

Project 505.0610

Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van antibiotica
op microbiologische wijze. Projectleider N.J.G. Broex

Rapport 88.53 juli 1988

Ringonderzoek: Bepaling van
avoparcine gehalte in diervoeders
met behulp van agar-diffusie

N.J.G. Broex

Afdeling Microbiologie

Goedgekeurd door dr F. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN

directeur
sectorhoofden
coördinator dierlijke produkten
projectbeheer
circulatie
bibliotheek
drs. M. Aerts
ir. H. Stegeman
afd. Microbiologie (5x)

EXTERN

Directie Landbouwkundig Onderzoek
directie VKA
directie VD
directie VZ
CIVO-TNO (dhr. H. Pouw)
Rijksontledingslaboratorium Antwerpen
Secr. Overleggroep residuanalyse
ing. J. den Hartog (PVVr)
drs. D. Schumer (VZ)
ir. L. Visscher (VZ)
mr. Baron de Loë (JBOZ)
dr. L. Jager (CDI)
dr. G. v.d. Bosch (CCL)
dhr. K. v. Schalm (TROUW bv.)

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	II
1 INLEIDING	1
2 MATERIAAL	1
3 METHODEN	2
4 RESULTATEN	
4.1. Ringonderzoek	2
4.2. Aanvullend onderzoek	3
4.3. Stabiliteit	3
5 OPMERKINGEN	4
6 CONCLUSIES	4
7 REFERENTIES	4
TABELLEN	
BIJLAGEN	
A DEELNEMERSLIJST	
B METHODE	

SAMENVATTING

De microbiologische agar-diffusie methode voor de bepaling van het gehalte in diervoeders is geringtest door 12 laboratoria. Ieder laboratorium heeft van 3 monsters het gehalte bepaald. Een voormengsel, een gepelleteerd en een ongepelleteerd diervoer. De monsters zijn door de deelnemers in drievoud onderzocht met de voorgeschreven EEG-methode. Na statistische evaluatie van de resultaten zijn de herhaalbaarheids- en de reproduceerbaarheidswaarde berekend.

Voor deze monsters is de herhaalbaarheid gemiddeld 5,2% en de reproduceerbaarheid gemiddeld 16,1%.

Naar aanleiding van deze ringtest heeft er een beperkt vervolgonderzoek plaatsgevonden met een enigzins gemodificeerde methode. Ook deze resultaten zijn in dit verslag opgenomen. De gemodificeerde methode geeft in het algemeen een betere recovery dan de EEG-methode.

1 INLEIDING

Reeds lang was er onvrede over de toch vaak lagere recoverys van de avoparcine bepaling in diervoeders. Na uitvoerig intern onderzoek is er overlegd met de fabrikant van dit preparaat over de mogelijke oorzaak van steeds terugkerende lagere gehalten. Met de fabrikant is de methode op al zijn kritische punten uitvoerig besproken. Vooronderzoek en uitwisseling van monstermateriaal gaf geen duidelijk verbetering van de recovery. Nadat de fabrikant zich overtuigd had van de juiste uitvoering van de bepaling werd besloten een ringonderzoek te organiseren met monstermateriaal dat door de fabrikant speciaal voor dit doel gemaakt was. Homogene diervoeders, van praktisch samenstelling, met 10 mg/kg avoparcine en het gebruikte voormengsel. In verband met de eventuele invloed van pelletteren werd een gepelleteerd en een ongepelleteerd voer in deze ringtest betrokken.

Het hoofddoel was om de spreiding tussen de verschillende laboratoria vast te stellen, indien de monsters onderzocht werden met de voorgeschreven EEG-methode.

Alle laboratoria hadden reeds de benodigde ervaring met de methode. Aan dit ringonderzoek werd deelgenomen door veelal EEG-laboratoria die belast zijn met de ambtelijke controle van diervoeders.

(Deelnemerslijst zie bijlage 1).

