

Afdeling Diergeneesmiddelen 1984-12-14
RAPPORT 84.103 Pr.nr. 202.2010

Onderwerp: Evaluatie van gezamenlijk
onderzoek carbadox in dier-
voeders en voormengsels.

Bijlagen: 2

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, Normalisatie,
projektbeheer, projektleider, afdeling DGM (6x) afdeling
OCON, circulatie

Projekt: Onderzoek monsters diervoeders en grondstoffen in opdracht van AID.

Onderwerp: Evaluatie van gezamenlijk onderzoek carbadox in diervoeders en voormengsels.

Bijlagen: 2.

Doel:

Nagaan wat de spreiding is van de analyseresultaten verkregen door een aantal laboratoria, die hun eigen methoden toepasten op een aantal monsters carbadoxbevattende diervoeders en voormengsels. Dit om een beter inzicht in de tolerantie-problematiek bij de controle van diervoeders te verkrijgen.

Samenvatting:

Acht monsters carbadoxbevattende diervoeders en voormengsels zijn vanuit het RIKILT verzonden aan 11 laboratoria. Tien laboratoria hebben de analyseresultaten binnen de termijn teruggezonden. Het merendeel (8) past HPLC-methoden toe, twee laboratoria gebruikten de spectroscopische EEG-methode.

Conclusie:

Zowel tussen de methoden als binnen één methode treden grote verschillen op in de analyseresultaten. Het gedeclareerde gehalte carbadox wordt niet teruggevonden.

Uit het onderzoek kan geconcludeerd worden dat nader onderzoek nodig is met minder vrijheidsgraden. Inzake de tolerantie-problematiek kan dan meer duidelijkheid verkregen worden.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerkers/samenstellers: drs M.M.L. Aerts, mw G.A. Werdmuller

Projektleider: drs M.M.L. Aerts

RAPPORT 84.103

Pr.nr. 202.2010

Projekt: Onderzoek monsters diervoeders en grondstoffen in opdracht van AID.

Onderwerp: Evaluatie van gezamenlijk onderzoek carbadox in diervoeders en voormengsels.

Bijlagen: 2.

Doel:

Nagaan wat de spreiding is van de analyseresultaten verkregen door een aantal laboratoria, die hun eigen methoden, toepasten op een aantal monsters carbadoxbevattende diervoeders en voormengsels. Dit om een beter inzicht in de tolerantie-problematiek bij de controle van diervoeders te verkrijgen.

Samenvatting:

Acht monsters carbadoxbevattende diervoeders en voormengsels zijn vanuit het RIKILT verzonden aan 11 laboratoria. Tien laboratoria hebben de analyseresultaten binnen de termijn teruggezonden. Het merendeel (8) past HPLC-methoden toe, twee laboratoria gebruikten de spectroscopische EEG-methode.

Conclusie:

Zowel tussen de methoden als binnen één methode treden grote verschillen op in de analyseresultaten. Het gedeclareerde gehalte carbadox wordt niet teruggevonden.

Uit het onderzoek kan geconcludeerd worden dat nader onderzoek nodig is met minder vrijheidsgraden. Inzake de tolerantie-problematiek kan dan meer duidelijkheid verkregen worden.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerkers/samenstellers: drs M.M.L. Aerts, mw G.A. Werdmuller

Projektleider: drs M.M.L. Aerts



I. Introductie

Nadat van diverse zijden onvrede geuit was over de toepassing van toleranties die gehanteerd worden op de toegelaten hoeveelheden van additieven in diervoeding, is in het voorjaar van 1984 voorgesteld vanuit het RIKILT voor een aantal diergeneesmiddelen gezamenlijk onderzoek op te zetten.

Besloten werd te beginnen met Carbadox in voeders en voormengsels. In totaal waren elf bedrijven/instituten bereid aan een dergelijk onderzoek mee te werken.

Hoofddoel was de spreiding na te gaan tussen bepalingen van hetzelfde monster, verricht door verschillende laboratoria met hun eigen "in-house" methoden.

II. Deelnemers

De volledige lijst van de 11 participanten is in Bijlage 1 weergegeven. Slechts tien laboratoria zijn bij de statistische evaluatie betrokken.

III. Monsters

Vacuüm verpakte meel-, gemalen pellet- en voormengselmonsters werden door het RIKILT bereid en verzonden. De mengvoeders en voormengsels waren afkomstig van drie verschillende fabrikanten. Hieronder volgen de karakteristieken van de verzonden monsters A t/m H:

A: Meel vóór pelleteren.

D: Gepelleteerd voeder gemaakt uit A door pelletatie bij hogere temperatuur. Gemalen op 1 mm.

E: Gepelleteerd voeder gemaakt uit A door pelletatie bij lagere temperatuur. Gemalen op 1 mm.

F: Premix gebruikt voor de bereiding van meel A en de pellets D en E.

B: Gepelleteerd voeder gemalen op 1 mm.

G: Bijbehorende premix.

C: Gepelleteerd voeder gemalen op 1 mm.

H: Bijbehorende premix.

S: Carbadox-standaard (puur).

Alle meel- en pelletmonsters bevatten volgens opgave 50 ppm carbadox.

