stigningstall på 0 indikerer et ikke-lineært forhold mellom variablene som undersøkes. For vektnivå 2-5 er stigningstallet (a) -0,0001, som er tilnærmet 0. For vektnivå 1-6 er stigningstallet 0,0002 som også er tilnærmet 0. Årsaken til at stigningstallet for nivå 1-6 også er tilnærmet 0, er trolig fordi de fire verdiene, som er innenfor vektnivået, vektet større enn de to verdiene som er utenfor, når trendlinjen skal trekkes.

Selv om figurene 5 og 6 viser et ikke-lineært forhold mellom %-vann og vekt, viser CV, i tabell 2, at variasjonen i nivåene 1-6 og 1-5 er høyere enn for vektnivå 2-5. Økt CV for vektnivå 1-6 og 1-5 skyldes at %-vannverdien for nivå 1 og nivå 6 avviker fra verdiene til de resterende nivåene, se vedlegg 7.1 Rådata. Det kan derfor tenkes at vektnivå 2-5 gir et mer korrekt svar enn nivå 1 og 6.

4.1.3 Nøyaktighet og repeterbarhet

For å undersøke nøyaktighet og repeterbarhet ble det benyttet rådata fra linearitetsanalysen, se vedlegg 7.1 Rådata. Fiskeoljen ble også analysert hos SINTEF Ocean og den verdien blir sammenlignet med det oppnådde resultatet i denne analysen. Tabell 3 viser nøyaktighet uttrykt som %-avvik og repeterbarhet uttrykt som CV, for analysering av fiskeolje med seks paralleller.

Tabell 3: Presisjon uttrykt som CV og nøyaktighet uttrykt som %-avvik fra SINTEF Ocean sin verdi i bestemmelse av vanninnhold i fiskeolje med bruk av Karl Fischer-titrering.

Parallellnummer	Vanninnhold (%)
1	0,017
2	0,017
3	0,017
4	0,017
5	0,018
6	0,016
Middelverdi (%)	0,017
SD	6,32E-04
CV (%)	3,72
Middelverdi (%) fra SINTEF Ocean (n = 3)	0,017
%-avvik fra SINTEF Ocean	0

Resultater hentet fra linearitetsundersøkelsen vektnivå 2 (3 g). Benyttet prøvemateriale var fiskeolje, det ble analysert seks paralleller med bruk av Karl Fischer-titrering. Hos SINTEF Ocean ble samme fiskeolje analysert, med tre paralleller, og samme type instrument ble benyttet.

Beregningseksempel for %-avvik:

$$\% - \text{avvik} = \frac{X_1 - X_2}{\left(\frac{X_1 + X_2}{2}\right)} * 100\% = \frac{0,017 - 0,017}{\left(\frac{0,017 + 0,017}{2}\right)} * 100\% = 0\%$$

Resultatene fra repeterbarhetsundersøkelsen, tabell 3, viser at metoden har god repeterbarhet, dette vises med CV på 3,72 % som er under satt krav på CV (%) ≤ 10 %. Dette tyder på at metoden har god innen-serie presisjon. Beregnet %-avvik er 0 %, som tilsier at graden av nøyaktighet mellom resultat oppnådd og SINTEF Oceans resultat er innenfor gitt krav.

4.1.4 Reproduserbarhet

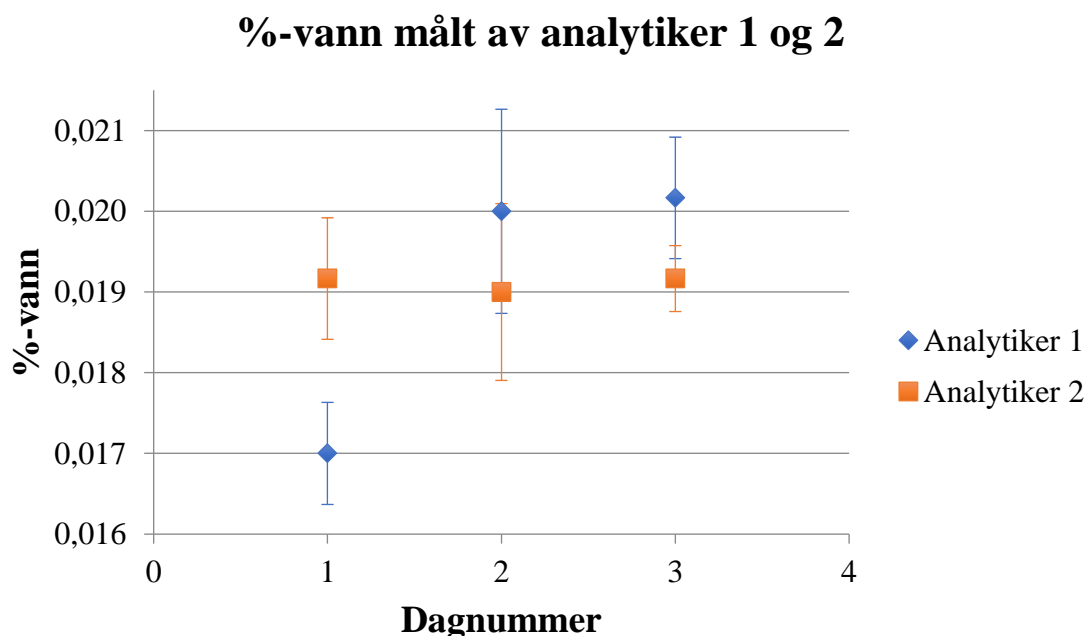
Reproduserbarhet ble undersøkt av to ulike analytikere over tre ulike dager. Tabell 4 viser mellom-serie presisjon for reproduserbarhetsanalysen. Verdiene benyttet til beregningene vises i vedlegg 7.1 Rådata.

Tabell 4: Mellom-serie presisjon uttrykt som CV.

Serie	Vanninnhold, \bar{x} (%)	SD	CV (%)	%-avvik
Analytiker 1	0,019	1,78E-03	9,35	-
Analytiker 2	0,019	9,62E-05	0,50	-
Mellom analytiker 1 og analytiker 2	0,019	3,93E-05	-	0,29

Karl Fischer-titrering med fiskeolje som prøvemateriale (3 g). Serie = hver analytiker analyserte seks paralleller på tre ulike dager, totalt 18.

Figur 7 viser middelverdien for %-vann for hver analysedag utført av analytiker 1 og 2.