2 MATERIAAL

Monster nummer	Soort	Concentratie mg/kg
R 832/131 N	Mestkuikenmeel voormengsel	1100
R 832/103 C	Mestkuikenmeel pellets	10
R 832/131 B	Mestkuikenmeel meel	10

De monsters werden als proefcharge door de fabrikant samengesteld en gemengd.

Door het Rikilt werden de monsters na mengen verdeeld in porties van respectievelijk 50, 200 en 200 gram en naar de deelnemende laboratoria verstuurd.

Gelijk met de monsters werd een Avoparcine standaardpreparaat meege-
stuurd met een activiteit van 942 ug/mg.

3 METHODEN

3.1. "Determination of Avoparcin by diffusion in agar medium" EEG no. L 257 (zie bijlage 2)

3.2. Als methode 3.1. met uitzondering van het voedingsmedium punt 4.1.

Samenstelling:

Glucose	10,0 g
Gistextract	2,5 g
Dikaliumfosfaat (K_2HPO_4)	0,69 g
Monokaliumfosfaat (K^2PO^4)	0,45 g
Agar	15,0 g
pH 6,5 (na sterilisatie)	

4 RESULTATEN

4.1. Ringonderzoek

In de tabellen 3 t/m 5 zijn de resultaten van de 12 deelnemende laboratoria opgenomen en statistisch verwerkt volgens ISO 5725 (1).

Van het voormengsel werd gemiddeld 96,0 % teruggevonden met een laagste waarde van 71,9% en een hoogste waarde van 115,3%.

Voor het voer zijn de gemiddelde teruggevonden percentages voor ongepelleteerd en gepelleteerd respectievelijk 94,1 en 93,4%

De laagste en hoogste waarden zijn respectievelijk 68,3%, 140,3% en 75,0% en 114,7%.

Geen van de deelnemende laboratoria, blijkt uit de statistische evaluatie, heeft statistisch afwijkende resultaten.

Onderstaand een overzicht van de variatiecoëfficiënten binnen de laboratoria, tussen de laboratoria en de totale variatie coëfficiënt.

Tabel 1.

Monster nummer	Gedoseerde gehalte	Gemiddeld teruggevonden	V.C. (r)	V.C. (R)	V.C. (L)
	mg/kg	%	%	%	%
R 832/131 N	1100	96,0	5,4	13,8	12,7
R 832/131 B	10	94,1	4,3	20,7	20,2
R 832/103 C	10	93,4	5,8	13,8	12,5

4.2. Aanvullend onderzoek

11 diervoeders, al of niet gepelleteerd, zijn aanvullend onderzocht met de EEG-methode en de gemodificeerde EEG-methode.

Gemiddeld wordt met de gemodificeerde methode ca. 13 % meer teruggevonden.

De resultaten zijn per monster weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 2.

Recoverys van gehalten verkregen met de EEG-methode en de gemodificeerde EEG-methode.

Monster nummer	Opgegeven gehalte mg/kg	Recovery EEG-meth	Recovery gemodi. EEG-meth
		%	%
1	10	88,0	101,0
2	10	82,0	102,0
3	10	49,0	70,0
4	10	65,0	77,0
5	10	71,0	75,0
6	15	73,3	94,7
7	15	86,7	82,7
8	20	65,0	82,0
9	20	49,0	72,5
10	20	65,0	72,5
11	40	67,8	76,3
gemiddeld		69,3	82,3

4.3. Stabiliteit

De monsters die in dit ringonderzoek onderzocht zijn zijn 18 maanden na bereiding nogmaals onderzocht met de gemodificeerde methode.

Gedurende deze 18 maanden zijn de monsters, afgesloten van daglicht, bij kamertemperatuur bewaard.

Van het voormengsel en de diervoeders werd respectievelijk 108, 83 en 83% teruggevonden.

5 OPMERKINGEN

De bepalingen zijn over het algemeen zonder problemen uitgevoerd.