Voormengsels G en H bevatten 1% carbadox en voormengsel F bleek achteraf niet 1% maar ongeveer 0,18% carbadox te bevatten.

De goede ontvangst van de monsters werd bevestigd door terugzending van een bijgevoegd ontvangstformulier (Annex 1 van Bijlage 2).

IV. Opzet van het onderzoek

De opzet is beschreven in Bijlage 2 en komt in het kort neer op het volgende:

Ieder laboratorium meet alle monsters in duplo (inweeg) volgens de binnen dat laboratorium gebruikelijke methode. De gehalten worden berekend met de eigen standaard en de meegeleverde standaard. De deelnemers is gevraagd zo gedetailleerd mogelijk de methode te beschrijven en reeds aanwezige gegevens omtrent spreiding en precisie te vermelden.

V. Resultaten en discussie

Een aantal laboratoria hebben dezelfde methode toegepast waarbij op details van elkaar afgeweken werd.

Vier laboratoria maakten gebruik van de HPLC-methode beschreven door V.A. Thorpe (1980) (ref. 1). Deze methode wordt in de tabellen aangeduid als Meth. 1. Twee lab's maakten gebruik van de HPLC "RIKILT"-methode (Meth. 3). Twee lab's analyseerden via een spectroscopische methode (Meth. 4) en één lab gebruikte een combinatie van de HPLC-methoden beschreven door V. Thorpe (1978) en Luchtefeld (1977) (ref. 2). In tabel 4a en 4b is het gemiddelde van de duplo-analyses van de monsters voor elk lab weergegeven. Bovendien is daar het gemiddelde en de standaardafwijking per monster te zien.

Voor een verdere statistische evaluatie zie VI.

V.1 HPLC-methode volgens V.A. Thorpe (1980)

Bij deze methode wordt het gemalen monster bevochtigd met 5 ml water en vervolgens geëxtraheerd met 95% DMF (5% water). Het monster wordt overnacht weggezet, gefiltreerd en een aliquot van het filtraat wordt over een Allumina kolom gezuiverd. Na verwerpen van de eerste milliliters eluaat wordt de rest van het eluaat verzameld en geïnjecteerd op een RP-C18 kolom. Eluens $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HAc}$ 1% (20/80). Golflengte: 365 nm. Voor zover uit de meegeleverde gegevens op te maken was werd door de vier laboratoria die deze methode toepasten als volgt afgeweken, en werd verder opgemerkt:

Lab 1: Eluens: water/ CH_3CN 90/15 (v/v).

Lab 2: Bij extractie wordt dubbele hoeveelheid extractiemiddel gebruikt. In plaats van overnacht laten staan wordt 2 uur geschud.

Eluens: methanol/water 35/65, golflengte: 313 nm.

Er wordt een vóórpiek gesignaleerd welke normaal nooit waargenomen wordt.

Lab 3 In plaats van overnacht laten staan wordt 2 uur geschud. Het eluaat van de Al_2O_3 -kolom wordt verdund (3x) met eluens.

Eluens: CH_3CN /TAM + DIA + fosforzuurbuffer pH 7 = 13/87.

Premix monsters: 1 gram in 200 ml 95% DMF. Na 5 x verdunnen met 95% DMF en verdunnen met eluens wordt geïnjecteerd.

Lab 4: De voormengsels zijn ook spectrofotometrisch bepaald.

V.2 "RIKILT"-HPLC methode (methode 3)

Bij deze methode wordt het voeder na bevochtigen met water geëxtraheerd met $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3/1. Het geheel wordt 1 uur bij 60°C op een waterbad gerefluxed. Na filtratie wordt aan een aliquot van het filtraat alkalische zoutoplossing toegevoegd. Na scheiding van de chloroformfase wordt de waterige fase gebufferd en geëxtraheerd met CHCl_3 (2x). Na indampen van de CHCl_3 fasen wordt het residu opgenomen in eluens ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 65/35) en bij 365 nm gemeten.

Een van de laboratoria extraheert slechts 15 minuten maar wel tweemaal. Bovendien wordt na buffering niet uitgeschud met CHCl_3 maar direkt geïnjecteerd.

V.3 Spectroscopische methoden (methode 4)

Twee laboratoria hebben een spectroscopische methode toegepast (EEG 4583/VI/75 en VI/4339/77). Daarnaast heeft één lab (no. 4) de voormengsels zowel via HPLC als spectroscopisch bepaald. De EEG-methode maakt gebruik van $\text{CH}_3\text{Cl}_3/\text{MeOH}$ 3/1 extractie, analoog aan de "RIKILT" HPLC methode. Er wordt echter slechts 30 min bij kamertemperatuur geëxtraheerd. Na indampen van het CHCl_3 -extract wordt het residu opgenomen in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3/1 en wordt tin(II)chloride toegevoegd. Na 40 min wordt de extinctie bij 523 nm afgelezen. Voor voormengsels wordt de CHCl_3 extractie achterwege gelaten en wordt de basische oplossing direkt gemeten bij 420 nm.

