

# Onderzoek naar de mogelijkheden van controlemonsters bij vitamine- analyses. Evaluatie van het gebruik van de Exponential Moving Average (EMA-)grafiek

J.H. Slangen en Ir. P.C.H. Hollman

rikilt-dlo



Project 505.0100  
Ontwikkeling analysemethoden voor micronutriënten  
Projectleider: ir. P.C.H. Hollman

Rapport 91.36

Juli 1991

Onderzoek naar de mogelijkheden van controlemonsters bij vitamine-analyses. Evaluatie van het gebruik van de Exponential Moving Average (EMA-) grafiek.

J.H. Slangen en ir. P.C.H. Hollman

Medewerkers: H.M. van der Struijs-van de Putte, H.C.H. Kleijnen

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 08370-75400  
Telex 75180 RIKIL  
Telefax 08370-17717



Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten. Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN:

directeur

sectorhoofden

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

afdeling Micronutriënten en Natuurlijke Toxische Stoffen (5x)

circulatie

bibliotheek (3x)

### EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Ware(n) Chemicus

CIVO-TNO

Inspectie Gezondheidsbescherming Keuringsdienst van Waren Maastricht (Ir. H.H.S. Roomans)

Landbouwuniversiteit Wageningen (Prof. dr. M.B. Katan)

Centraal Orgaan Zuivelcontrole (J. van de Bedem)



## ABSTRACT

Onderzoek naar de mogelijkheden van controlemonsters bij vitamine-analyses. Evaluatie van het gebruik van de Exponential Moving Average (EMA-) grafiek.

Possibilities of control samples for vitamin analyses and the use of the Exponential Moving Average (EMA) graph (in Dutch)

Report 91.36                      July 1991

J.H. Slangen and P.C.H. Hollman

Agricultural Research Department (DLO-NL)  
State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)  
P.O Box 230, NL-6700 AE Wageningen, The Netherlands

8 tables, 8 appendices

This report describes the use of a control sample (non enriched full cream milk powder) for the analysis of vitamin A (retinol), vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>2</sub>. The stability of this control sample is investigated over a period of more than 2 years under given storage conditions. Analyses are performed in our laboratory each month in triplicate or quadruplicate for each vitamin. The analytical and the between months standard deviations are calculated. For all methods used, except that for vitamin E, a significant between months effect is established. Further, a significant deterioration of vitamin A (0.052 IE/100 g per day) and vitamin B<sub>2</sub> (0.325 ug riboflavin/100 g per day) is observed.

After correction for this deterioration the coefficient of variation ( $CV_R$ ) for the methods is for vitamin A 2.9%, for vitamin E 3.5%, for vitamin B<sub>1</sub> 6.5% and for vitamin B<sub>2</sub> 5.6%. Criteria for future control samples are given. Some suggestions for improvement of the analytical method and stability of the control sample are also given.

The Exponential Moving Average (EMA) graph instead of the Shewhart graph or the Cumulative Sum graph has some strong benefits for use in control samples. The EMA graph discriminates between systematical and at random errors and detects deterioration in an early stage.

Key words: control sample, vitamins, Exponential Moving Average, stability, vitamin A, vitamin E, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, control charts

( )

( )

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 CONTROLEKAARTEN	8
3 MATERIAAL EN METHODE	9
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	9
4.1 Resultaten vitamine A (retinol)	10
4.2 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine A	12
4.3 Resultaten vitamine E ( $\alpha$ -tocoferol)	13
4.4 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine E	15
4.5 Resultaten vitamine B <sub>1</sub>	15
4.6 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine B <sub>1</sub>	15
4.7 Resultaten vitamine B <sub>2</sub>	17
4.8 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine B <sub>2</sub>	18
5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	18
6 LITERATUUR	20
BIJLAGEN	
A EMA-tabel voor vitamine A	
B EMA-grafieken voor vitamine A	
C EMA-tabel voor vitamine E	
D EMA-grafiek voor vitamine E	
E EMA-tabel voor vitamine B <sub>1</sub>	
F EMA-grafiek voor vitamine B <sub>1</sub>	
G EMA-tabel voor vitamine B <sub>2</sub>	
H EMA-grafieken voor vitamine B <sub>2</sub>	



( )

( )

## SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de mogelijkheden van het gebruik van een niet-gevitamineerde volle melk poeder als controlemonster bij de analyse van vitamine A (retinol), vitamine E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub>. Onderzocht werd of het niveau van de gebruikte analysemethoden in de tijd constant is door elke maand in drie- of viervoud een monster te analyseren. Nagegaan werd of het gehalte van deze vitamines tijdens bewaring gedurende 2 jaar onder de omschreven omstandigheden constant is. Ook werden de mogelijkheden onderzocht van het gebruik van de EMA-grafiek (Exponential Moving Average) om snel toevallige en systematische fouten te herkennen en aan de hand daarvan een analyseserie goed dan wel af te keuren.

Met uitzondering van vitamine E kan voor alle analysemethoden aangetoond worden dat de spreiding van het niveau in de tijd significant groter is dan de analytische spreiding. De berekende variatiecoëfficiënten ( $CV_R$ ) bedragen voor vitamine A 3,3%, voor vitamine E 3,5%, voor vitamine B<sub>1</sub> 6,5% en voor vitamine B<sub>2</sub> 8,7%.

Het gehalte aan vitamine A en vitamine B<sub>2</sub> blijkt significant af te nemen in de tijd met 0,052 IE/100 gram resp. 0,325  $\mu$ g/100 gram per dag. Na correctie voor dit verloop bedragen de variatiecoëfficiënten ( $CV_R$ ) voor deze vitamines 2,9% resp. 5,6%.

Criteria voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid binnen het laboratorium voor dit controlemonster en een procedure voor het gebruik in de toekomst worden beschreven voor de gebruikte analysemethoden. Mogelijkheden voor eventuele verbeteringen van de analyse-methoden worden eveneens aangegeven.

Grafische presentatie van de gemiddelde waarnemingen in een EMA-grafiek maakt onderscheid tussen systematische en toevallige fouten mogelijk. De EMA-grafiek blijkt een goed hulpmiddel te zijn om verloop in het gehalte in een vroeg stadium te herkennen.

( )

i )

## 1 INLEIDING

Controlemonsters zijn een onmisbaar element in het kwaliteitsbewakingssysteem voor de analyses van een betrouwbaar laboratorium. Met behulp van controlemonsters kan een constant analyseniveau in de tijd gegarandeerd worden. Dit betekent echter niet automatisch dat dit analyseniveau ook het "juiste" of "ware" niveau is.

Referentiematerialen met een gecertificeerde waarde voor de desbetreffende verbinding zijn een belangrijk hulpmiddel bij het vaststellen van het juiste niveau. Referentiematerialen voor de analyse van vitamines in voedingsmiddelen zijn echter op dit moment nog niet beschikbaar.

Een instantie in internationaal verband die zich bezig houdt met het produceren en certificeren van referentiematerialen is het Bureau Communautaire de Reference (BCR). BCR heeft bovengenoemde lacune bij de analyse van nutriënten in levensmiddelen onderkend en heeft een programma voor de ontwikkeling van deze materialen, o.a. voor vitamines, gestart.