Figur 7: Diagrammet viser middelverdien av %-vann, av seks paralleller, analysert på dag 1, dag 2 og dag 3, for både analytiker 1 og analytiker 2. Det ble utført Karl Fischer-titrering med fiskeolje som prøvemateriale. Variasjonen til hvert punkt er vist i diagrammet.

Beregnet CV for mellom-serie resultatene utført av analytiker 1 og analytiker 2 viser at variasjonen er mindre enn satt krav på CV (%) ≤ 20 %. Mellom-serie presisjonen for analysen utført av analytiker 2 anses som god da CV for analysen er på 0,50 %, se tabell 4. CV for analysen utført av analytiker 1 er 9,35%, noe som er høyere enn CV utført av analytiker 2, men fortsatt innenfor kravet. Grunnen til den høye variasjonskoeffisienten kan skyldes middelverdien fra parallellene analysert på dag 1, da denne ser ut til å være noe lavere enn dag 2 og dag 3 utført av analytiker 1, se figur 7.

En lavere målt vannmengde på dag 1 hos analytiker 1, kan skyldes at analysen ble utført samme dag som den store batchen ble laget. Prøvematerialet som ble benyttet til analysene utført på dag 2 og dag 3 for analytiker 1, og dag 1-3 for analytiker 2, hadde blitt oppbevart i den store beholderen i over én dag. Det kan tenkes at verdiene, av %-vann, har blitt høyere etter dagen den store batchen ble laget. Grunnen til dette kan være at luften tilstede i flasken før oljen ble tilsatt, har tilført oljen fuktighet. Etter en dag vil fuktigheten fra luften hatt tid til å trekke inn i oljen og føre til økt verdi av %-vann. En annen årsak til den lavere verdien kan være at batchen ikke var tilstrekkelig homogen grunnet en eventuell ufullstendig blanding av batchen første dag. Ved dårlig blanding kan det hende at uthentet prøvematerialet ikke er representativt for hele batchen.

Beregnet middelverdi for %-vann for de respektive dagene utført av begge analytikerne ble 0,019 % og %-avviket mellom middelverdiene ble beregnet til 0,29 %, se tabell 4. Dette faller innenfor kravet på %-avvik ≤ 20 % og anses som god presisjon. Dette betyr i praksis at ulike betingelser som analysedag og analytiker ikke påvirker presisjonen til metoden.

4.1.5 Holdbarhet

I holdbarhetsanalysen ble seks paralleller av fiskeolje analysert på dag null. Dette ble brukt som utgangspunktverdi. I tillegg ble det analysert seks paralleller av fiskeolje oppbevart i kjøleskap med og uten lokk i syv dager. Tabell 5 viser %-avvik fra dag null til dag syv.

Tabell 5: Holdbarhet i kjøleskap uttrykt med %-avvik fra dag null til dag syv.

Fiskeolje	n	%-avvik
Oppbevart med lokk	6	5,83 %
Oppbevart uten lokk	6	65,05 %

n = antall paralleller. Bestemmelse av vanninnhold med Karl Fischer-titrering med fiskeolje som prøvemateriale. Prøvene ble oppbevart i syv dager i kjøleskap, med og uten lokk. %-avvik er beregnet fra dag 0 som utgangspunktverdi.

Holdbarhetsanalysen viser at ved oppbevaring med lokk var %-avviket mellom middelverdien til dag 0 og middelverdien til prøven med lokk på 5,83 %. Kravet til analysen er et %-avvik fra dag 0 på ≤ 15 %. Prøven som har stått uten lokk i kjøleskap i syv dager, har et %-avvik på 65,05 %, dette er utenfor kravet og indikerer at prøver som blir oppbevart uten lokk får forhøyet vanninnhold. Årsaker til det forhøyede innholdet kan være at prøven kommer i kontakt med luft og dermed vil det komme fuktighet i prøven som øker vanninnholdet.

4.1.6 Robusthet

Robusthetsanalysen gikk ut på å undersøke om vannmengden ble målt til den samme ved å velge to ulike prøvevolumer: et fra nedre sjikt (3 g) og et fra øvre sjikt (9 g) fra det anbefalte vektområdet på 2-10 g. Tabell 6 viser %-avviket mellom nedre og øvre sjikt.

Tabell 6: Robusthet uttrykt med %-avvik mellom nedre og øvre sjikt.

	Vanninnhold, \bar{x} (%)	SD	CV (%)	%-avvik
Nedre sjikt	0,0170	6,32E-04	3,72	-
Øvre sjikt	0,0165	5,48E-04	3,32	-
Sammenlignet	0,0168	3,54E-04	-	2,98

Nedre sjikt = 3 g. Øvre sjikt = 9 g. Vektområdet er 2-10 g. Karl Fischer-titrering med fiskeolje som prøvemateriale, seks paralleller i hvert sjikt.

Robusthetsundersøkelsen viser at målt vanninnhold av fiskeolje med et prøvevolum på 3 g og et prøvevolum på 9 g gir et %-avvik på 2,98 %. Dette er under kravet %-avvik ≤ 20 %. Undersøkelsen viser at ulikt prøvevolum innenfor anbefalt område detekterer %-vann med liten grad av variasjon.

4.1.7 Samlet vurdering av metodevalideringen

Tabell 7 viser en oversikt over metodevalideringsparametrene, med tilhørende krav og vurdering.

Tabell 7: Samlet vurdering over metodevalideringsparametrene. Utført med Karl Fischer-titrering.

Metodevalideringsparameter	Krav	Vurdering
Riktighet	%-avvik fra sann verdi $\pm 15 \%$ CV (%) $\leq 10 \%$	OK
Linearitet	$r \geq 0,9975$	-*
Repeterbarhet	CV (%) $\leq 10 \%$	OK
Nøyaktighet	% - avvik $\pm 15 \%$	OK
Reproduserbarhet	CV (%) $\leq 20 \%$ % - avvik $\leq 20 \%$	OK
Holdbarhet	% - avvik fra dag 0 $\leq 15 \%$	OK
Robusthet	% - avvik $\leq 20 \%$	OK

Fiskeolje ble benyttet som prøvemateriale for alle analyser unntatt riktighetsanalysen. Water Standard 1% ble benyttet i riktighetsanalysen.