V.4 Overige HPLC methoden

In het overzicht (tabel 1 en 2) is bij laboratorium 10 per abuis methode 1 opgegeven. Dit lab extraheert met puur DMF door 45 minuten in een ultrasoonbad te trillen. Na filtratie wordt het residu nogmaals geëxtraheerd met methanol. De verzamelde filtraten worden gehomogeniseerd en geïnjecteerd ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HAc} = 200/800/10$), golflengte 365 nm. De voormengsels worden alleen met DMF geëxtraheerd. Laboratorium 5 combineert de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ extractie met zuivering over een Al_2O_3 kolom. Het kolomeluaat wordt drooggedampt en het residu opgenomen in eluens ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{fosforzuur} = 200/800/0,3$), golflengte 365 nm. Voormengsels worden geëxtraheerd met puur DMF (30 min schudden). Een deel van het extrakt wordt verdund met eluens en vervolgens geïnjecteerd.

V.5 Discussie

Alle laboratoria, behalve lab 5, hebben de chromatogrammen bij de resultaten gevoegd. Gegevens over precisie en betrouwbaarheid zijn maar door een aantal labs verstrekt (tabel 3).

Op twee laboratoria na, die de spectroscopische EEG-methode toepassen, wordt algemeen een RP-HPLC analyse toegepast.

De snelle methode beschreven door V. Thorpe heeft daarbij de voorkeur. In het algemeen zijn de chromatogrammen redelijk "schoon" al is met name bij lab 1 en 2 sprake van een piekje vlak naast de carbadox-piek. De methode gebruikt door lab 5 lijkt qua uitvoering sterk op de Thorpe methodiek. Alleen wordt uitgegaan van het extraktiemiddel dat gebruikt wordt bij zowel de EEG-spectroscopische methode, als bij de "RIKILT" HPLC analyse ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 3/1$). Bij deze laatste methode wordt het voeder ook eerst bevochtigd en de zuivering vindt plaats door chloroform-extractie. Dit betekent dat de monsterbehandeling bewerkelijker is als bij de methoden die Al_2O_3 als zuivering toepassen. De resulterende chromatogrammen zijn daarentegen zeer schoon en gebruik van DMF wordt vermeden. De EEG-spectroscopische methode heeft behalve de bewerkelijkheid als nadeel dat de detectie niet echt specifiek is en de kleurontwikkeling afhankelijk is van de tijd.

De in tabel 3 vermelde gegevens over variatie-coëfficiënten onder herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid binnen de lab-condities geven aan dat de betrouwbaarheid van de methode volgens Thorpe zeer acceptabel lijkt terwijl de grotere spreiding in recovery van de andere methoden verantwoordelijk lijkt voor de grotere variatie-coëfficiënten. Hoe meer handelingen hoe groter de kans op afwijkingen zou men kunnen zeggen.

De door de deelnemende labs met de RIKILT standaard berekende gehalten blijken nauwelijks (<3%) af te wijken van de met hun eigen standaard berekende getallen.

VI. Statistische evaluatie

In tabel 1 en 2 zijn de duplo resultaten van de acht monsters van alle laboratoria weergegeven. Op een enkele uitschieter na bij lab 5 en 9 liggen de duplo-waarden binnen 5% van het gemeten gehalte.

In tabel 4a en b zijn de duplo-gemiddelden weergegeven met daarbij het gemiddelde per monster over de 10 laboratoria, met de standaarddeviatie. Uit deze tabel wordt duidelijk dat zowel grote verschillen bestaan tussen de monsters binnen één lab als tussen de resultaten van een monster tussen laboratoria onderling.

De gemiddelde standaarddeviatie van de diervoeders A t/m E is 8 ppm ofwel ruim 20%. Voor de 1% voormengsels ligt dit veel gunstiger (= 5%). Het voormengsel met 0,17% carbadox ligt hier tussen in (= 12%). Bij de 1% voormengsels komt nog bij dat lab nr. 2 mogelijk de monsters verwisseld heeft. Dit beïnvloedt de standaarddeviatie in ongunstige zin. Wanneer we de uitslagen van b.v. meel-monster A bekijken dan is het hoogst gevonden gehalte twee maal zo hoog als het laagst gevonden. Om zichtbaar te maken of het ene laboratorium systematisch hogere/lagere gehalten vindt ten opzichte van andere laboratoria is de gemiddelde afwijking van het gemiddelde van de monsters, per lab bepaald (tabel 5a en b). Aangezien voor de voormengsels de afwijkingen minimaal zijn richten we ons op de diervoeders. Op de aldus gevormde cijfermatrix is de rangordetoets van Youden toegepast. Te zien is dat een aantal laboratoria duidelijk boven het gemiddelde zit terwijl lab 8 ook bij de rangordetoets als duidelijk afwijkend naar beneden naar voren komt. De andere laboratoria zijn binnen de toegepaste toets niet significant afwijkend.