Voordat echter een materiaal geschikt geacht wordt als referentiemateriaal dient o.a. bekend te zijn wat de stabiliteit van de gewenste component in het desbetreffende monstermateriaal is en onder welke condities bewaring en opslag plaats moet vinden. Het RIKILT-DLO voert in opdracht van BCR een bewaarstudie uit van een aantal kandidaat materialen. Opzet van deze studie is een aantal macronutriënten en micronutriënten te bepalen in de materialen op bepaalde tijdstippen ( $t=0$ ,  $t=3$ ,  $t=6$ ,  $t=12$ ,  $t=18$  en  $t=24$  maanden) na bewaring bij verschillende temperaturen ( $T=-18$ ,  $T=4$ ,  $T=20$  en  $T=37^{\circ}\text{C}$ ).

Bij dit soort studies is het uitermate belangrijk dat een eventueel gemeten verandering in het gehalte niet veroorzaakt wordt door schommelingen in het niveau van de analyse in de tijd. De bewaartemperatuur  $-18^{\circ}\text{C}$  wordt derhalve geïntroduceerd als een analytische niveaucontrole. Men gaat er vanuit dat bij  $-18^{\circ}\text{C}$  geen stabiliteitsproblemen te verwachten zijn. Bij de aanvang van deze bewaarstudie bestond enige twijfel of deze aanname ook opgaat voor de hier bestudeerde vitamines.

Om toch eventuele schommelingen van het niveau van de analyse in kaart te kunnen brengen werd bij aanvang van de bewaarstudie (september 1988) een controlemonster samengesteld dat elke maand geanalyseerd werd met omschreven analysemethoden, gedurende de duur van de bewaarstudie, minimaal 2 jaar. Bepaald werd het gehalte aan vitamine A (retinol), vitamine E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub>.

Ook werd nagegaan wat de waarde is van het gebruik van een bepaald type controlekaart, de EMA-grafiek (Exponential Moving Average), bij dit soort onderzoek. Met een EMA-grafiek is het mogelijk om uitschieters sneller te signaleren en te herkennen als toevallige fouten of als systematische fouten, waardoor op tijd en op de juiste manier ingegrepen kan worden, zie Hoofdstuk 2.

Dit verslag geeft een overzicht van de analyseresultaten van dit controlemonster en gaat in op de problemen die met deze aanpak gesignaleerd werden. Verder worden aan de hand van de gevonden resultaten criteria voor een eventueel nieuw samen te stellen controlemonster gegeven.

## 2 CONTROLEKAARTEN

Een vaak gebruikte methode voor de grafische presentatie van de gehalten van controle-monsters is de Shewhart-kaart. Hierbij wordt uit een groot aantal analyses gespreid in de tijd de gemiddelde waarde (normwaarde) en de standaardafwijking  $s_m$  van dit gemiddelde berekend (historisch bestand, leerset). Voorwaarde is dat de analyses van dit controlemonster onder identieke condities uitgevoerd worden, dus steeds hetzelfde aantal herhalingen per serie, dezelfde analysemethode etc. Uit deze gegevens kunnen dan de waarschuwingsgrenzen (normwaarde  $\pm 2 \times s_m$ ) en de alarmgrenzen (normwaarde  $\pm 3 \times s_m$ ) berekend worden. Indien nu een analyseresultaat buiten de alarmgrenzen valt, is er bijna zeker ( $\alpha = 0,0027$ ) sprake van een foutief resultaat. Het is echter niet bekend of deze fout alleen maar in de desbetreffende analyseserie voorkomt of veroorzaakt is door een verandering in het analyiseniveau.

Een extra grafiek, de cumulatieve-som grafiek (CUMSUM-chart), kan hier de benodigde informatie geven. Bij deze grafiek worden de gecumuleerde afwijkingen van de analyseresultaten op een bepaald tijdstip  $t$  uitgezet ten opzichte van de normwaarde, in formule:

$$\text{CUMSUM}_t = (\text{gem}_t - \text{norm}) + \text{CUMSUM}_{t-1},$$

waarbij  $\text{CUMSUM}_0$  gelijk is aan nul. De tangens van de hoek die de CUMSUM-grafiek maakt met de horizontale lijn is recht evenredig met de gemiddelde afwijking van de desbetreffende waarneming ten opzichte van de normwaarde. Nadeel is echter dat geen eenvoudige controlelijnen aan te geven zijn waarmee een verandering in het niveau zichtbaar gemaakt kan worden.

Bij de EMA-grafiek kan dit wel (lit. 1). Hierbij wordt de zogenaamde EMA-waarde (Exponential Moving Average) op een bepaald tijdstip  $t$  berekend volgens:

$$\text{EMA}_t = w \times m_t + (1 - w) \times \text{EMA}_{t-1}$$

waarbij  $w$  de dempingsfactor is en  $m_t$  het gemiddelde analyseresultaat van het controlemonster op tijdstip  $t$ . Startpunt op  $t=0$  is de normwaarde =  $\text{EMA}_0$ .

De EMA is een voortschrijdend gemiddelde van alle voorgaande meetpunten, waarbij hun invloed volgens een machtreeks afloopt. Ook voor de EMA-waarde wordt een alarmgrens ( $\alpha = 0.0027$ ) berekend, die afhankelijk is van de gekozen dempingsfactor:

$$\text{EMA}_0 \pm 3 \times s_m \times \sqrt{w / (2 - w)}$$

Gekozen is voor de meest gebruikelijke dempingsfactor  $w = 0.2$ , waardoor de alarmgrens voor de EMA-grafiek  $\text{EMA}_0 \pm 1 \times s_m$  wordt. Bij het berekenen van de EMA-waarde is de door Van Hemert

(lit. 2) voorgestelde uitbijertoets gehanteerd (zie bijlagen).

De controlekaart die nu geconstrueerd kan worden is op de volgende manier behulpzaam bij het bewaken van de analyses. De lijnen  $\pm 1 \times s_m$  geven de grenzen aan waarbinnen de op tijdstip  $t$  berekende  $EMA_t$ -waarde moet blijven zonder dat ingrijpen noodzakelijk is. Wanneer echter de  $EMA_t$ -waarde de  $\pm 1 \times s_m$  grens overschrijdt, is er sprake van een systematische fout en dient de oorzaak (bv. foutieve standaard, verkeerde HPLC-kolom etc.) opgespoord en geëlimineerd te worden, voordat de analyseserie herhaald wordt. Wanneer sprake is van een systematische fout zal heranalyse zelfs ad infinitum geen goede waarde van het controlemonster opleveren, zolang van tevoren deze fout niet opgespoord en geëlimineerd is.

De lijnen  $\pm 2 \times s_m$  zijn de waarschuwinglijnen voor het berekende gemiddelde  $m_t$  op tijdstip  $t$  van het controlemonster, de lijnen  $\pm 3 \times s_m$  zijn de alarmgrenzen voor  $m_t$ . Indien de alarmgrens wordt overschreden en de  $EMA_t$  blijft binnen zijn eigen grens, is er sprake van een toevallige fout en dient de analyseserie die gelijktijdig met het controlemonster geanalyseerd werd, herhaald te worden.

### 3 MATERIAAL EN METHODEN

Het monstermateriaal bestond voor alle componenten uit gehomogeniseerde volle melkpoeder. Voor de bepaling van retinol werden 30 kunststof monsterpotten afgevuld met ca 42 gram melkpoeder, elk voldoende voor analyse in viervoud volgens Intern Analysevoorschrift A-521, Voor de bepaling van  $\alpha$ -tocoferol werden eveneens 30 kunststof monsterpotten afgevuld met ca 40 gram gehomogeniseerde volle melkpoeder, elk voldoende voor analyse in drievoud volgens Intern Analysevoorschrift A-499.