Enkele opmerkinge die bij de resultaten gevoegd waren zijn:

- geen meetbare remzones bij de laagste verdunning, daarom de verdunning van de standaard aangepast zodat de hoogste standaardconcentratie 4 ug/ml bevat in plaats van 2 ug/ml zoals oorspronkelijk voorgeschreven is.
- de pH instelling van 4,5 is zeer kritisch maar zoals voorgeschreven onpraktisch.
- bij een inweeg van 50 gram monnster zou bij de uiteindelijke concentratieberekening rekening gehouden moeten worden met de hoeveelheid vocht in het monster zelf.
- twee deelnemers maakten de opmerking dat ze in de praktijk problemen hebben met lagere gehaltenes avoparcine dan oorspronkelijk is toegevoegd.

6 CONCLUSIES

- De gedoseerde concentraties worden in het algemeen teruggevonden. Bij grote verschillen (recovery < 80%) is het zinvol nader onderzoek te doen naar de evt. invloed van de gebruikte agar. De resultaten komen overeen met de resultaten gevonden bij eerdere ringonderzoeken (2) en zijn in het algemeen beter dan een in 1981 uitgevoerd ringonderzoek.
- Uit aanvullend onderzoek is gebleken dat aanpassing van de te gebruiken voedingsbodem een betere recovery geeft.
- Beperkt stabiliteitsonderzoek geeft aan de de concentratie over een peroide van minimaal 18 maande niet significant terugloopt.

7 REFERENTIES

7.1. ISO-5725 "Determination os repatability and reproducibility by interlaboratory tests".

7.2. Analytical Methods Committee THE Analist November 1979 Vol. 104 No 1244 p. 1075-1082.

 *
 * Interlaboratory analysis ; uniform level experiment *
 *

DETERMINATION OF AVOPARCIN IN ANIMAL FEED FORMULATIONS

R 832/131 n (1100 ppm)

Lab	Results			Mean	St Dev	n
1	723.000	878.000	773.000	791.333	79.110	3
2	1138.000	1231.000	1240.000	1203.000	56.471	3
3	1064.000	1097.000	1088.000	1083.000	17.059	3
4	1030.000	950.000	1010.000	996.667	41.633	3
5	1037.000	1042.000	1096.000	1058.333	32.716	3
6	1026.000	1114.000	1126.000	1088.667	54.602	3
7	1144.000	1042.000	1068.000	1084.667	53.003	3
8	1272.000	1140.000	1200.000	1204.000	66.091	3
9	980.000	1030.000	961.000	990.333	35.642	3
10	1066.000	989.000		1027.500	54.447	2
11	1309.000	1276.000	1220.000	1268.333	44.993	3
12	969.000	880.000	769.000	872.667	100.201	3

Results of repeatability/reproducibility calculations

MEAN of the results of 12 labs :1056.514

REPEATABILITY	161.553	REPRODUCIBILITY	411.474
SD rep.	57.118	SD repr.	145.478
CV rep.	5.406%	CV repr.	13.770%
SD betw.labs	133.796	CV betw.labs	12.664%

Tests		Tab. values		Test value	Lab nr	Remarks
		5%	1%			
Cochran		0.392	0.475	0.257	12	No Outlier
Dixon		0.479	0.579	0.197	1	No Outlier
				0.163	11	No Outlier

 *
 * Interlaboratory analysis ; uniform level experiment *
 *

DETERMINATION OF AVOPARCIN IN ANIMAL FEED FORMULATIONS

R 832/131 B (10 ppm)