Aangezien er aanzienlijke verschillen in de toegepaste methoden zijn, zijn drie methodengroepen gebundeld (methode 1, 3 en 4). In tabel 6a, b en c zijn de gemiddelde afwijkingen ten opzichte van het gemiddelde van respectievelijk de methode volgens Thorpe, "RIKILT" en de EEG-methode weergegeven. Hoewel het aantal lab's en metingen te klein zijn om definitieve conclusies te trekken valt op dat de gemiddelde afwijking ten opzichte van het monstergemiddelde van de groep lab's met methode 1 positief is (drie van de vier lab's liggen duidelijk hoger). Verder liggen de resultaten verkregen met de EEG-methode duidelijk beneden het gemiddelde. Methode 3 is noch positief noch negatief.

Ook binnen één methode-groep bestaan aanzienlijke verschillen tussen de resultaten. In tabel 7 zijn de gehalten van de monsters A t/m E gemeten met methode 1 weergegeven. Binnen deze groep meet lab 3 lagere waarden dan de andere drie laboratoria. De verschillen tussen hoogste en laagste waarden voor gepelleteerd voeders variëren van 13-30%.

Binnen de proefopzet lag ook besloten te onderzoeken in hoeverre er, gemiddeld genomen, verschil bestaat tussen de gemeten carbadoxgehalten in meel en daaruit gevormde pellets bij hogere en lagere temperatuur. Het gaat hierbij om de monsters A, E en D.

Uit tabel 4a is te zien dat op twee uitzonderingen na (nr. 3 en 7) alle laboratoria het gehalte in meel hoger meten dan in het bij lage temperatuur gepelleteerd monster E. Verder meten alle laboratoria op één na (nr. 9) een lager gehalte carbadox in het bij hogere temperatuur gepelleteerde monster D dan in monster E.

Bij de 1% voormengsels zit gemiddeld 10% verschil tussen voormengsel H en G (tabel 4b). Voormengsel H is gebruikt om diervoeder C te bereiden en uit voormengsel G is voeder B bereid. Het verschil in gehalte uit zich niet in de gehalten van voeder B en C (tabel 4a).

In tabel 8 zijn de resultaten van de spectroscopische analyses van de voormengsels F, G en H weergegeven. Vergelijking van de gemiddelden met de overall gemiddelden van alle laboratoria (tabel 4b) laat zien dat er geen significante verschillen aantoonbaar zijn. Laboratorium no. 4 heeft deze monsters zowel spectroscopisch als via HPLC geanalyseerd en komt tot vrijwel dezelfde uitkomsten.

Naar aanleiding van het feit dat lab 8 bij de rangordetoets van Youden buiten de rest van de laboratoria viel, zijn een aantal berekeningen herhaald onder ontsluiting van dit lab. Deze staan in de tabellen 9, 10a, b, c).

Dit verandert niets aan het totaalbeeld, maar geeft een verschuiving van de gemiddelden en een kleiner worden van de standaarddeviaties.

VII. Conclusies

Een van de hoofddoelen van dit gezamenlijk onderzoek was te onderzoeken in welke mate analyseresultaten van elkaar afwijken wanneer verschillende laboratoria hun eigen methoden toepassen.

Uit de verkregen resultaten kan het volgende geconcludeerd worden:

- a) De meeste laboratoria gebruiken een HPLC-methode waarbij de voorbewerking kan verschillen. De EEG spectroscopische methode wordt door twee laboratoria toegepast.
- b) Gemiddeld liggen de gehalten van de 50 ppm gepelleteerde voeders zo'n 20-30% onder het gedecladeerde gehalte.
De voormengsels komen vrij goed overeen met het opgegeven gehalte.
- c) De spreiding in de gemiddelde waarden is groot (standaarddeviatie van $\bar{x} = 25\%$). Dit geeft aan dat de spreiding tussen de laboratoria groot is.
- d) Groepering van de toegepaste methode toont dat in het algemeen laboratoria die de HPLC-methode van Thorpe (1980) toepassen wat hogere gehalten lijken te vinden. De resultaten, gevonden via de EEG-methode neigen lager uit te vallen. Eén laboratorium dat deze methode toepast valt volgens de rangorde-toets van Youden buiten de normale reeks.
- e) Binnen een methode-groep bestaat ook een grote spreiding in de resultaten. Tussen de vier laboratoria die de HPLC-methode volgens Thorpe (1980) toegepast hebben, bestaat voor gepelleteerde voeders een verschil van 13-30% tussen hoogste en laagste waarden binnen één monster.
- f) De methodeverschillen bij de analyse van voormengsels leiden niet tot significante verschillen in de resultaten.

- g) In het algemeen wordt in meel een hoger gehalte carbadox gevonden dan in daaruit bereid, gepelleteerde voeder. Wanneer dit pelletteren bij een hoge temperatuur plaatsvindt wordt een lager gehalte carbadox gevonden dan wanneer de temperatuur lager is.
- h) Een gevonden gehalteverschil tussen de 1%-voormengsels komt niet tot uiting in het gehalte van uit de voormengsels bereid diervoeder.

Vervolg-onderzoek

Binnen dit gezamenlijk onderzoek was het aantal variabelen (bewust) zeer groot gekozen. Het "echte" gehalte van de monsters was niet bekend en ieder lab gebruikte haar eigen methode. Er lopen op deze manier twee aspecten die de analyse-uitslag bepalen door elkaar:

1. de produktie-technische fase (er (b)lijkt niet het gedeclareerde gehalte aanwezig in de pellets) die zorgt voor een pellet met een "beschikbaar" carbadox en
2. de analytische fase waarbij een methode beschikbaar is die alle carbadox uit het voeder haalt.