Voor vitamine B<sub>1</sub> en vitamine B<sub>2</sub> tenslotte werden 30 kunststof monsterpotten afgevuld met gehomogeniseerde volle melkpoeder, elk voldoende voor analyse in viervoud volgens Intern Analysevoorschrift A-524 resp. A-525. De analyse van deze vitamines werd simultaan uitgevoerd. De monsterpotten zijn allemaal voorzien van een goedsluitende schroefdeksel.

Tot het tijdstip van de maandelijkse analyse werden alle monsterpotjes in de diepvries (-18 °C) bewaard.

Na zeven maanden (leerset) vond een eerste evaluatie plaats, waarbij o.a. gekeken werd naar de binnen-maand variatie en de tussen-maand variatie. Vervolgens werd de EMA-grafiek opgesteld en getest op zijn bruikbaarheid bij de maandelijkse analyse van het controlemonster.

### 4 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De resultaten werden verwerkt met behulp van een statistisch rekenprogramma, gebaseerd op ISO-5725 (lit. 3). Hierbij werden de herhaalbaarheidsstandaarddeviatie,  $s_0$ , en de standaarddeviatie

tussen de periodes,  $s_{\text{tijd}}$ , berekend. De standaarddeviatie van het overall gemiddelde,  $s_m$ , van het controlemonster werd vervolgens berekend als:

$$s_m = \sqrt{(s_0^2 / n + s_{\text{tijd}}^2)}, \text{ waarin } n \text{ het aantal afzonderlijke analyses per periode voorstelt.}$$

Om na te gaan of er een significant tijdseffect is werd een F-toets toegepast, berekend volgens:  $F = (n \times s_{\text{tijd}}^2 + s_0^2) / s_0^2$ , waarin  $n$  het aantal afzonderlijke analyses per periode voorstelt. De berekende  $F$  werd vervolgens vergeleken met de kritieke  $F$ , rekening houdend met het aantal bijbehorende vrijheidsgraden  $DF$ .

#### 4.1 Resultaten vitamine A

De resultaten voor de bepaling van vitamine A van de eerste zeven maanden zijn vermeld in tabel 1.

Tabel 1. De analyseresultaten van de bepaling van vitamine A in IE/100 gram van de afzonderlijke bepalingen in viervoud, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven periode in maanden en de analysedatum voor het controlemonster.

periode	analyse-datum	a	b	c	d	gem.	s
1	13-09-88	1081	1079	1116	1111	1096,7	19,47
2	11-10-88	1195	1189	1156	1185	1181,2	17,33
3	15-11-88	1017	1034	1048	1031	1032,5	12,71
4	20-12-88	1043	1019	1083	1067	1053,0	28,00
5	09-01-89	1090	1112	1155	1144	1125,2	29,75
6	13-02-89	1223	1183	1178	1132	1179,0	37,25
7	20-03-89	1016	1004	985	1034	1009,8	20,60
8	17-04-89		n=20			1025,6	23,10
$s_0$		= 24,85 IE/100 gram		DF= 21			
$s_{\text{tijd}}$		= 67,58 IE/100 gram		DF= 6			
gem.		= 1096,8 IE/100 gram					
$s_m$		= 68,69 IE/100 gram					

Uit de resultaten van periode 1 t/m 7 werd het gemiddelde,  $s_0$  en  $s_{\text{tijd}}$  berekend onder vermelding van het aantal vrijheidsgraden ( $DF$ ), zie tabel 1. Vergelijking met de F-toets van  $s_0$  en  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  geeft een zeer duidelijk significant verschil; het tijdseffect is dus duidelijk groter dan de analytische variatie. Oorzaak van deze maand tot maand variatie kan verschil in de gehalten van de afzonderlijke monsterpotjes zijn. Om dit te controleren werden op één dag (periode 8) 20 verschillende monsterpotjes in simplo geanalyseerd, zie tabel 1. Vergelijking van deze standaardafwijking  $s_{\text{hom}}$  met  $s_0$  m.b.v. de F-toets  $s_{\text{hom}}^2 / s_0^2$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $F_{19,21} = 2,16$ ) levert een  $F = 1,16$ ; dit geeft geen significante verschillen, waarmee aangetoond is dat de gebruikte monsters voldoende homogeen zijn. Hieruit volgt dat fluctuaties in het analyseniveau een belangrijke rol spelen. Een mogelijke oorzaak kan verandering in het gehalte van de stock-oplossing retinol zijn gedurende bewaring in isopropanol bij  $-18^\circ\text{C}$ .

Tabel 2. De analyseresultaten van de bepaling van vitamine A in IE/100 gram van de afzonderlijke bepalingen in viervoud, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven periode in maanden en de richtingscoëfficiënt (ijkfactor) voor het controlemonster. De resultaten zijn herberekend met de gemiddelde ijkfactor van periode 3,7,8 en 9.

periode	ijk-factor	a	b	c	d	gem.	s
1	175,6	949	947	980	976	963,0	17,42
2	171,5	1025	1020	991	1016	1013,0	15,12
3*	203,1	1033	1050	1064	1047	1048,5	12,71
4	191,1	997	974	1035	1019	1006,2	26,55
5	177,4	967	987	1024	1015	998,2	26,12
6	165,1	1009	976	972	934	972,8	30,70
7*	199,5	1014	1002	983	1032	1007,8	20,60
8*	196,2						
9*	201,1						

\* gehalte standaard spectrofotometrisch vastgesteld

$s_0$	=	22,19 IE/100 gram	DF= 21
$s_{tj}$	=	25,76 IE/100 gram	DF= 6
gem.	=	1001,4 IE/100 gram	
$s_m$	=	28,05 IE/100 gram	

Uit eerdere experimenten bleek deze stock-oplossing gedurende minimaal 3 maanden stabiel te zijn onder de bewaarcondities, vermeld in het voorschrift. Bij tussentijdse controle bleek dit voor de op dat moment in gebruik zijnde stock-oplossing niet het geval te zijn. Een verklaring hiervoor zou nog de ouderdom van de vaste stof gebruikt voor de bereiding van de stock-oplossing kunnen zijn. Dit dient nader onderzocht te worden.

Dat het gehalte achteruit loopt is ook te zien aan de berekende richtingscoëfficiënten (ijkfactor) van de ijklijn, zie tabel 2. Deze ijkfactoren zijn vergelijkbaar omdat bij de HPLC-methode gekwantificeerd werd met behulp van piekoppervlakte. In periode 3 en 7 werd het gehalte van de stock-oplossing spectrofotometrisch vastgesteld, in de andere periodes niet. Van de ijkfactoren in periode 3 en 7 en van die van de later vastgestelde ijkfactoren in de periode 8 en 9 werd een gemiddelde ijkfactor (gem. = 200,0) berekend, waarmee de analyseresultaten uit tabel 1 werden gecorrigeerd, zie tabel 2. Toepassing van de F-toets op  $s_0$  en  $s_{tj}$  t.o.v.  $s_0$  geeft nog steeds een significant verschil, ofschoon beduidend kleiner dan dat berekend uit de resultaten van tabel 1. Het tijdseffect is aanzienlijk verminderd door de correctie voor het gehalte van de stock-oplossing. Aangezien dit resultaat betrekking heeft op gecorrigeerde waarden werd nog een aantal maanden doorgegaan met de analyse, alvorens uitspraken te kunnen doen over de bruikbaarheid van dit controlemonster materiaal. Bij de vervolgsries werd uiteraard het gehalte van de stock-oplossing telkenmale spectrofotometrisch bepaald. In tabel 3 zijn de resultaten van dit vervolgonderzoek weergegeven. Vergelijking van  $s_0$ ,  $s_{tj}$  en het gemiddelde berekend uit tabel 3 met die van tabel 2 geeft slechts zeer kleine verschillen voor deze parameters. Toepassing van de correctie van de ijkfactor op de resultaten in tabel 2 is dus terecht.