Lab	Results			Mean	St Dev	n
1	7.200	7.000	6.300	6.833	0.473	3
2	9.900	10.000	9.100	9.667	0.493	3
3	11.000	10.900	10.000	10.633	0.551	3
4	8.600	8.800	8.700	8.700	0.100	3
5	11.600	10.500	10.900	11.000	0.557	3
6	9.600	10.600	10.400	10.200	0.529	3
7	9.000	9.700	9.700	9.467	0.404	3
8	8.000	7.600	7.500	7.700	0.265	3
9	8.700	8.900	8.100	8.567	0.416	3
10	14.000	13.900	14.200	14.033	0.153	3
11	7.700	8.000	8.200	7.967	0.252	3
12	8.400	7.900	8.200	8.167	0.252	3

Results of repeatability/reproducibility calculations

MEAN of the results of 12 labs : 9.411

REPEATABILITY	1.133	REPRODUCIBILITY	5.506
SD rep.	0.401	SD repr.	1.947
CV rep.	4.258%	CV repr.	20.683%
SD betw.labs	1.905	CV betw.labs	20.240%

Tests		Tab. values		Test value	Lab nr	Remarks
		5%	1%			
Cochran		0.392	0.475	0.161	5	No Outlier
Dixon		0.479	0.579	0.208	1	No Outlier
				0.479	10	No Outlier

 *
 * Interlaboratory analysis ; uniform level experiment *
 *

DETERMINATION OF AVOPARCIN IN ANIMAL FEED FORMULATIONS

1986-06-16

R 832/131 B (lab 10 deleted)

Lab	Results			Mean	St Dev	n
1	7.200	7.000	6.300	6.833	0.473	3
2	9.900	10.000	9.100	9.667	0.493	3
3	11.000	10.900	10.000	10.633	0.551	3
4	8.600	8.800	8.700	8.700	0.100	3
5	11.600	10.500	10.900	11.000	0.557	3
6	9.600	10.600	10.400	10.200	0.529	3
7	9.000	9.700	9.700	9.467	0.404	3
8	8.000	7.600	7.500	7.700	0.265	3
9	8.700	8.900	8.100	8.567	0.416	3
11	7.700	8.000	8.200	7.967	0.252	3
12	8.400	7.900	8.200	8.167	0.252	3

Results of repeatability/reproducibility calculations

MEAN of the results of 11 labs : 8.991

REPEATABILITY	1.177	REPRODUCIBILITY	3.831
SD rep.	0.416	SD repr.	1.355
CV rep.	4.627%	CV repr.	15.065%
SD betw.labs	1.289	CV betw.labs	14.337%

Tests		Tab. values		Test value	Lab nr	Remarks
		5%	1%			
Cochran		0.417	0.504	0.163	5	No Outlier
Dixon		0.502	0.605	0.228	1	No Outlier
				0.111	5	No Outlier

Deelnemers ringnederlandsche Avoopascuie

Instituut CIVO-Analyse TNO,
t.a.v. de heer H. Pouw
afd. Microbiologie
Utrechtseweg 48
3704 HE ZEIST.

bilage: A

Rijksontledingslaboratorium
t.a.v. de heer dr A. Fontaine
Verlatstraat 38
B-2000 ANTWERPEN (België)

Staatl. Landw. Untersuchung- und
Forschungsanstalt
Dr A. Thalmann
Nesslerstrasse 23
75-KARLSRUHE (BRD)

Staatl. Landw. Untersuchungs- und
Forschungsanstalt
Dr C.H.R. Dresbach,
Weberstrasse 59-61,
5300 BONN 1 (B.R.D.)

Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur
und Pflanzenbau
Dr E. Bucher
Vöttingerstr. 38
8050 FREISING (B.R.D.)