In een vervolg-onderzoek zou een aantal diervoeders, op verschillende manieren bereid, door een aantal laboratoria via één (HPLC)-methode geanalyseerd kunnen worden. De methode wordt dan in onder overleg vastgesteld. Op deze manier kan meer direkt inzicht verkregen worden in de spreiding van gemeten gehalten en de toleranties die ten opzichte van het gehalte reëel te noemen zijn.

Ref. 1: V.A. Thorpe: J.A.O.A.C. 63, 981 (1980).

Ref. 2: V.A. Thorpe et al: J.A.O.A.C. 61, 88 (1978).

R.G. Luchtefeld: J.A.O.A.C. 60, 279 (1977).

Tabel 1 Duplo-waarden van monsters A t/m E
tasknr. 1

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm

LAB	METH	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
1	1	46.0	47.0	42.0	44.0	33.0	35.0	42.0	42.0	46.0	45.0
2	1	46.9	48.4	41.2	42.0	41.1	40.8	41.4	41.1	47.8	46.3
3	1	40.3	40.3	29.5	29.5	29.2	28.8	34.2	35.3	42.3	42.3
4	1	44.1	44.7	39.1	41.9	40.6	.	43.1	39.4	44.0	43.0
5	2	41.8	37.7	36.2	34.4	38.6	35.7	38.0	32.9	40.0	36.2
6	4	33.0	34.0	32.0	31.0	29.0	36.0	31.0	30.0	36.0	28.0
7	3	31.1	33.7	26.6	27.4	28.7	27.1	31.2	32.0	33.7	34.1
8	4	23.5	23.6	13.3	12.8	13.5	12.6	19.2	19.2	21.4	21.9
9	3	43.0	39.0	42.0	37.0	40.0	30.0	43.0	36.0	39.0	38.0
10	1*	40.9	40.3	25.1	25.1	28.8	28.8	29.0	29.8	38.8	38.9

.=missing

Tabel 2 Duplo-waarden van monsters F t/m H

tasknr. 1

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in %

LAB	METH	F1	F2	G1	G2	H1	H2
1	1	0.17	0.18	1.06	1.05	1.16	1.17
2	1	0.16	0.17	1.18	1.14	1.04	1.05
3	1	0.24	0.22	0.99	0.95	1.16	1.16
4	1	0.18	0.16	1.02	0.95	1.22	1.11
4	4	0.17	.	1.07	.	1.13	.
5	2	0.14	0.15	1.12	0.96	1.12	1.10
6	4	0.18	0.17	1.08	1.10	1.24	1.33
7	3	0.15	0.15	0.97	1.07	1.23	1.27
8	4	0.19	0.19	1.14	1.14	1.24	1.24
9	3	0.17	0.17	1.11	1.01	1.17	1.18
10	1*	0.16	0.16	1.06	1.09	1.19	1.17

.=missing

* =

Tabel 3. Verstreckte gegevens omtrent r , R_w en recovery

Lab	Methode	CV_r %	CV_{Rw} %	Rec. 50 ppm %	Rec. 1% %
1	1	2-3	3-5	92-98	95-101
2	1	2-2,5	5-6	100	95-100
4	1			107	
5	2			87-106	
7	3	2	7-8	100 ± 1	100 ± 5
9	3			90-100	90-100

Waarbij CV_r en CV_{Rw} gedefinieerd zijn zoals beschreven in bijlage 2 Annex 5.

Tabel 4a Duplo gemiddelden van monsters A t/m E met monstergemiddelden en standaarddeviatie
tasknr. 1

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm

LAB	METH	A gem	B gem	C gem	D gem	E gem
1	1	46.50	43.00	34.00	42.00	45.50
2	1	47.65	41.60	40.95	41.25	47.05
3	1	40.30	29.50	29.00	34.75	42.30
4	1	44.40	40.50	40.60	41.25	43.50
5	2	39.75	35.30	37.15	35.45	38.10
6	4	33.50	31.50	32.50	30.50	32.00
7	3	32.40	27.00	27.90	31.60	33.90
8	4	23.55	13.05	13.05	19.20	21.65
9	3	41.00	39.50	35.00	39.50	38.50
10	1*	40.60	25.10	28.80	29.40	38.85
5.5	2.1	38.965	32.605	31.895	34.490	38.135
3.03	1.29	7.3147	9.3518	8.0889	7.1325	7.5117
10	10	10	10	10	10	10

with mean, st.dev and n

Tabel 4b Duplo gemiddelden van monsters F t/m H met monstergemiddelden en standaarddeviatie

tasknr. 2

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in %

LAB	METH	F gem	G gem	H gem
1	1	0.175	1.055	1.165
2	1	0.165	1.160	1.045
3	1	0.230	0.970	1.160
4	1	0.170	0.985	1.165
4	4	0.170	1.070	1.130
5	2	0.145	1.040	1.110
6	4	0.175	1.090	1.285
7	3	0.150	1.020	1.250
8	4	0.190	1.140	1.240
9	3	0.170	1.060	1.175
10	1*	0.160	1.075	1.180
5.4	2.3	0.1727	1.0605	1.1732
2.91	1.35	0.02262	0.05777	0.06746
11	11	11	11	11