Tabel 3. De analyseresultaten van de bepaling van vitamine A in IE/100 gram van de afzonderlijke bepalingen, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven periode in maanden en de analysedatum voor het controlemonster. Het gehalte van de stock-oplossing is bij elke analyseperiode spectrofotometrisch vastgesteld.

periode	analyse-datum	a	b	c	d	gem.	s
3	15-11-88	1017	1034	1048	1031	1032,5	12,72
7	20-03-89	1016	1004	985	1034	1009,8	20,60
9	08-05-89	939	962	962		954,3	13,28
10	14-06-89	999	1008	996		1001,0	6,24
11	10-07-89	998	1007	1039		1014,7	21,55
12	15-08-89	1030	974	958		987,3	37,81
$s_0$		= 20,66 IE/100 gram		DF= 14			
$s_{tijd}$		= 24,26 IE/100 gram		DF= 5			
gem.		= 1002,0 IE/100 gram					

#### 4.2 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine A

Uit de in tabel 2 (leerset) vermelde  $s_0$ ,  $s_{tjd}$  en gemiddelde waarde voor vitamine A kunnen nu de grenswaarden ( $s_m = 28,78$  IE/100 gram) en de normwaarde (1001,4 IE/100 gram) berekend worden voor de EMA-grafiek. Doordat niet voorzien was in de controle van de homogeniteit van het monstermateriaal in periode 8 konden de analyses in de vervolgseries slechts in drievoud uitgevoerd worden. Daarom is  $s_m$  uit  $s_0$  en  $s_{tjd}$  als volgt berekend:  $s_m = \sqrt{(s_0^2 / 3 + s_{tjd}^2)}$ . De berekende  $s_m$  en de grenswaarden zijn alleen maar geldig voor analyses in drievoud per meettijdstip.

De analyseresultaten van de bepaling van vitamine A van de vervolgserie (testset) zijn weergegeven in tabel 4. Uit de gemiddelde waarden van tabel 4 zijn de bijbehorende EMA-waarden berekend, zie bijlage A. De test op uitschieters is hierbij negatief. De EMA-waarden zijn samen met de gemiddelde waarden van de afzonderlijke analyses in drievoud weergegeven in de EMA-grafiek, zie bijlage B. Zowel de EMA-waarden als de gemiddelde waarden blijven binnen hun resp. grenzen. Er is echter een gering verloop zichtbaar. Berekening van de regressielijn (lineair) levert een afname van 0,052 IE/100 gram per dag met een betrouwbaarheid van 98%. Dit verklaart ook het feit dat de EMA-waarden altijd lager zijn dan de normwaarde. Wanneer er geen verloop van het gehalte van het monstermateriaal optreedt, zullen de berekende EMA-waarden zich immers rond de normwaarde bewegen, zowel positief als negatief. Bovendien wordt  $s_{tjd}$  door dit verloop beïnvloed. Na correctie van dit verloop zijn de gemiddelde waarden opnieuw uitgezet in de EMA-grafiek samen met de opnieuw berekende EMA-waarden, zie eveneens bijlagen A en B.

Het effect van deze correctie is duidelijk zichtbaar; de gemiddeldes blijven in de tweede helft van deze grafiek zelfs binnen de vooraf ingestelde  $1 \times s_m$ -waarde. Uit de resultaten van de leerset en de testset samen kunnen voor toekomstig gebruik betere schattingen berekend worden voor  $s_0$  en  $s_{tjd}$  (24,4 resp. 22,1 IE/100 gram).

Tabel 4. De afzonderlijke analyseresultaten van de bepaling van vitamine A in drievoud van de testset, het daaruit berekende gemiddelde en de standaardafwijking voor de aangegeven analyseperiode met vermelding van de analysedatum en het aantal dagen vanaf de eerste analysedatum (13-09-88).

periode	analyse-datum	aantal dagen	a	b	c	gem.	s
9	08-05-89	234	939	962	962	954,3	13,3
10	14-06-89	274	999	1008	996	1001,0	6,2
11	10-07-89	300	998	1007	1039	1014,7	21,5
12	15-08-89	336	1030	974	958	987,3	37,8
13	11-09-89	363	1015	1088	974	1025,7	57,7*
14	11-10-89	393	990	973	972	978,3	10,1
15	20-11-89	433	985	938	980	967,7	25,8
16	11-12-89	454	1003	1022	975	1000,0	23,6
17	09-01-90	483	937	950	959	948,7	11,1
18	16-02-90	521	959	970	1019	982,7	31,9
19	16-03-90	549	973	959	980	970,7	10,7
21	16-05-90	610	1012	965	971	982,7	25,6
22	18-06-90	643	999	991	987	992,3	6,1
24	27-08-90	713	960	950	942	950,7	9,0
25	14-09-90	731	981	927	988	965,3	33,4

\* Cochran straggler,  $C=0,338$  ( $n=15$ ;  $C_{5\%}=0,335$ ;  $C_{1\%}=0,407$ )  
 $s_0 = 25,7$  IE/100 gram      DF= 30  
 $s_{\text{tijd}} = 17,6$  IE/100 gram      DF= 14  
gem. = 981,6 IE/100 gram

Uit de F-toets voor  $s_0$  en  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  blijkt duidelijk dat er een tijdseffect (betrouwbaarheid >>99%) is bij de niet voor het verloop gecorrigeerde waarden.

Na correctie voor dit verloop is dit nauwelijks meer significant verschillend (betrouwbaarheid ca 98%), zie ook tabel 8. De berekende  $s_{\text{tijd}}$  voor en na correctie bedraagt 22,1 resp. 16,3 IE per 100 gram na poolen van leerset en testset. Deze afname is te verwachten omdat verloop van het gehalte van het monstermateriaal een van de factoren is die verweven zit in deze term. Het spreekt voor zich dat al deze berekeningen zijn uitgevoerd met waarnemingen uit analyseseries, waarbij spectrofotometrisch het gehalte van de stock-oplossing is vastgesteld. Gezien de geconstateerde afname van het retinolgehalte in het controlemonster was te verwachten dat  $s_{\text{tijd}}$  van de leerset kleiner zou zijn dan die van de testset, omdat de testset zich over een langere periode uitstrekt. Dit blijkt echter niet het geval, zie tabel 8. Waarschijnlijk heeft zich een leereffect voorgedaan en is in de loop van de testfase de ervaring in het laboratorium toegenomen met als gevolg een constanter analyseniveau. In de grafiek in bijlage B is dit effect te zien aan de spreiding van de gemiddelde waarden.