Eidgenössische Forschungsanstalt für
Viehwirtschaftliche Produktion
Dr J.L. Gafner,
Grangeneuve
CH-1725 POSIEUX (Schweiz)

Laboratoire de la Répression
des Fraudes,
Dr Michard
26, Rue de Coëtlogon
35000 RENNES (France)

Laboratoire Central d'Hygiene
Alimentaire
Dr Tao
Rue de Dantzig 43
75015 PARIS (France)

Department of Agriculture and Fisheries
Dr D. Hayes
Abbotstown
Castleknock
DUBLIN 5 (Ireland)

Statens Fodderstof Kontrol
Mrs Sommer
Skovbrynet 6
2800 LYNGBY
(DENMARK)

BIJLAGE

I. BEPALING VAN AVOPARCIN DOOR MIDDEL VAN AGARDIFFUSIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Met deze methode kan avoparcin in diervoeders en voormengsels worden bepaald. De ondergrens van de bepaling ligt bij 2 mg/kg (2 ppm). In aanwezigheid van polyether-antibiotica kan de bepaling gestoord worden.

2. PRINCIPE

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van aceton, water en zoutzuur. De antibiotische activiteit van het extract wordt bepaald door meting van de diffusie van avoparcin in een agarvoedingsbodem die geënt is met *Bacillus subtilis*. De diffusie wordt zichtbaar door de vorming van groeiremmingszones van het micro-organisme. De diameter van deze remzones wordt geacht recht evenredig te zijn met de logaritme van de antibioticumconcentratie binnen het gebruikte concentratiegebied.

3. MICRO-ORGANISME: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Bewaren van de stam

Buizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1) worden geënt met *Bacillus subtilis* en een nacht bebroed bij 30 °C. De kweek wordt in de koelkast bewaard bij ca. 4 °C. Elke maand wordt opnieuw overgeënt.

3.2. Bereiding van de sporesuspensie ⁽¹⁾

Een vers bereide cultuur in een agarbuisje (3.1) wordt gesuspendeerd in 2 à 3 ml steriel water. Met deze suspensie wordt het oppervlak beënt van 300 ml in een Roux-fles gestolde voedingsbodem (4.1), die daarna 3-5 dagen geïncubeerd wordt bij 30 °C. Neem de cultuur op in 15 ml ethanol (4.2) na de vorming van sporen te hebben gecontroleerd onder de microscoop en meng goed. Deze suspensie kan ten minste 5 maanden bij ca. 4 °C bewaard worden.

4. VOEDINGSBODEMS EN REAGENTIA

4.1. Voedingsbodems ⁽²⁾

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Gistextract	3,0 g
Rundvleesextract	1,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Water	1 000 ml
pH 6,5 (na sterilisatie).	

4.2. Ethanol 20 % (v/v): verdun 200 ml ethanol met 800 ml water.

4.3. Zoutzuur, d: 1,18-1,19.

⁽¹⁾ Andere methoden kunnen gebruikt worden voor zover is bewezen dat zij overeenkomstige sporesuspensies geven.

⁽²⁾ Elke handelsvoedingsbodem van vergelijkbare samenstelling, die dezelfde resultaten geeft, kan gebruikt worden.

- 4.4. 2 M-natriumhydroxydeoplossing.
- 4.5. Fosfaatbuffer, 0,1 M:
Monokaliumfosfaat, KH_2PO_4 13,6 g
Water tot 1 000 ml
Breng de pH op 4,5.
- 4.6. Mengsel van aceton, water en zoutzuur (4.3): 65 : 32,5 : 2,5 (v/v/v).
- 4.7. Standaard: avoparcinsulfaat met bekende activiteit.

5. STANDAARDOPLOSSINGEN

Los een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid standaard (4.7) van ongeveer 10 mg op in de fosfaatbuffer (4.5), en verdun met deze buffer tot een voorraadoplossing van 100 μg avoparcin per ml. Deze kan in een gesloten kolf maximaal 7 dagen bij 4 °C bewaard worden.