** Sammenhengen mellom vekt av fiskeolje og %-vann ga ingen korrelasjonskoeffisient som fortalte noe meningsfullt.*

Alle metodevalideringsanalysene faller innenfor de fastsatte kravene. Siden linearitetsanalysen som viser sammenhengen mellom forbrukt volum titrant og vekt av prøven ikke forteller noe om detektert vannmengde, blir den ikke vektlagt i den samlede vurderingen av metodevalideringen. Linearitetsanalysen mellom vekt av fiskeolje og detektert vannmengde viste et ikke-lineært forhold mellom variablene. Siden kravet for korrelasjonskoeffisienten er satt til et lineært forhold, er det ikke relevant å sammenligne korrelasjonskoeffisienten opp mot kravet. Årsaken til de godkjente resultatene kan være fordi metoden baserer seg på en spesifikk reaksjon mellom jod og vann. Til sammenligning med andre metoder for vannbestemmelse er Karl Fischer-titrering en selektiv metode, noe som hindrer at sidereaksjoner gir falske resultater. I tillegg gjennomfører instrumentet «conditioning» før hver analysering noe som eliminerer eventuell fuktighet. Titrering er en teknikk som, utført manuelt, krever stor grad av nøyaktig arbeid. TitroLine® 7500 KF er automatisert, med både motorisert pistonbyrette, til tilsetning av titrant, og dobbel platinumelektrode, til deteksjon, som eliminerer sjansen for menneskelig feil.

Generelt kan det vurderes om det har blitt benyttet et tilstrekkelig antall paralleller i de ulike metodevalideringsanalysene. I flere av analysene ble det benyttet seks paralleller og resultatene viser en CV som er innenfor kravet for innen-serie presisjon. Dette kan indikere at antall paralleller har vært tilstrekkelig for den analysen. På en annen side kunne et høyere antall paralleller vist et eventuelt større utslag i verdiene. Grensen for antall paralleller ble satt med hensyn til tidsbruk og mengden prøvemateriale som benyttes.

4.2 Bestemmelse av vanninnhold i fiskeolje, ensilasje, vannfraksjon og fiskemel

I etterkant av valideringen ble vanninnholdet i et utvalg fiskeolje-, ensilasje- og vannfraksjonsprøver bestemt med TitroLine® 7500 KF. Tabell 8 viser målt vanninnhold i seks fiskeoljeprøver, tabell 9 viser målt vanninnhold i fire vannfraksjonsprøver og tabell 10 viser målt vanninnhold i fjorten ensilasjeprøver.

Tabell 8: Målt vanninnhold (%) i fiskeoljeprøver, med 3 paralleller, ved bruk av Karl Fischer-titrering.

Fiskeoljeprøvenummer	n	Vanninnhold (%)
7	3	0,199
8	3	0,204
9	3	0,197
10	3	0,187
11	3	0,202
12	3	0,206

Tabell 9: Målt vanninnhold (%) i vannfraksjonprøver ved bruk av Karl Fischer-titrering.

Vannfraksjonprøvenummer	Vanninnhold (%)
11	94,047
12	99,851
13	96,488
14	101,022

Tabell 10: Målt vanninnhold (%) i ensilasjeprøver ved bruk av Karl Fischer-titrering.

Ensilasjeprøvenummer	Vanninnhold (%)
1	0,266
2	0,237
3	0,235
4	0,248
5	0,244
6	0,281
7	0,256
8	0,255
9	0,264
10	0,257
11	0,259
12	0,262
13	0,525
14	0,382

Det har ikke blitt utført metodevalidering med bruk av ensilasje og vannfraksjon som prøvemateriale. Det ble analysert kun én parallell av prøvene, og det er dermed ikke mulig å si noe om presisjonen til disse prøvene, og det ligger dermed usikkerhet i resultatene. Siden prøvene sentrifugeres før de løses opp i prøvekompartimentet, og det er supernatanten som benyttes som prøvemateriale, kan det være vann bundet til komponenter i bunnfallet som ikke detekteres. Likevel kan det tenkes at resultatene er pålitelige da analysert materiale fra ensilasje har et innhold som ligner fiskeolje. I tillegg er riktighetsanalysen utført med en vannstandard som viser til at metoden har god evne til å finne korrekt verdi av vann. Dette kan da generaliseres, med mindre komponenter i matrisen påvirker titreringsreaksjonen.

Fiskemel

Fiskemel ble også benyttet som prøvemateriale. Det lyktes ikke å oppløse fiskemelet og dermed ble detektert vannmengde lavere enn forventet vannmengde. Det ble forsøkt å løse opp fiskemelet med metanol, formamid og en blanding av metanol og formamid i forholdet 3:2. I tillegg ble mekanisk blanding og ultrasonisk vannbad benyttet i ekstraksjonsprosessen. Det kan tenkes at Karl Fischer-titrering ikke er en egnet metode for fiskemel som prøvemateriale, da denne metoden krever en oppløsning av fiskemelet med egnet løsemiddel for å friggi vann som er bundet.

5.0 Konklusjoner

Alle valideringsparametrene er innenfor de fastsatte kravene til metodevalideringsanalysene, og dermed kan metoden godkjennes og instrumentet TitroLine® 7500 KF kan tas i bruk, med bruk av fiskeolje som prøvemateriale. Dette gjelder riktighet, repeterbarhet, reproduserbarhet, robusthet, samt linearitet og holdbarhet.

Linearitetsanalysen mellom prøvevolum av fiskeolje og detektert vannmengde viste at de to variablene ikke er avhengige av hverandre. Variasjonskoeffisienten til de ulike vektnivåene var høyere for nivå 1-6 og 1-5, enn den var for vektnivå 2-5. Det er dermed å anbefale å benytte et prøvevolum innenfor det anbefalte området på 2-10 g. Siden ytterpunktene i det anbefalte området ikke er testet, anbefales det å benytte en prøvevekt mellom 3 g – 9 g, eller gjennomføre videre testing med 2 g og 10 g. Holdbarhetesanalysen viste at oppbevaring av fiskeolje i kjøleskap i syv dager uten lokk ga et høyere %-avvik enn prøven oppbevart i kjøleskap i syv dager med lokk. Dette viser viktigheten med å holde prøven tett, slik at det ikke kommer inn luft som gir økt vannmengde i prøven.