#### 4.3 Resultaten vitamine E

De analyseresultaten voor de bepaling van vitamine E zijn vermeld in tabel 5. Vergelijking van de berekende  $s_0$  en de  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  uit de leerset (F-toets) geeft een significant tijdseffect. Oorzaak van deze maand tot maand variatie kan verschil in de gehalten van de afzonderlijke

Tabel 5. De analyseresultaten van de bepaling van vitamine E in  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram van de afzonderlijke bepalingen in drievoud, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven periode in maanden. De analysedatum en het aantal dagen vanaf de eerste analyse (16-09-88) zijn eveneens vermeld.

periode	analyse-datum	aantal dagen	a	b	c	gem.	s
<u>leerset</u>							
1	16-09-88	0	868	857	868	864,3	6,4
2	14-10-88	28	862	865	866	864,3	2,1
3	16-11-88	61	879	888	858	875,0	15,4
4	15-12-88	90	887	903	891	893,7	8,3
5	10-01-89	116	891	899	878	889,3	10,6
6	14-02-89	151	941	910	976	942,3	33,0*
7	21-03-89	186	868	879	906	884,3	19,6
8	21-04-89	217		n=17		875,2	28,9
* Cochran straggler, $C=0,563$ ( $n=7$ ; $C_{5\%}=0,561$ ; $C_{1\%}=0,664$ ) $s_0 = 16,6 \mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram DF=14 $s_{\text{tijd}} = 24,9 \mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram DF= 6 gem. = 887,6 $\mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram $s_m = 26,7 \mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram							
<u>testset</u>							
9	12-05-89	238	875	871	888	878,0	8,9
10	16-06-89	273	852	848	886	862,0	20,9
11	11-07-89	298	912	908	882	900,7	16,3
12	16-08-89	334	859	874	865	866,0	7,6
13	13-09-89	362	861	889	866	872,0	14,9
14	10-10-89	389	903	872	982	919,0	56,7
15	20-11-89	430	904	920	897	907,0	11,8
16	12-12-89	452	810	870	906	862,0	48,5
17	08-01-90	479	868	946	869	894,3	44,8
18	16-02-90	518	849	862	834	848,3	14,0
19	12-03-90	542	854	902	844	866,7	31,0
21	16-05-90	607	872	885	898	885,0	13,0
23	02-07-90	654	888	880	879	882,3	4,9
24	27-08-90	710	939	924	908	923,7	15,5
25	17-09-90	731	850	824	883	852,3	29,6
$s_0 = 27,4 \mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram DF=30 $s_{\text{tijd}} = 17,2 \mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram DF=14 gem. = 881,3 $\mu\text{g}$ $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram							

monsterpotjes zijn. Om de homogeniteit te controleren werden op één dag (periode 8) 17 verschillende monsterpotjes in simplo onderzocht, zie tabel 5. Vergelijking van deze standaardafwijking  $s_{\text{hom}}$  met  $s_0$  met behulp van de F-toets ( $\alpha = 0,05$ ;  $F_{16,14} = 2,16$ ) levert een  $F = 3,01$ ; hiermee is aangetoond dat de gebruikte monsters onderling onvoldoende homogeen zijn.

Opvallend echter is dat  $s_0$  en dus ook de variatiecoëfficiënt binnen een dag voor de leerset, onwaarschijnlijk laag ( $VC = 1,87\%$ ) is, gezien ook de waarde ( $VC = 3,1\%$ ) uit de testset. Toetsing van de standaardafwijking van de homogeniteit  $s_{\text{hom}}$  van de gebruikte monsterpotjes met de  $s_0$  uit de testset geeft inderdaad geen significante verschillen. Het effect van deze lage  $s_0$  uit de leerset is zelfs zo groot dat vergelijking met de F-toets van de  $s_0$  en de  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  van de testset (F-toets,  $\alpha = 0,05$ ;  $F_{14,30} = 2,10$ ) slechts een net aantoonbaar tijdseffect ( $F = 2,18$ ) oplevert.

#### 4.4 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine E

Uit de in de leerset (tabel 5) vermelde  $s_0$ ,  $s_{\text{tijd}}$  en gemiddelde waarde voor vitamine E kunnen nu de grenswaarden en de normwaarde berekend worden (26,73 resp. 887,6 ug  $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram) voor de EMA-grafiek. De berekende  $s_m$  en de grenswaarden zijn alleen maar geldig voor analyses in drievoud per meettijdstip.

De gemiddelde waarden van de testset worden omgerekend tot EMA-waarden, zie bijlage C. De EMA-waarden zijn samen met de gemiddeldes bij de afzonderlijke tijdstippen uitgezet in de EMA-grafiek als functie van de tijd in dagen, gerekend vanaf de aanvang van het experiment, zie bijlage D. Zowel de EMA-waarde als de gemiddelde waarden overschrijden hun resp. grenzen niet.

Berekening van de lineaire regressielijn levert een afname van 0,0019 ug  $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram per dag, maar is zeker niet significant.

#### 4.5 Resultaten vitamine B<sub>1</sub>

De analyseresultaten voor de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> zijn vermeld in tabel 6.

Vergelijking van de berekende  $s_0$  en de  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  uit de leerset (F-toets) geeft een duidelijk significant groter tijdseffect. Oorzaak van dit effect kan een verschil zijn tussen de gebruikte monsterpotjes, bij iedere analyse wordt immers een nieuw potje geopend. Om dit te controleren werden op één dag (periode 8) 13 verschillend monsterpotjes in simplo onderzocht op het gehalte aan vitamine B<sub>1</sub>. Toepassing van de F-toets ( $\alpha=0,05$ ;  $F_{12,20}=2,28$ ) levert een  $F=2,00$ ; er zijn geen significante verschillen, de monsterpotjes zijn gelijk.

Voor dit relatief grote maand tot maand effect is nog geen verklaring voorhanden. Ook de vergelijking van  $s_0$  en  $s_{\text{tijd}}$  t.o.v.  $s_0$  van de testset geeft duidelijk aantoonbare verschillen.

#### 4.6 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine B<sub>1</sub>

Uit de in de leerset (tabel 6) vermelde  $s_0$ ,  $s_{\text{tijd}}$  en gemiddelde waarde voor vitamine B<sub>1</sub> kunnen nu de grenswaarden ( $s_m = 12,27$  ug thiaminechloride/100 gram, gem.= 233,3 ug thiaminechloride/100 gram) berekend worden voor de EMA-grafiek. De berekende  $s_m$  en de grenswaarden zijn alleen maar geldig voor analyses in viervoud per meettijdstip.

De gemiddelde waarden van de testset worden omgerekend tot EMA-waarden, zie bijlage E. Er zijn geen uitschieters. De EMA-waarden zijn samen met de gemiddeldes bij de afzonderlijke tijdstippen uitgezet in de EMA-grafiek als functie van de tijd in dagen, gerekend vanaf de aanvang van het experiment, zie bijlage F. Zowel de EMA-waarde als de gemiddelde waarde overschrijden hun resp. grenzen slechts één keer.

Tabel 6. De afzonderlijke analyseresultaten van de bepaling van vitamine B<sub>1</sub> in viervoud, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven analyseperiode, uitgedrukt in ug/100 gram. de analysedatum en het aantal dagen vanaf de eerste analysedatum (14-09-88) zijn eveneens vermeld.