5.1. Voor voormengsels

Met de voorraadoplossing worden door successieve verdunning met de buffer (4.5) de volgende oplossingen bereid:

- S₈ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₄ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₂ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₁ 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.2. Voor diervoeders

Met de voorraadoplossing worden door successieve verdunning met de buffer (4.5) de volgende oplossingen bereid:

- S₈ 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₄ 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₂ 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
S₁ 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6. BEREIDING VAN HET EXTRACT EN DE VERDUNNINGEN

6.1. Voormengsels

Weeg tot op 10 mg nauwkeurig een hoeveelheid van het monster af die 10 tot 100 mg avoparcin bevat. Breng deze hoeveelheid met 60 ml van het mengsel (4.6) over in een maatkolf van 100 ml. Schud gedurende 15 minuten op een schudapparaat. Controleer de pH en breng hem zo nodig op 2 met zoutzuur (4.3). Vul aan tot 100 ml met mengsel (4.6) en meng goed. Filtreer een deel door geschikt filtreerpapier (b. v. Whatman nr. 1), waarbij de eerste 5 ml van het filtraat worden weggegooid. Neem een aliquoot deel en breng met natriumhydroxydeoplossing (4.4) op pH 4,5. Verdun deze oplossing met buffer (4.5) totdat een aangenomen avoparcinconcentratie van 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ is bereikt (= U₈).

Bereid, uitgaande van deze oplossing, door successieve verdunning (1+1) met buffer (4.5), de oplossingen U₄ (aangenomen gehalte 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), U₂ (aangenomen gehalte 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en U₁ (aangenomen gehalte 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.2. Diervoeders

Voeg aan een afgewogen hoeveelheid van 50,0 g monster 100 ml van het mengsel (4.6) toe en schud gedurende 30 minuten op een schudapparaat. Maak het extract helder door centrifugeren (waarbij gebruik wordt gemaakt van met een stop gesloten centrifugebuizen), neem een aliquoot deel van het heldere extract (zie onderstaande tabel) en breng met de natriumhydroxydeoplossing (4.4) de pH op 4,5. Verdun dit aliquoot deel met buffer (4.5) tot U₈ (zie onderstaande tabel).

Bereid, uitgaande van deze oplossing, door successieve verdunningen (1 + 1) met de buffer (4.5), de oplossingen U₄ (aangenomen gehalte: 1,0 µg/ml), U₂ (aangenomen gehalte: 0,5 µg/ml) en U₁ (aangenomen gehalte: 0,25 µg/ml).

Vermoedelijk avoparcinegehalte in (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Gewicht van het monster in g (± 0,1 g)	50	50	50	50	50	50
Volume van het mengsel (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Volume van het heldere extract (ml)	20	15	20	15	20	10
Eindvolume (ml): U ₄	25	25	50	50	100	100
Aangenomen U ₄ concentratie in µg/ml	2	ca. 2	2	ca. 2	2	2

7. UITVOERING VAN DE BEPALING

7.1. Enten van de voedingsbodem

Beënt bij 50 °C de voedingsbodem (4.1) met de sporesuspensie (3.2). Door voorafgaande proeven met platen met voedingsbodem (4.1) dient men de hoeveelheid sporesuspensie te bepalen die bij de verschillende concentraties avoparcin zo groot mogelijke remzones geeft, die toch nog scherp zijn.

7.2. Gereedmaken van de platen

De agardiffusie vindt plaats in platen waarop de vier standaardconcentraties (S₁, S₄, S₂ en S₈) voorkomen en de vier extractconcentraties (U₄, U₂ en U₁). Elke plaat moet beslist alle vier concentraties van standaard en extract bevatten. Daarom moet de afmeting van de platen zo gekozen worden dat men in de agarvoedingsbodem ten minste 8 gaatjes kan ponsen van 10 tot 13 mm diameter, waarvan de middelpunten niet minder dan 30 mm van elkaar verwijderd zijn. Als platen kan men vlakke glazen platen gebruiken, waarop aluminium of plastic ringen van 200 mm diameter en 20 mm hoogte gezet worden.