Siden metodevalideringen er utført med fiskeolje som prøvemateriale og resultatene er innenfor kravene, regnes fiskeolje som en egnet matriks for dette instrumentet. Fiskemel er ikke egnet til dette instrumentet, da det ikke ble tilstrekkelig løst opp i innledende forsøk. Det anbefales derfor å prøve ytterligere ekstraksjonsprosesser eller benytte andre metoder, som for eksempel tørking, til å finne vannmengden i denne matriksen. Ensilasje og vannfraksjon er mulig å benytte som prøvemateriale etter at prøvene har blitt sentrifugert, da supernatanten løser seg fullstendig opp. Det ligger likevel usikkerhet i om det finnes vann i bunnfallet, som gir falskt for lavt vanninnhold. For å sikre korrekt bestemmelse av vanninnhold i ensilasje og vannfraksjon må det gjennomføres metodevalideringsanalyser med disse matriksene.

6.0 Referanser

1. Richardsen R, Nystøyl R. Tilgang og anvendelse av marint restråstoff i Norge. :55.
2. Karlsson-Drangsholt A, van Nes S. Miljøkonsekvensanalyse: Integrert havbruk i Norge [Internett]. Bellona; 2017. Tilgjengelig på: <https://sintef.brage.unit.no/sintef-xmlui/bitstream/handle/11250/2460204/Bellona-rapport%2bMilj%25C3%25B8konsekvensanalyse%2b-%2bIntegrert%2bhavbruk%2bi%2bNorge.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
3. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. EFSA J [Internett]. 1. mars 2010 [sitert 9. mai 2019];8(3). Tilgjengelig på: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1385>
4. Commission Regulation (EU) No 277/2012 of 28 March 2012 amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels and action thresholds for dioxins and polychlorinated biphenylsText with EEA relevance. :7.
5. Isengard H-D. Rapid water determination in foodstuffs. Trends Food Sci Technol. 1. mai 1995;6(5):155–62.
6. SI Analytics. Operating manual TitroLine 7500 KF. SI Analytics; 2013.
7. Galvez RP, Berge J-P. Utilization of Fish Waste. CRC Press; 2013. 233 s.
8. Hall GM. Fish Processing: Sustainability and New Opportunities. John Wiley & Sons; 2011. 340 s.
9. Stansby ME. Fish Oils Their Chemistry, Technology, Stability, Nutritional, Properties, and Uses. USA: The Avi Publishing Company, Inc.; 1967.
10. Turchini GM, Ng W-K, Tocher DR. Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. CRC Press; 2010. 542 s.
11. Scholz E. Karl Fischer Titration: Determination of Water. Springer-Verlag; 1984. 142 s.
12. Kim S-K. Seafood Processing By-Products: Trends and Applications. Springer Science & Business Media; 2014. 593 s.
13. Hernandez E, Hosokawa M. Omega-3 Oils: Applications in Functional Foods. Elsevier; 2015. 313 s.
14. Nations F and AO of the U. Production and utilization of fish silage: A manual on how to turn fish waste into profit and a valuable feed ingredient or fertilizer. Food & Agriculture Org.; 2018. 28 s.
15. Silva SS de, Anderson TA. Fish Nutrition in Aquaculture. Springer Science & Business Media; 1994. 346 s.
16. Anonymous. Contaminants [Internett]. Food Safety - European Commission. 2016 [sitert 29. april 2019]. Tilgjengelig på: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants_en

17. miljødepartementet K. Miljøgifter og helse- og miljøfarlige kjemikalier [Internett]. Regjeringen.no. 2015 [sitert 29. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.regjeringen.no/no/tema/klima-og-miljo/ryddemappe/miljogifter-og-helse--og-miljofarlige-kjemikalier/id2394217/>
18. Nollet LML, Toldra F. Handbook of Food Analysis - Two Volume Set. CRC Press; 2015. 1530 s.
19. Li N, Hefferren JJ, Li K. Quantitative Chemical Analysis. World Scientific Publishing Company; 2013. 322 s.
20. Averill B, Eldredge P. Chemistry Principles, Patterns, and Applications. USA: Pearson Education, Inc.; 2007.
21. Harris DC. Exploring Chemical Analysis. Third edition. USA: W. H. Freeman and Company; 2005.
22. Good Titration Practice in KF Titration [Internett]. Mettler Toledo; 2011. Tilgjengelig på: <https://sintef.sharepoint.com/teams/work-8108/Delte%20Dokumenter/2019/Karl%20Fisher/Litteratur/Good%20Titration%20Practise%20-%20Karl-Fischer.pdf>
23. Margreth M, Schlink R, Steinbach A. Water Determination By Karl Fischer Titration. I: Pharmaceutical Sciences Encyclopedia [Internett]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010 [sitert 12. mars 2019]. Tilgjengelig på: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470571224.pse415>
24. Scott. Operating instructions. TitroLine KF titrator. Schott; 2001.
25. Nielsen SS. Food Analysis. Springer Science & Business Media; 2010. 586 s.
26. MacLeod SK. Moisture determination using Karl Fischer titrations. Anal Chem. 15. mai 1991;63(10):557A-566A.
27. Thoresen TS. Statistikk for laboratoriet. Tromsø: Eureka forlag; 2008.
28. Løvås GunnarG. Statistikk for universiteter og høyskoler. 3. utg. Oslo: Universitetsforlaget; 2013.
29. Allen MP. Understanding Regression Analysis. Springer Science & Business Media; 2007. 227 s.
30. Burtis CA, Brunts DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - E-Book. Elsevier Health Sciences; 2014. 1102 s.
31. SI Analytics. Water determination according to Karl Fischer in organic liquids. SI Analytics; 2013.

7.0 Vedlegg

7.1 Rådata

Vedlegget inneholder rådata fra metodevalideringsanalysene, og tabellene under viser verdiene fra de ulike analysene.

Tabell 1: Rådata fra riktighetsanalysen med målt vanninnhold (%) og riktighet uttrykt som bias (%).

Parallellnummer	Vanninnhold (%)
1	0,990
2	0,990
3	0,989
4	0,996
5	1,006
6	0,986
7	0,988
8	0,990
Middelverdi (%)	0,992
SD	6,38E-03
CV (%)	0,64
%-avvik fra sann verdi (%)	0,81

Karl Fischer-titrering, titrert med Titrant 2 og åtte paralleller av Water Standard 1%. Sann verdi for Water Standard 1 % er 1,00%.