periode	analyse- datum	aantal dagen	a	b	c	d	gem	s
<u>leerset</u>								
1	14-09-88	0	224	232	222	238	229,0	7,39
2	13-10-88	29	213	206	213	206	209,5	4,04
3	10-11-88	57	241	241	237	237	239,0	2,31
4	21-12-88	90	238	238	235	235	236,5	1,73
5	11-01-89	121	230	237	243	237	236,8	5,32
6	22-02-89	161	250	250	250	244	248,5	3,00
7	14-03-89	181	234	234	234		234,0	0,00
8	19-03-89	217		n=13			252,7	5,91
$s_0 = 4,18$ ug thiaminechloride/100 gram DF=20 $s_{\text{tijd}} = 12,09$ ug thiaminechloride/100 gram DF= 6 gem. = 233,3 ug thiaminechloride/100 gram $s_m = 12,27$ ug thiaminechloride/100 gram								
<u>testset</u>								
9	11-05-89	239	246	256	256	244	250,5	6,40
10	15-06-89	274	230	234	224	225	228,2	4,65
11	12-07-89	301	218	218	218	212	216,5	3,00
12	17-08-89	337	240	234	238	244	239,0	4,16
13	13-09-89	364	228	224	222	224	224,5	2,52
14	12-10-89	393	224	220	226	220	222,5	3,00
15	16-11-89	428	242	242	244	240	242,0	1,63
16	12-12-89	454	216	222	222	212	218,0	4,90
17	10-01-90	483	144	250	250	254	249,5	4,12
19	01-03-90	533	253	243	239	245	245,0	5,89
20	13-03-90	545	232	225	225	224	226,5	3,70
23	17-03-90	671	181	200	198	197	194,0	8,76
24	29-08-90	714	211	210	184	185	197,5	15,02*
26	18-10-90	764	217	239	231	239	231,5	10,38
$s_0 = 5,4$ ug thiaminechloride/100 gram DF=39 $s_{\text{tijd}} = 15,5$ ug thiaminechloride/100 gram DF=12 gem. = 229,8 ug thiaminechloride/100 gram								
* deze periode is niet meegenomen in de berekening van $s_0$ , $s_{\text{tijd}}$ en gem. vanwege Cochran outlier, $C=0,372$ ( $n=14$ ; $C_{5\%}=0,291$ ; $C_{1\%}=0,349$ ).								

Het effect op de EMA-waarde is in de grafiek duidelijk zichtbaar wanneer deze twee waarden desondanks meegenomen worden. Twee opeenvolgende "slechte" meetwaarden aan één kant van de grafiek trekken de EMA-waarde dusdanig naar het grensgebied dat ze over de grens heen gaat. De meting bij periode 26 geeft aan dat op dat moment het niveau van de analyse weer goed is. Berekening van de lineaire regressielijn geeft een afname van 0,0253 ug per dag, maar dit is zeker niet significant.

Bij periode 23 ( $t=671$  dagen) overschrijdt de gemiddelde waarde de  $3 \times s_m$ -grens, maar de berekende EMA-waarde is geen uitschieter. Dit wijst dus niet op een systematische fout. Bij de volgende serie treedt een Cochran-outlier op. Zowel periode 23 als periode 24 horen niet in de berekeningen thuis; de analyses die bij deze controlemonsters horen moeten dus herhaald worden.

4.7 Resultaten vitamine B<sub>2</sub>

De analyseresultaten voor de bepaling van vitamine B<sub>2</sub> zijn vermeld in tabel 7.

Tabel 7. De afzonderlijke analyseresultaten van de bepaling van vitamine B<sub>2</sub> in viervoud, het daaruit berekende gemiddelde en standaardafwijking voor de aangegeven analyseperiode, uitgedrukt in ug/100 gram. De analysedata en het aantal dagen vanaf de eerste analysedatum (14-09-1989) zijn eveneens vermeld.

periode	analyse-datum	aantal dagen	a	b	c	d	gem	s
<b>leerset</b>								
1	14-09-88	0	1128	1188	1230	1230	1194,0	48,2
2	13-10-88	29	1238	1238	1216	1201	1223,2	18,1
3	10-11-88	57	1422	1378	1367	1367	1383,5	26,2
4	13-12-88	90	1271	1308	1235	1213	1256,8	41,7
5	11-01-89	119	1342	1350	1365	1365	1355,5	11,4
6	22-02-89	161	1394	1408	1416	1424	1410,5	12,8
7	14-03-89	181	1270	1284	1278	1304	1284,0	14,5
8	19-04-89	217	n=15				1226,3	34,7
$s_0 = 28,2$ ug riboflavine/100 gram    DF=21 $s_{t\text{ijd}} = 82,0$ ug riboflavine/100 gram    DF= 6 gem. = 1301,1 ug riboflavine/100 gram $s_m = 83,2$ ug riboflavine/100 gram								
<b>testset</b>								
9	11-05-89	239	1298	1280	1284	1302	1291,0	10,6
10	15-06-89	274	1198	1226	1210	1232	1216,5	15,4
11	12-07-89	301	1226	1292	1208	1240	1241,5	36,1
12	17-08-89	337	1132	1150	1192	1132	1151,5	28,3
13	13-09-89	364	1232	1172	1146	1210	1190,0	38,4
14	12-10-89	393	1220	1236	1232	1246	1233,5	10,8
15	16-11-89	428	1224	1210	1230	1232	1224,0	9,9
16	12-12-89	454	1254	1245	1220	1230	1237,2	15,2
17	10-01-90	483	1290	1281	1323	1300	1298,5	18,1
19	01-03-90	533	1230	1161	1216	1244	1212,8	36,3
20	13-03-90	545	1129	1144	1201	1148	1155,5	31,4
23	17-07-90	671	1035	1009	982	1059	1021,3	33,2
24	29-08-90	714	1034	1011	1022	1057	1031,0	19,7
26	18-10-90	764	992	1049	1074	1084	1049,8	41,2
$s_0 = 27,0$ ug riboflavine/100 gram    DF=42 $s_{t\text{ijd}} = 89,5$ ug riboflavine/100 gram    DF=13 gem. = 1182,4 ug riboflavine/100 gram								

Het verschil tussen  $s_0$  en  $s_{t\text{ijd}}$  t.o.v.  $s_0$  berekend in de leerset is duidelijk significant (F-toets). Oorzaak van dit relatief grote effect kan een verschil zijn tussen de gebruikte monsterpotjes, bij iedere analyse wordt immers een nieuw potje geopend. Om dit te controleren werden op één dag (periode 8) 15 verschillende monsters in simple onderzocht op het gehalte aan vitamine B<sub>2</sub>. Vergelijking van de hieruit berekende standaardafwijking  $s_{\text{hom}}$  met de  $s_0$  met behulp van de F-toets ( $\alpha=0,05$ ,  $F_{14,21}=2,28$ ) levert een  $F=1,51$ ; er zijn geen significante verschillen.

#### 4.8 Opstellen EMA-grafiek voor vitamine B<sub>2</sub>

Uit de in de leerset (tabel 7) vermelde  $s_0$ ,  $s_{t_{ij,d}}$  en gemiddelde waarde voor vitamine B<sub>2</sub> kunnen nu de grenswaarden ( $s_m = 83,17$  ug riboflavine/100 gram, gem.= 1301,1 ug riboflavine/100 gram) berekend worden voor de EMA-grafiek. De berekende  $s_m$  en de grenswaarden zijn alleen maar geldig voor analyses in viervoud per meettijdstip.

De gemiddelde waarden van de testset worden omgerekend tot EMA-waarden, zie bijlage G. Er zijn geen uitschieters. De EMA-waarden zijn samen met de gemiddelden bij de afzonderlijke tijdstippen uitgezet in de EMA-grafiek als functie van de tijd in dagen, gerekend vanaf de aanvang van het experiment, zie bijlage H. Zowel de EMA-waarde als de gemiddelde waarden overschrijden hun resp. grenzen op het eind van de testperiode.

Berekening van de lineaire regressielijn levert een afname van 0,325 ug riboflavine/100 gram per dag, die bovendien zeer significant is (betrouwbaarheid >>99%). Na correctie van de gevonden gemiddelde waarden voor deze afname, blijven de gemiddelde waarden binnen de vooraf vastgestelde grenzen, zie bijlage H, zodat een bewaareffect als oorzaak aannemelijk is.

Uit de leerset en de testset samen kunnen voor toekomstig gebruik nieuwe waarden voor  $s_0$  en  $s_{t_{ij,d}}$  berekend worden. Het effect vóór en na correctie voor het verloop van het gehalte van het controlemonster op  $s_{t_{ij,d}}$  (102,4 resp. 70,1) zal duidelijk zijn.