Giet in de platen een hoeveelheid voedingsbodem (4.1), geënt als aangegeven in 7.1, die een laagdikte van ca. 2 mm geeft (60 ml voor een plaat van 200 mm diameter). Laat de voedingsbodem stollen, pons er de gaatjes in en pipeteer er de exact afgemeten hoeveelheden van standaard en extract in (0,10 tot 0,15 ml per gaatje, afhankelijk van de diameter). Breng iedere concentratie tenminste in viervoud aan, zodat iedere bepaling als grondslag voor de berekening 32 remzones heeft.

7.3. Broeding

Broed de platen 16 tot 18 uur bij 30 °C.

8. METING EN BEREKENING

Meet de diameter van de remzones tot op 0,1 mm nauwkeurig. Zet voor elke concentratie de gemiddelde waarden op semilogaritmisch papier uit, zodanig dat de logaritme van de concentraties tegen de diameter van de remzones komt te staan. Trek de best passende lijnen voor standaard en extract en ga daarbij, bij voorbeeld, als volgt te werk.

Bepaal het meest passende punt voor de laagste standaardwaarde (SL) volgens de formule:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Bepaal het meest passende punt voor de hoogste standaardwaarde (SH) volgens de formule:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Bepaal op dezelfde wijze de meest passende punten voor de laagste extractwaarde (UL) en de hoogste extractwaarde (UH) door in bovenstaande formules S_1 , S_2 , S_4 en S_8 door U_1 , U_2 , U_4 en U_8 te vervangen.

Vul de waarden SL en SH in dezelfde grafiek in. Door deze twee punten te verbinden krijgt men de meest passende rechte voor de standaardoplossing. Op dezelfde wijze verkrijgt men met UL en UH de meest passende rechte voor het extract.

Wanneer er geen enkele storing is, moeten de rechten evenwijdig zijn. In de praktijk kunnen de rechten als evenwijdig worden beschouwd wanneer $(SH - SL)$ en $(UH - UL)$ niet meer dan 10 % van hun gemiddelde afwijken.

Als de rechten niet evenwijdig zijn, kan men hetzij U_1 en S_1 , hetzij U_8 en S_8 uitsluiten. De waarden SL, SH, UL en UH waarmee men dan de meest passende rechten kan trekken, worden dan berekend volgens de volgende formules:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{of} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{of} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

en analoge formules voor UL en UH. De met deze alternatieve formules getrokken rechten moeten ook op evenwijdigheid onderzocht worden, zoals boven aangegeven. Wanneer het resultaat uit drie niveaus berekend is, moet dit op het analysecertificaat vermeld worden.

Wanneer de rechten als evenwijdig beschouwd kunnen worden, wordt de logaritme van de relatieve activiteit ($\log A$) berekend volgens één van de volgende formules:

Voor 4 niveaus

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Voor 3 niveaus

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

of

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Werkelijke activiteit = aangenomen activiteit \times relatieve activiteit.

Blijkt de relatieve activiteit buiten het gebied 0,5 tot 2,0 te liggen, dan moet men de bepaling herhalen met geschikte aanpassingen aan de extractconcentraties of, indien zulks onmogelijk is, aan de standaardoplossingen. Indien de relatieve activiteit in het gebied van de gevraagde waarden niet opgebracht kunnen worden, moet het resultaat als een benadering worden beschouwd en als zodanig op het analysecertificaat worden vermeld.

Wanneer de rechten niet als evenwijdig beschouwd kunnen worden, moet men de bepaling herhalen. Wanneer het dan nog steeds niet lukt evenwijdige rechten te verkrijgen, moet de bepaling als niet bevredigend worden beschouwd.

9. HERHAALBAARHEID

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen aan hetzelfde monster uitgevoerd door dezelfde analist mag niet groter zijn dan:

- 2 mg/kg in absolute waarde bij avoparcingehalten van 2 t/m 10 mg/kg;
- 20 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 10 en t/m 25 mg/kg;
- 5 mg/kg in absolute waarde bij gehalten van meer dan 25 en t/m 50 mg/kg;
- 10 % van de hoogste waarde bij gehalten van meer dan 50 mg/kg.