Tabell 2: Rådata fra riktighetsanalysen med målt vanninnhold (%) og riktighet uttrykt som bias (%).

Parallellnummer	Vanninnhold (%)
1	0,998
2	0,990
3	1,008
4	1,016
5	0,992
6	0,986
7	1,002
8	0,968
Middelverdi (%)	0,995
SD	1,47E-02
CV (%)	1,48
%-avvik fra sann verdi (%)	0,50

Karl Fischer-titrering, titrert med Titrant 5 og åtte paralleller av Water Standard 1%. Sann verdi for Water Standard 1 % er 1,00%.

Tabell 3: Rådata fra linearitetsanalysen, viser vekt (g), vanninnhold (%) og forbrukt volum av titrant (mL) for hver av parallellene, samt middelerdi av hvert nivå.

Parallellnummer	Vekt (g)	Vanninnhold (%)	Forbrukt volum titrant (mL)
Nivå 1.1	1,5201	0,023	0,1555
Nivå 1.2	1,2459	0,021	0,1170
Nivå 1.3	1,0625	0,022	0,1010
Nivå 1.4	1,1419	0,021	0,1010
Nivå 1.5	0,8675	0,020	0,0770
Nivå 1.6	0,8735	0,021	0,0810
Middelerdi	1,1186	0,0213	0,1054
Nivå 2.1	2,8289	0,017	0,2120
Nivå 2.2	2,7582	0,017	0,2055
Nivå 2.3	2,6678	0,017	0,2035
Nivå 2.4	2,7667	0,017	0,2115
Nivå 2.5	2,7343	0,018	0,2110
Nivå 2.6	2,7733	0,016	0,1970
Middelerdi	2,7549	0,017	0,2068
Nivå 3.1	4,5326	0,017	0,3335
Nivå 3.2	5,1226	0,017	0,3815
Nivå 3.3	5,3450	0,017	0,4055
Nivå 3.4	5,0403	0,018	0,3895
Nivå 3.5	5,4558	0,021	0,5100
Nivå 3.6	4,8880	0,019	0,4175
Middelerdi	5,0640	0,018	0,4063
Nivå 4.1	6,6884	0,017	0,4860
Nivå 4.2	6,7717	0,017	0,4995
Nivå 4.3	6,8456	0,017	0,5075
Nivå 4.4	6,7717	0,017	0,4985
Nivå 4.5	6,6630	0,017	0,4975
Nivå 4.6	6,8998	0,017	0,5175
Middelerdi	6,7734	0,017	0,5011
Nivå 5.1	8,4547	0,017	0,6480
Nivå 5.2	9,6189	0,017	0,7355
Nivå 5.3	8,8980	0,017	0,6825
Nivå 5.4	9,0422	0,016	0,6445
Nivå 5.5	9,0161	0,016	0,6465
Nivå 5.6	8,9769	0,016	0,6450
Middelerdi	9,0011	0,0165	0,6670
Nivå 6.1	10,92971	- *	10,7410*
Nivå 6.2	10,89804	0,019	0,8955
Nivå 6.3	10,77888	0,017	0,8195
Nivå 6.4	10,78508	0,020	0,9320
Nivå 6.5	10,83330	0,032	1,5310
Nivå 6.6	11,00731	0,031	1,4965
Middelerdi	10,87205	0,0238	1,1349

*Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale. Seks paralleller per nivå, totalt seks nivå. Nivå 1 = 1 g. Nivå 2 = 3 g. Nivå 3 = 5 g. Nivå 4 = 7 g. Nivå 5 = 9 g. Nivå 6 = 11 g. *Deteksjon ikke mulig.*

Tabell 4: Rådata fra linearitetsanalysen med presisjon for hvert nivå uttrykt i CV.

Nivå	n	Vanninnhold, \bar{x} (%)	SD	CV (%)
1	6	0,0213	1,03E-03	4,84
2	6	0,017	6,32E-04	3,72
3	6	0,018	1,60E-03	8,82
4	6	0,017	0,00E+00	0,00
5	6	0,0165	5,48E-04	3,32
6	6	0,0238	7,12E-03	29,92

Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale. Seks paralleller per nivå, totalt seks nivå. Nivå 1 = 1 g. Nivå 2 = 3 g. Nivå 3 = 5 g. Nivå 4 = 7 g. Nivå 5 = 9 g. Nivå 6 = 11 g.

Tabell 5: Rådata fra reproduserbarhetsanalysen: målt vanninnhold (%) fra dag 1, dag 2 og dag 3, analysert av analytiker 1.

Parallellnummer	Vanninnhold (%) målt dag 1	Vanninnhold (%) målt dag 2	Vanninnhold (%) målt dag 3
1	0,017	0,022	0,021
2	0,017	0,020	0,020
3	0,017	0,021	0,020
4	0,017	0,019	0,019
5	0,018	0,019	0,021
6	0,016	0,019	0,020
Middelverdi (%)	0,017	0,020	0,020
SD	6,32E-04	1,26E-03	7,53E-04
CV (%)	3,72	6,32	3,73

Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale. Seks paralleller per dag, over tre dager (dag 1, dag 2 og dag 3).

Tabell 6: Rådata fra reproduserbarhetsanalysen: målt vanninnhold (%) fra dag 1, dag 2 og dag 3, analysert av analytiker 2.

Parallellnummer	Vanninnhold (%) målt dag 1	Vanninnhold (%) målt dag 2	Vanninnhold (%) målt dag 3
1	0,020	0,021	0,020
2	0,020	0,019	0,019
3	0,019	0,019	0,019
4	0,019	0,018	0,019
5	0,019	0,019	0,019
6	0,018	0,018	0,019
Middelverdi (%)	0,019	0,019	0,019
SD	7,53E-04	1,10E-03	4,08E-04
CV (%)	3,93	5,77	2,13

Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale. Seks paralleller per dag, over tre dager (dag 1, dag 2 og dag 3).

Tabell 7: Rådata fra holdbarhet: målt vanninnhold (%) dag 0 og dag 7 for fiskeolje oppbevart i kjøleskap med lokk, samt %-avvik fra dag 0 til dag 7.