with mean, st.dev and n

* = is niet met methode 1 gemeten

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
1	1	7.54	10.40	2.11	7.51	7.37	6.98
2	1	8.69	9.00	9.06	6.76	8.92	8.48
3	1	1.34	-3.11	-2.90	0.26	4.17	-0.05
4	1	5.44	7.90	8.71	6.76	5.37	6.83
5	2	0.79	2.70	5.26	0.96	-0.03	1.93
6	4	-5.47	-1.11	0.61	-3.99	-6.14	-3.22
7	3	-6.57	-5.61	-4.00	-2.89	-4.24	-4.66
8	4	-15.42	-19.56	-18.85	-15.29	-16.49	-17.12
9	3	2.04	6.90	3.11	5.01	0.37	3.48
10	1 *	1.64	-7.51	-3.10	-5.09	0.72	-2.67

5.5	2.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.03	1.29	7.3147	9.3518	8.0889	7.1325	7.5117	7.5677
10	10	10	10	10	10	10	10

with mean, st.dev and n

* = is niet met methode 1 gemeten

tasknr. 1

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in %

LAB	METH	F afw	G afw	H afw	gem afw FGH	gem afw GH
1	1	0.002	-0.005	-0.008	-0.004	-0.007
2	1	-0.008	0.100	-0.128	-0.012	-0.014
3	1	0.057	-0.090	-0.013	-0.015	-0.052
4	1	-0.003	-0.076	-0.008	-0.029	-0.042
4	4	-0.003	0.010	-0.043	-0.012	-0.017
5	2	-0.028	-0.020	-0.063	-0.037	-0.042
6	4	0.002	0.030	0.112	0.048	0.071
7	3	-0.023	-0.040	0.077	0.005	0.018
8	4	0.017	0.080	0.067	0.055	0.073
9	3	-0.003	-0.000	0.002	-0.000	0.001
10	1 *	-0.013	0.015	0.007	0.003	0.011

5.4	2.3	0.0000	-0.0000	-0.0000	-0.0000	-0.0000
2.91	1.35	0.02262	0.05777	0.06746	0.02837	0.04185
11	11	11	11	11	11	11

with mean, st.dev and n

Tabel 5a en b

Afwijkingen per monster t.o.v.
 overall gemiddelde. Gemiddelde
 afwijking per laboratorium
 t.o.v. overall gemiddelde.

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm
VAR2=1

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
1	1	7.54	10.40	2.11	7.51	7.37	6.98
2	1	8.69	9.00	9.06	6.76	8.92	8.48
3	1	1.34	-3.11	-2.90	0.26	4.17	-0.05
4	1	5.44	7.90	8.71	6.76	5.37	6.83
2.5	1.0	5.748	6.045	4.243	5.323	6.453	5.562
1.29	0.00	3.2348	6.1852	5.7326	3.3935	2.1065	3.8135
4	4	4	4	4	4	4	4

with mean, st.dev and n

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm
VAR2=3

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
7	3	-6.57	-5.61	-4.00	-2.89	-4.24	-4.66
9	3	2.04	6.90	3.11	5.01	0.37	3.48
8.0	3.0	-2.265	0.645	-0.445	1.060	-1.935	-0.588
1.41	0.00	6.0811	8.8388	5.0205	5.5861	3.2527	5.7558
2	2	2	2	2	2	2	2

with mean, st.dev and n

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm
VAR2=4

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
6	4	-5.47	-1.11	0.61	-3.99	-6.14	-3.22
8	4	-15.42	-19.56	-18.85	-15.29	-16.49	-17.12
7.0	4.0	-10.440	-10.330	-9.120	-9.640	-11.310	-10.168
1.41	0.00	7.0357	13.0461	13.7532	7.9903	7.3186	9.8288
2	2	2	2	2	2	2	2

with mean, st.dev and n

Tabel 6a, b en c

Afwijkingen per monster t.o.v.
overall gemiddelde. Gemiddelde
afwijking per laboratorium
t.o.v. overall gemiddelde.
Per analysemethode.

Tabel 7 Gemiddelden en standaarddeviatie van laboratoria die gemeten hebben volgens methode 1
tasknr. 1

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm
VAR2=1

LAB	METH	A gem	B gem	C gem	D gem	E gem
1	1	46.50	43.00	34.00	42.00	45.50
2	1	47.65	41.60	40.95	41.25	47.05
3	1	40.30	29.50	29.00	34.75	42.30
4	1	44.40	40.50	40.60	41.25	43.50
2.5	1.0	44.713	38.650	36.138	39.813	44.588
1.29	0.00	3.2348	6.1852	5.7326	3.3935	2.1065
4	4	4	4	4	4	4

with mean, st.dev and n

Tabel 8 Resultaten voormengsels gemeten via een Spectroscopische methode

tasknr. 6

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADUX gehalten in %
VAR2=4

LAB	METH	F gem	G gem	H gem
4	4	0.170	1.070	1.130
6	4	0.175	1.090	1.285
8	4	0.190	1.140	1.240
6.0	4.0	0.1783	1.1000	1.2183
2.00	0.00	0.01041	0.03606	0.07974
3	3	3	3	3

with mean, st.dev and n

Tabel 9 Duplo gemiddelde van monsters A t/m E met monstergemiddelde en standaarddeviatie onder uitsluiting van lab. 8.
tasknr. 6GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADUX gehalten in ppm
VAR1<8 OR VAR1>8