In de leerset was geen indicatie voor verloop vanwege het relatief gering aantal dagen waarop de leerset gebaseerd is. Zodoende moet, achteraf gezien, de grenswaarde verlaagd worden in geval gecorrigeerd wordt voor het verloop.

## 5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Het gebruik van de EMA-grafiek geeft een snelle indruk over het niveau van de analyse op een bepaald tijdstip. Ofschoon in dit experiment slechts een enkele keer uitschieters geconstateerd zijn, geeft de EMA-grafiek duidelijk meer informatie dan een Shewart-kaart alleen. De significante afname van vitamine A en B<sub>2</sub> is snel te herkennen aan de "drift" van de EMA-grafiek.

Uit dit onderzoek is duidelijk geworden dat de aanname dat de vitamine A stock-oplossing gedurende langere tijd houdbaar is, onjuist is. Controle van de gebruikte stock-oplossing tussendoor is zeker op zijn plaats. Dit geldt waarschijnlijk ook voor andere analyses.

In tabel 8 zijn de resultaten samengevat van leerset, testset en een nieuwe (betere) schatting voor de  $s_m$ , berekend uit beide series samen. Met uitzondering van vitamine E treedt bij alle analyses een duidelijk tijdseffect op. Voor een gedeelte is dit bij vitamine A en vitamine B<sub>2</sub> te verklaren uit een significante afname van het gehalte van het controlemonster (0,052 IE/100 gram resp. 0,325 ug/100 gram per dag), bij vitamine B<sub>1</sub> is geen significante afname vastgesteld. Wanneer voor deze afname gecorrigeerd wordt, vermindert het tijdseffect maar blijft een duidelijke variatiebron, die gelijk is aan

of groter is dan het herhaalbaarheidseffect van de analyse. Deze effecten van het verloop zijn ook duidelijk zichtbaar in de verandering van de  $CV_R$ -waarden. Dit zijn de variatiecoëfficiënten onder reproduceerbaarheidscondities, gedefinieerd volgens de ISO 5725 (lit. 3). Voor vitamine A daalt  $CV_R$  van 3,3% naar 2,9%, voor vitamine B<sub>2</sub> van 8,7% naar 5,6%. Ondanks deze invloed van het niveau zijn de  $CV_R$ -waarden zeer acceptabel. Het zal duidelijk zijn dat bij eventuele acties ter verbetering van de analysemethoden de aandacht gericht moet worden op onderdelen die voornamelijk het niveau beïnvloeden, zoals gehalte van standaarden, reproduceerbaar extraheren etc.

In dit experiment werden de analyses in drie- of viervoud uitgevoerd. Bij voortzetting van het gebruik van controlemonsters is tijdswinst te behalen door over te stappen naar duplo analyses. Dit heeft in de meeste gevallen maar een geringe invloed op de waarde van  $s_m$ , zie tabel 8.

Een ander probleem is het aangetoonde verloop in het gehalte. Bij gebruik van soortgelijk monstermateriaal en identieke bewaarcondities is voor vitamine A en vitamine B<sub>2</sub> uiteraard weer verloop te verwachten, maar dit verloop kan anders zijn. Naast aanpassing van de bewaarcondities (wordt de stabiliteit beter door b.v. de monsterpotjes onder N<sub>2</sub>-gas af te vullen?) kunnen ook grenzen worden gesteld aan de duur van het gebruik van dit controlemonster.

Tabel 8. Overzicht van de criteria voor de EMA-grafiek van de leer- set, de testset en de nieuwe schatting voor het controlemonster.

	vitamine A IE/100 g	vitamine E ug/100 g	vitamine B <sub>1</sub> ug/100 g	vitamine B <sub>2</sub> ug/100 g
<b>leerset:</b>				
gemiddelde	1001,4	887,6	233,3	1301,1
$s_0$	22,19	16,6	4,18	28,2
$s_{\text{tijd}}$	25,76	24,9	12,09	82,0
$s_m$	28,78(n=3)	26,73(n=3)	12,27(n=4)	83,2(n=4)
<b>testset:</b>				
gemiddelde	981,6	881,3	229,8	1182,4
$s_0$	25,7	27,4	5,4	27,0
$s_{\text{tijd}}$	17,6	17,2	15,5	89,5
$s_m$	23,02(n=3)	23,37(n=3)	15,73(n=4)	90,5(n=4)
<b>nieuwe schatting uit leer- en testset samen</b>				
gemiddelde	987,6	883,3	231,0	1222,0
$s_0$	24,4	24,5	5,0	27,4
$s_{\text{tijd}}$	22,1	19,4	14,2	102,4
$s_m$	26,21(n=3)	24,01(n=3)	14,42(n=4)	103,3(n=4)
$s_m$ duplo	28,04	26,01	14,63	104,2
$CV_R$	3,3%	3,5%	6,5%	8,7%
<b>nieuwe schatting gecorrigeerd voor afname per dag:</b>				
afname per dag	0,052	nvt	nvt	0,325
gemiddelde	1009,3			1332,4
$s_0$	24,4			27,4
$s_{\text{tijd}}$	16,3			70,1
$s_m$	21,54(n=3)			71,4(n=4)
$s_m$ duplo	23,74			72,7
$CV_R$	2,9%			5,6%

Verkorting naar b.v. één jaar in plaats van twee jaar gebruik kan de bijdrage van het verloop aan de  $s_m$  tot een acceptabel niveau terugbrengen.



Het is duidelijk dat de gevonden resultaten steeds op hun merites moeten worden getoetst. De EMA-grafiek is daarbij een prima hulpmiddel, vooral wanneer de noodzakelijke berekeningen in een eenvoudig spread-sheet programma kunnen worden uitgevoerd.

Voor alle bepalingen zou de aanpak in de toekomst als volgt kunnen zijn. Analyseer bij aanvang van het gebruik van een nieuw controlemonster een vijftal monsters in één analyseserie in duplo. Met de resultaten hiervan kan:

- de homogeniteit van het monstermateriaal gecontroleerd worden
- de nieuwe normaarde voor het gemiddelde vastgesteld worden en
- de nieuw berekende  $s_0$  vergeleken worden met die uit het verleden. Wanneer hierbij geen onacceptabele afwijkingen optreden kunnen de in het verleden vastgestelde grenswaarden uitgezet worden in de EMA-grafiek samen met de nieuwe normwaarde. Na een groter aantal meetpunten kan de gebruikte  $s_m$ -waarde getoetst worden aan de opnieuw berekende  $s_m$ -waarde en is een verloop in het gehalte van het controlemonster misschien herkenbaar, zodat een correctie hiervoor zo snel mogelijk doorgevoerd kan worden.