Parallellnummer	Vanninnhold (%) målt dag 0	Vanninnhold (%) målt dag 7	%-avvik fra dag 0 til dag 7
1	0,017	0,019	11,8
2	0,017	0,018	5,9
3	0,017	0,018	5,9
4	0,017	0,018	5,9
5	0,018	0,018	0,0
6	0,017	0,018	5,9
Middelverdi (%)	0,017	0,018	5,8
SD	4,08E-04	4,08E-04	-
CV (%)	2,38	2,25	-

Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale, oppbevart i kjøleskap i syv dager med lokk. Seks paralleller.

Tabell 8: Rådata holdbarhetsanalysen: målt vanninnhold (%) dag 0 og dag 7 for fiskeolje oppbevart i kjøleskap uten lokk, samt %-avvik fra dag 0 til dag 7.

Parallellnummer	Vanninnhold (%) målt dag 0	Vanninnhold (%) målt dag 7	% - avvik fra dag 0 til dag 7
1	0,017	0,030	76,5
2	0,017	0,029	70,6
3	0,017	0,029	70,6
4	0,017	0,028	64,7
5	0,018	0,027	50,0
6	0,017	0,027	58,8
Middelverdi (%)	0,017	0,028	65,0
SD	4,08E-04	1,21E-03	-
CV (%)	2,38	4,27	-

Karl Fischer-titrering, med fiskeolje som prøvemateriale, oppbevart i kjøleskap i syv dager uten lokk. Seks paralleller.

7.2 Prosedyre

Prosedyre for bruk av TitroLine® 7500 KF

Formål

Formålet er å sikre korrekt bruk av instrumentet TitroLine® 7500 KF, og at alle ansatte utfører arbeidet likt.

Omfang

Gjelder alle ansatte som skal benytte instrumentet TitroLine® 7500 KF.

Oppstartsdato

Mars 2019

Analyseprinsipp og terminologi

TitroLine® 7500 KF benytter seg av volumetrisk Karl Fischer-titrering med amperometrisk deteksjon. Karl Fischer-titrering er en kjemisk kvantitativ analyse som går ut på å detektere vanninnhold i en prøve, ved å titrere prøven med en titrant som har kjent konsentrasjon av jod (I_2). Et reagens tilsettes prøven og inneholder et løsemiddel (ROH), en base (RN) og svoveldioksid (SO_2). Løsemiddelet tilsettes til prøven for å løse opp vannet som er bundet i prøven. Svoveldioksid danner kompleks med løsemiddelet og basen. Basen fungerer som en buffer og vil forhindre dannelsen av syreprodukter. Det skjer en redoksreaksjon ved en dobbel platinelektrode, der jod blir redusert og jodid oksidert. Endepunktet for titreringen er nådd når alt jod har blitt redusert til jodid. Siden vann og jod er i støkiometrisk forhold vil mengden vann i prøven tilsvare mengden jod tilsatt fra titranten. Reaksjonsligning: $ROH + SO_2 + 3 RN + I_2 + H_2O \rightarrow (RNH) \cdot SO_4 R + 2 (RNH)I$

Analysematerialer

Fiskeolje, ensilasje*, vannfraksjon*.

* Ikke metodevalidert, testet som prøve

Tabell 1: Anbefalt prøvevolum ut ifra forventet vanninnhold, samt valg av titrant:

Forventet vanninnhold	Titrant 2 (2 mg/mL)	Titrant 5 (5 mg/mL)
10 ppm – 100 ppm	> 10 g	-----
100 ppm – 500 ppm	2 – 10 g	-----
500 ppm – 1000 ppm	1 – 5 g	5 – 10 g
0,1 % - 10 %	0,5 – 1 g	1 – 2 g
1 % - 10 %	-----	0,1 – 2 g
10 % - 100 %	-----	max. 0,1 g

Valg av prøvevolum: det antas at 1 gram (g) = 1 milliliter (mL).

Standarder/ Kalibratorer

- **Water standard 1%** Standard for volumetric Karl Fischer Titration 1 g \triangleq 10 mg H₂O Aquastar®.
Leverandør: Merck. Nr.: 188052.

Reagenser

Reagenser brukt for prøveopparbeidelse og titrering var alle Aquastar® reagens for Karl Fischer-titrering fra Merck (EMD Millipore Corporation, Tyskland).

- **Solvent** solvent for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents Aquastar®. Nr.: 188015
- **Solvent Oils & Fats** Solvent for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents for oils and fats Aquastar®. Nr.: 188016.
- **Titrant 2** titrant for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents 1 ml \triangleq ca. 2 mg H₂O Aquastar®. Nr.: 188011.
- **Titrant 5** titrant for volumetric Karl Fischer titration with two component reagents 1 ml \triangleq ca. 5 mg H₂O Aquastar®. Nr.: 188010.

Kontrollmateriale

Intern kvalitetskontroll

Det utføres en titerbestemmelse for å bestemme konsentrasjonen til titranten. Dette gjøres for å sikre at korrekt konsentrasjon av titranten brukes i beregning av vannmengden i prøven.

Hvis titranten blir stående over en lengre periode kan effektiviteten bli redusert. Det benyttes Water Standard 1% som prøvemateriale. Sann verdi på Water Standard 1% er $1,00\% \pm 0,010\%$.

Analyseinstrument

TitroLine® 7500 KF, SI Analytics. Nr.: 10016557.

Tabell 2: Oversikt over standardmetoder som finnes på instrumentet.

Standardmetoder	Bruk
Titer 1-Component (liquid standard)	Til titerbestemmelse for 1-komponent reagenser. Bruk av standardprøve med en konsentrasjon på 10 mg/g
Titer 1-Component (solid standard)	Til titerbestemmelse for 1-komponent reagenser. Standarden er natriumtartrat dihydrat med vannmengde 15,66%
Titer 1-Component (water)	Til titerbestemmelse, egnet for 1-komponent reagens med vann som standard
Titer 2-Component (liquid standard)	Titerbestemmelse. Egnet for 2-komponent reagens. Bruk av standardprøve med en konsentrasjon på 10 mg/g
Titer 2-component (solid standard)	Titerbestemmelse. Egnet for 2-komponent reagens. Standarden er natriumtartrat dihydrat med vannmengde 15,66%
Titer 2-Component (water)	Til titerbestemmelse, egnet for 2-komponent reagens med vann som standard
Sample 1-Component	Egnet for titrering av prøve ved bruk av 1- komponent reagens.
Sample 2-Component	Egnet for titrering av prøve ved bruk av 2- komponent reagens.