LAB	METH	A gem	B gem	C gem	D gem	E gem
1	1	46.50	43.00	34.00	42.00	45.50
2	1	47.65	41.60	40.95	41.25	47.05
3	1	40.30	29.50	29.00	34.75	42.30
4	1	44.40	40.50	40.60	41.25	43.50
5	2	39.75	35.30	37.15	35.45	38.10
6	4	33.50	31.50	32.50	30.50	32.00
7	3	32.40	27.00	27.90	31.60	33.90
9	3	41.00	39.50	35.00	39.50	38.50
10	1	40.60	25.10	28.80	29.40	38.85
5.2	1.9	40.678	34.778	33.989	36.189	39.967
3.07	1.17	5.2144	6.7288	4.9280	4.9761	5.0729
9	9	9	9	9	9	9

with mean, st.dev and n

* = is niet met methode 1 gemet

GEZAMENLIJK ONDERZOEK CARBADOX gehalten in ppm
VAR1>8 OR VAR1>8

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
1	1	5.82	8.22	0.01	5.81	5.53	5.08
2	1	6.97	6.82	6.96	5.06	7.08	6.58
3	1	-0.38	-5.28	-4.99	-1.44	2.33	-1.95
4	1	3.72	5.72	6.61	5.06	3.53	4.93
5	2	-0.93	0.52	3.16	-0.74	-1.87	0.03
6	4	-7.18	-3.28	-1.49	-5.69	-7.97	-5.12
7	3	-8.28	-7.78	-6.09	-4.59	-6.07	-6.56
9	3	0.32	4.72	1.01	3.31	-1.47	1.58
10	1	-0.08	-9.68	-5.19	-6.79	-1.12	-4.57
5.2	1.9	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000
3.07	1.17	5.2144	6.7288	4.9280	4.9761	5.0729	4.8713
9	9	9	9	9	9	9	9

with mean, st.dev and n

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
1	1	5.82	8.22	0.01	5.81	5.53	5.08
2	1	6.97	6.82	6.96	5.06	7.08	6.58
3	1	-0.38	-5.28	-4.99	-1.44	2.33	-1.95
4	1	3.72	5.72	6.61	5.06	3.53	4.93
2.5	1.0	4.035	3.872	2.149	3.624	4.621	3.660
1.29	0.00	3.2348	6.1852	5.7326	3.3935	2.1065	3.8135
4	4	4	4	4	4	4	4

with mean, st.dev and n

LAB	METH	A afw	B afw	C afw	D afw	E afw	gem afw
7	3	-8.28	-7.78	-6.09	-4.59	-6.07	-6.56
9	3	0.32	4.72	1.01	3.31	-1.47	1.58
8.0	3.0	-3.978	-1.528	-2.539	-0.639	-3.767	-2.490
1.41	0.00	6.0811	8.8388	5.0205	5.5861	3.2527	5.7558
2	2	2	2	2	2	2	2

with mean, st.dev and n

Tabel 10 a, b en c

Afwijkingen per monster
t.o.v. overall gemiddelde.
Gemiddelde afwijking per
laboratorium t.o.v.
overall gemiddelde.
Onder uitsluiting van lab.8

* = is niet met methode 1
gemeten

Lijst van deelnemende laboratoria

Ir K. Haestraete
Rijksontledingslaboratorium
B-2000 Antwerpen
38-Verlatstraat (België)

Ing. L.J. Bastijns
Laboratorium Oleotest
B-2000 Antwerpen
Frankrijklei 90 (België)

Ir G. Debeer
Laboratorium Generaltest
B-2000 Antwerpen
Lange Leeuwstraat 270 (België)

Dr R. Margry
Coöperatief Centraal Laboratorium
NCB-laan 52
5462 GE VEGHEL

Dr Roos
UFAG-Laboratorium
Kornfeldstrasse 2
6210 Sursee (Zwitserland)

Dr C. Brenninkmeyer
Hendrix Voeders B.V.
Veestraat 38
Postbus 1
5839 MA BOXMEER

Drs G. Lounotte
Gezondheidsdienst voor Dieren in Overijssel
Postbus 12
8000 AA ZWOLLE

Dr P. Slump
CIVO-TNO
Postbus 360
3700 AJ ZEIST

De heer K.J. van Schalm
Trouw en Co B.V.
Putten

Drs M.M.L. Aerts
Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten
Bornsesteeg 45
6708 PD WAGENINGEN

1382

1984-05-24

drs M.M.L. Aerts

5

Gezamenlijk onderzoek carbadox in mengvoeder en premix.