Utstyr

- Finvekt (Mettler Toledo, Sveits. Nr.: XE205TDR). Innstilling: gram med 4 desimaler.
- Sprøyte, (med eller uten nål), (5 mL NORM-JECT Luer Lock Henke Sass Wolf. Lot: 16G18C8. Holdbarhet: 2021-07)

Avfallshåndtering

Følg vanlig avfallshåndtering.

Feilkilder og interferens

Fuktighet kan komme inn i prøvekommeret via atmosfæren hvis prøvekommeret ikke er tett. For å unngå dette gjennomfører instrumentet en «conditioning» før hver analyse, denne prosessen fjerner fuktighet i kammeret. Sidereaksjoner kan oppstå ved at stoffer fra matrisen til prøven reagerer med stoffer fra reagensene brukt i analysen. Sidereaksjoner oppstår sjeldent. Korrekt pH for analysen er nødvendig for å hindre at analysen går for raskt eller for sakte, basen som finnes i løsemiddelet er med på å sikre korrekt pH.

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Forskergruppe for massespektrometri.

HMS/sikkerhetsinformasjon

Benytt hansker ved bruk av reagenser. Se sikkerhetsdatablad til aktuelle reagenser.

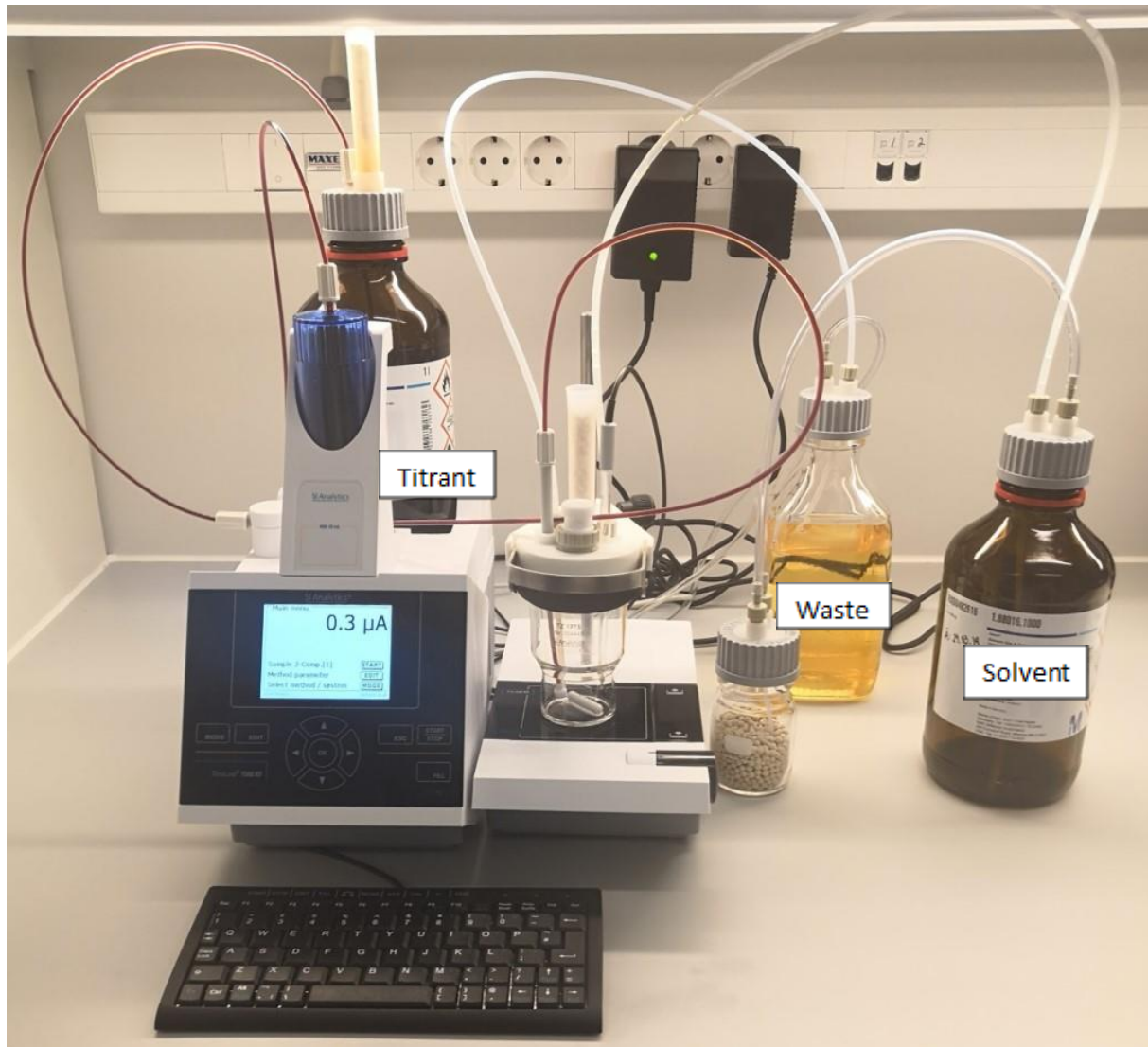
Fremgangsmåte/ Utførelse

Prøvematerialet klargjøring

Prøven blandes og trekkes opp i en sprøyte. Bruk av sprøyte med eller uten nål avhenger av prøvens viskositet. Trekk først opp 0,5 – 1 mL og skyll sprøyten med prøvematerialet. Trykk ut prøvematerialet brukt til skylling og dra opp nytt.

Til titerbestemmelse benyttes Water Standard 1%. Åpne glassampullen, og rens sprøyten 1-2 ganger med 0,5 – 1 mL. Trykk ut prøvematerialet brukt til skylling og ta opp hele prøvematerialet, tørk av nålen med papir. Sprøyte med nål fraktes i en beholder.

Reagenser klargjøring



Figur 1: Oversikt over instrumentets reagenser og plasseringen av dem.

Koble til enten Titrant 2 eller Titrant 5 etter forventet vanninnhold i prøven, se tabell 1. Koble til enten Solvent eller Solvent for Oils and Fats etter hvilket prøvemateriale som benyttes. Til fiskeolje og ensilasje benyttes Solvent for Oils and Fats som løsemiddel. Til Water Standard 1% og vannfraksjon benyttes Solvent. Sjekk at waste-beholderen er koblet til. Sjekk at slanger og ledninger er plassert slik de skal.

Analyseutstyr klargjøring

Slå på instrumentet med bryteren bak. Sett inn minnepinne bak instrumentet i USB-inngang. Eventuelt start med en rensing av systemet med å velge <Rinsing x 2> under <Mode>. Dette kan gjøres hvis det er luft i slangene. Fjern deretter væsken fra prøvekommeret ved å trykke

på waste-knappen (tømming). Fyll prøvekommeret med Solvent/Solvent for Oils and Fats ved å trykke solvent-knappen (fylling). Prøvekommeret skal være fylt med 35-40 mL væske (fyll helt opp til hvor kommeret starter å utvide seg). Skru på magnetrøreren med å vri på skruen, og velg også ønsket hastighet med å vri på skruen.

Fremgangsmåte

En titerbestemmelse bør utføres én gang i uken, eller ved behov, for å sikre effektiviteten til titranten. For å gjennomføre en titerbestemmelse velg <Titer 2-Comp (liq.std)> under <Default method> i <Mode>. Bruk Water Standard 1% som standardprøve og Solvent som løsemiddel. Trykk <Start>. Vei sprøyten med Water Standard 1% på finvekt, og noter vekten. Vent til beskjeden «condition ready» gis og trykk <Start> igjen. Tilsett prøven ved beskjeden «add sample». Prøvevolum som skal tilsettes avhenger av hvilken titrant som skal testes. For Titrant 2 velges et prøvevolum på 0,5 – 1,0 mL, og for Titrant 5 velges et prøvevolum på 1,5 – 2,0 mL. Vei sprøyten med prøvematerialet på finvekt igjen, noter og beregn vekten til prøven. Trykk <Start>, legg inn prøvenavn, trykk <OK>, legg inn prøvens vekt (g), trykk <OK>. Gjenta prosessen 2 ganger til da en titerbestemmelse benytter middelverdien av tre paralleller til beregning av konsentrasjonen (titer-verdi).

Til analysering av prøver velges <Sample 2-comp> under <Default method> i <Mode>. Ved analysering av fiskolje benyttes Titrant 2 og Solvent for Oils and Fats. Trykk <Start>. Vei sprøyten med prøvemateriale på finvekt, vekten noteres. Vent til beskjeden «condition ready» gis og trykk <Start> igjen. Tilsett prøven ved beskjeden «add sample». Tilsett prøven gjennom åpningen med et prøvevolum på mellom 2,0 – 10 mL. Vei sprøyten med prøvematerialet på finvekt, noter og beregn vekt. Trykk <Start>, legg inn prøvenavn, trykk <OK>, legg inn prøvens vekt (g), trykk <OK>.

Flytskjema

Slå på instrumentet med bryteren bak. Ta en minnepinne i USB-inngangen.



Sjekk at riktig titrant og riktig solvent er koblet til, og sjekk at wastebeholder er koblet til.



Fyll prøvekommeret med solvent (35 - 40 mL), med knappen på høyre side. Start magnetrøreren med skruen.



TITERBESTEMMELSE

Prøvemateriale: Water Standard 1% (vannstandard)

Solvent: Solvent

Titranter: benytt den titranten som skal benyttes til analysering av prøver senere

<MODE> <Default method> <Titer 2-Comp (liq.std)>

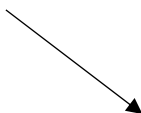
Trykk <START> og vent til beskjeden "conditioning ready" før det trykkes på <START> igjen.

Dra opp 0,5 - 1,0 mL for Titrant 2 og 1,5 - 2,0 mL for Titrant 5 av Water Standard 1% med en sprøyte. Vei sprøyten på finvekt, noter ned vekten.

Tilsett anbefalt volum av vannstandard til prøvekommeret til beskjeden "add sample", trykk deretter <START>. Legg inn prøvenavn, trykk <OK>.

Vei sprøyten på finvekt igjen, noter ned vekten. Beregn vekt og legg inn på instrumentet, trykk <OK>.

Instrumentet krever tre paralleller for å bestemme en titerverdi, så gjenta to ganger til. Titerverdien som måles blir stående som gjeldende konsentrasjon for titranten og brukes i beregning av vanninnholdet i prøver.



ANALYSERING AV PRØVER, eks. fiskeolje

Prøvemateriale: fiskeolje

Solvent: Solvent for oils and fats

Titranter: Titrant 2

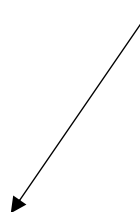
<MODE> <Default method> <Sample 2-comp>

Trykk <START> og vent til beskjeden "conditioning ready" før det trykkes på <START> igjen.

Dra opp anbefalt volum, se tabell 1, av prøvematerialet med en sprøyte. Vei sprøyten på finvekt, noter ned vekten.

Tilsett anbefalt volum av prøven til prøvekommeret til beskjeden "add sample", trykk deretter <START>. Legg inn prøvenavn, trykk <OK>.

Vei sprøyten på finvekt igjen, noter ned vekten. Beregn vekt og legg inn på instrumentet, trykk <OK>.



Ferdig med analyser, tøm prøvekommeret med knappen på høyre side.

Rapportering av svar

Instrumentet gir ut den detekterte vannmengden i %, ppm eller mL. Enheten kan endres ved å trykke <Edit>, deretter velges <Edit method>, <Result> og <Unit>.

Beregning av svar

Instrumentet beregner både titer-verdi til titrant og vanninnholdet i prøven.

$$\text{Beregning av titer-verdi: } Titerverdi (T) = \frac{(W * F2)}{((EX1 - B) * M * F1)}$$

$$\text{Beregning av vanninnhold: } \% - vann = \frac{(EX1 - B) * T * M * F1}{(W * F2)}$$

EX1 er forbrukt volum av titrant (mL), B er blank-verdi (mL), T er titerverdi (mg/mL), M er antall mol, F1-F5 er konverteringsfaktorer, og W er vekt av prøven (g).

Vedlikehold

Se informasjon om vedlikehold i manualen.

Referanser

- SI Analytics Operating Manual. (2013). “TitroLine® 7500 KF Titrator”. Tyskland.
- SI Analytics Application. (2013). “Water determination according to Karl Fischer in organic liquids”. Tyskland.
- Scholz. E. (1984). *Karl Fischer Titration: Determination of water: Chemical Laboratory Practice*. Springer Verlag: Tyskland.