Geachte collega,

Hartelijk dank voor uw bereidheid mee te werken aan dit gezamenlijk onderzoek naar carbadox in voeders en premix. Doel is na te gaan wat de spreiding is tussen bepalingen van hetzelfde monster, verricht door verschillende laboratoria met hun eigen "in house"-methoden. Dit alles om te komen tot een reële en verantwoorde tolerantiestelling voor het gehalte carbadox als additief in mengvoeders.

De opzet van het onderzoek is enigszins gewijzigd. We richten ons eerst volledig op de analytische spreiding. Later komt dan eventueel in een kleiner verband de meer technische spreiding aan de orde. Bijgeleverd zijn 8 monsters en een hoeveelheid standaard-carbadox.

A	: meel vóór pelleteren	(50 ppm niveau)	80 gram
B; C; D; E	: gemalen gepelleteerde voeders	(50 ppm niveau)	80 gram
F; G; H	: premix-monsters	(1% niveau)	

Carbadox-standaard (puur).

Elk monster dient in duplo geanalyseerd te worden met de methode zoals die voor dit type monsters binnen uw laboratorium gebruikelijk is. Vermeld de duplo-meetresultaten op het antwoordformulier (Annex 2). Bereken het gehalte carbadox met zowel uw eigen carbadox-standaard als met de hier bijgeleverde standaard.

Beschrijf zo gedetailleerd mogelijk de gebruikte methode en verwijs eventueel naar de literatuur.

Voeg eventuele chromatogrammen en/of integrator print-out volledig bij het antwoordformulier (Annex 4).

Indien binnen uw laboratorium gegevens voorhanden zijn over de spreiding en precisie van de door u gebruikte methode, gelieve deze in Annex 2 te vermelden (herhaalbaarheid; reproduceerbaarheid binnen één laboratorium; etc.).

In Annex 2 kunt u ook de aanwezige gegevens over de recovery van de twee typen monsters vermelden.

Hoewel dit alles vrij veel werk van u vraagt, verzoek ik u toch deze monsters in de maand juni te analyseren. Dit in verband met de vakantie-periode, en de uniformiteit van analyse-tijdstip. De deadline voor de inzending van het antwoordformulier met de analyseresultaten is 6 juli 1984.

Om twijfel over een goede aankomst van de monsters te voorkomen is een ontvangstformulier bijgevoegd (Annex 1). Gelieve dit formulier per omgaande aan ons te retourneren.

Hoogachtend,
de directeur,



Ir M. Heuver

Ontvangstformulier

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en
tuinbouwprodukten
t.a.v. de heer drs M.M.L. Aerts
Bornsesteeg 45
6708 PD WAGENINGEN
Nederland

Gezamenlijk onderzoek carbadox in diervoeder en premix.

Hierbij verklaar ik een set van acht monsters voor het carbadox gezamenlijk onderzoek ontvangen te hebben.

De monsters verkeerden, wel/niet, in een goede conditie.

Beschadigd : monster

Gewichtsverlies: monster

Ik verzoek om nieuwe monsters met code:

Datum

Handtekening

Naam van bedrijf/instituut:

Antwoordformulier

Carbadox gezamenlijk onderzoek

Bedrijf/instituut:

Uitgevoerd door :

Datum :

Monster	Meting 1			Meting 2		
	I* (ppm)	II* (ppm)	Datum	I* (ppm)	II* (ppm)	Datum
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

*: I = gehalte carbadox berekend met de RIKILT-standaard.
 II = gehalte carbadox berekend met de "eigen"-standaard.

Algemene statistische gegevens over de gebruikte methode:

Herhaalbaarheid	Variatie-coëfficiënt =% (CV_R)
Reproduceerbaarheid	Variatie-coëfficiënt =% (CV_R)
Reproduceerbaarheid binnen één lab	Variatie-coëfficiënt =% (CV_{RW})
Recovery (50 ppm niveau)	%
Recovery (1% niveau)	%

Voor definities zie Annex 5.

Antwoordformulier

Gebruikte methode: Graag zo gedetailleerd mogelijk beschrijven.
Indien aanwezig kan een analysevoorschrift bijgevoegd worden.

Principe:

Reagentia en Apparatuur:

Werkwijze:

Berekening:

Antwoordformulier

Chromatogrammen/Meetresultaten/Integrator print-out.

Opmerkingen: b.v. verschil tussen monsters in matrix-storing.

Bijlage

Definities van statistische grootheden welke gevraagd worden in Annex 2.

$$\text{Variatiecoëfficiënt} = CV = \frac{\text{standaardafwijking (S)}}{\text{gemiddelde gehalte}} \times 100$$

De standaardafwijking kan vastgesteld worden onder verschillende condities:

Herhaalbaarheidcondities	: S_r Dezelfde analist, kort na elkaar, zelfde chemicaliën, enz.
Reproduceerbaarheidcondities	: S_R Verschillende laboratoria; alles verschillend behalve methode.
Reproduceerbaarheid binnen één lab:	S_{Rw} Verschillende analisten binnen één lab; verschillende tijden.

$$\text{Zo is dus: } CV_r = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$CV_R = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$CV_{Rw} = \frac{S_{Rw}}{\bar{X}} \times 100\%$$