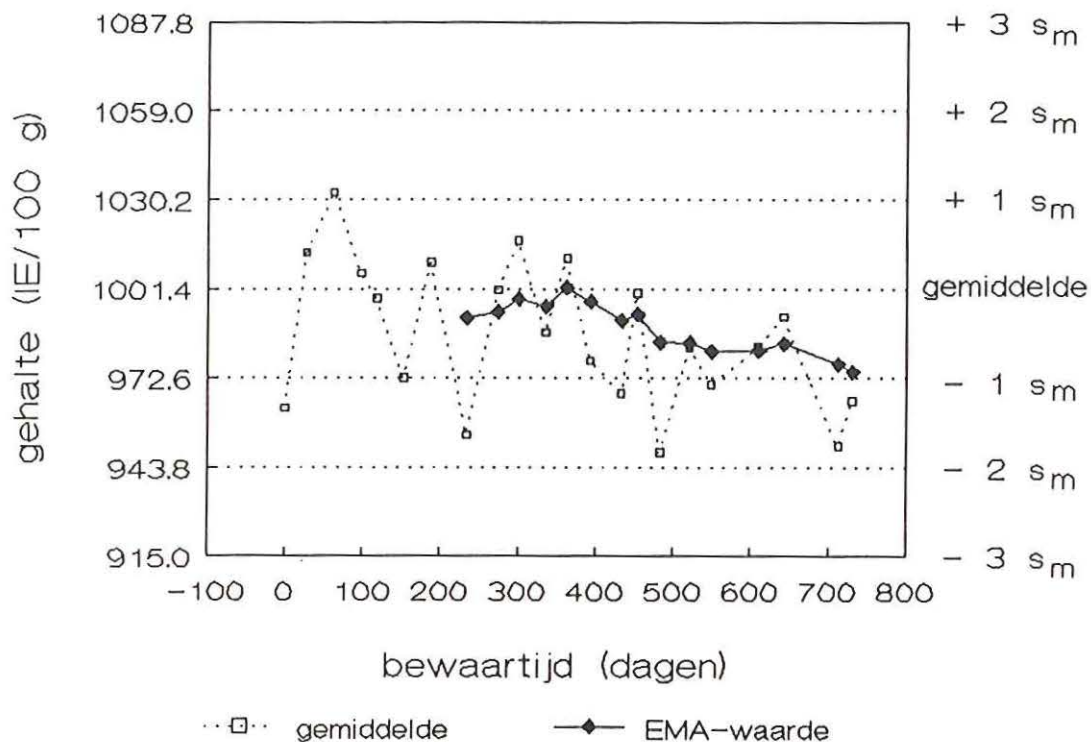
Het spreekt voor zich dat bij veranderingen cq. verbeteringen aan de analysemethode ook de  $s_m$  niet zonder meer gebruikt mag worden.

## 6 LITERATUUR

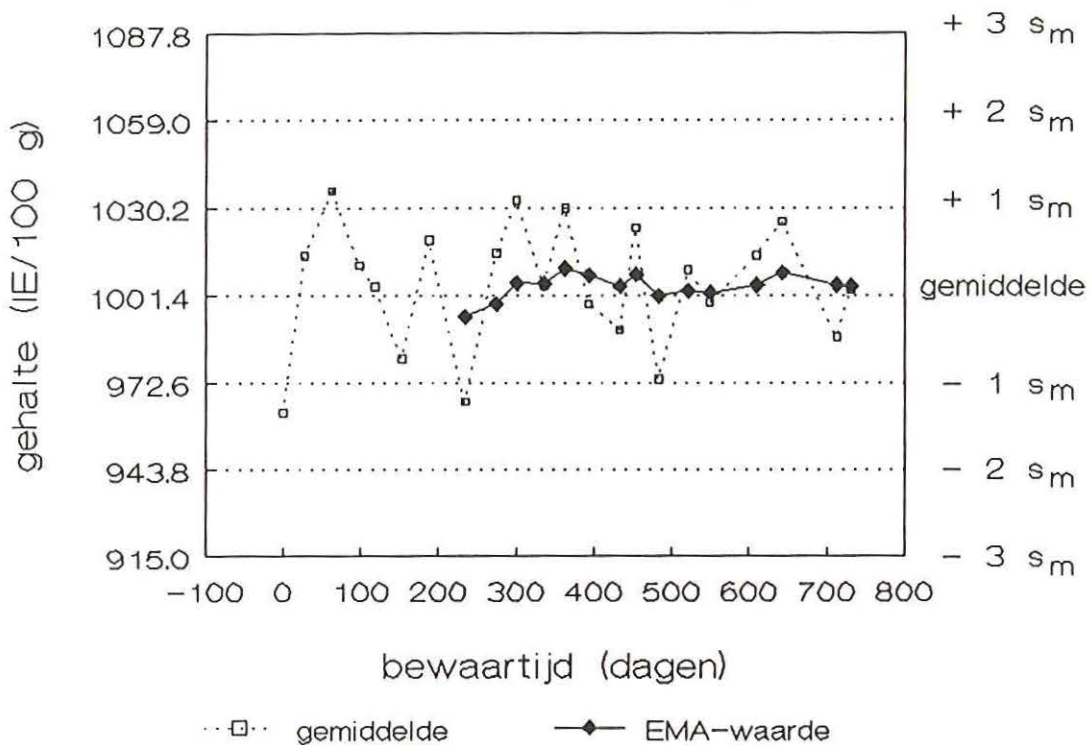
1. Van Hemert K.H.F.,  
Laboratoriumpraktijk november 1988, 561-564
2. Van Hemert K.H.F.,  
Laboratoriumpraktijk april 1989, 162-165
3. International Standard ISO 5725,  
Precision of test methods - determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests. Second edition 1986-09-15.

BIJLAGE B EMA-grafieken voor vitamine A

**VITAMINE A**



**VITAMINE A**  
NA CORRECTIE VERLOOP



BIJLAGE A EMA-tabel voor vitamine A

Data voor het opstellen van de EMA-grafiek voor de analyse in drievoud van vitamine A in het controlemonster.

periode	t	m	E	MAD	e	T	uitbijter?	EMA
<u>zonder correctie voor verloop in het gehalte</u>								
	0		1001,4	23,02				
9	1	954,3	992,0	27,8	-47,1	-2,0	nee	992,0
10	2	1001,0	993,8	24,1	+9,0	+0,3	nee	993,8
11	3	1014,7	998,0	23,4	+20,9	+0,9	nee	998,0
12	4	987,3	995,8	20,9	-10,7	-0,5	nee	995,8
13	5	1025,7	1001,8	22,7	+29,9	+1,4	nee	1001,8
14	6	978,3	997,1	22,8	-23,5	-1,0	nee	997,1
15	7	967,7	991,2	24,2	-29,4	-1,3	nee	991,2
16	8	1000,3	993,0	21,1	+9,1	+0,4	nee	993,0
17	9	948,7	984,2	25,8	-44,3	-2,1	nee	984,2
18	10	982,7	983,9	20,9	-1,5	-0,1	nee	983,9
19	11	970,7	981,3	19,4	-13,2	-0,6	nee	981,3
21	12	982,7	981,5	15,8	+1,5	+0,1	nee	981,5
22	13	992,3	983,7	14,8	+10,8	+0,7	nee	983,7
24	14	950,7	977,1	18,4	-33,0	-2,2	nee	977,1
25	15	965,3	974,7	17,1	-11,8	-0,6	nee	974,7
<u>met correctie voor verloop in het gehalte</u>								
	0		1001,4	23,02				
9	1	966,5	994,4	25,4	-34,9	-1,5	nee	994,4
10	2	1015,2	998,6	24,5	+20,8	+0,8	nee	998,6
11	3	1032,6	1005,4	26,4	+34,0	+1,4	nee	1005,4
12	4	1004,8	1005,3	21,2	-0,6	-0,0	nee	1005,3
13	5	1030,1	1010,2	21,9	+24,8	+1,2	nee	1010,2
14	6	998,7	1007,9	19,9	-11,5	-0,5	nee	1007,9
15	7	990,2	1004,4	19,4	-17,7	-0,9	nee	1004,4
16	8	1023,6	1008,2	19,4	+19,2	+1,0	nee	1008,2
17	9	973,8	1001,3	22,4	-34,4	-1,8	nee	1001,2
18	10	1009,8	1003,0	19,6	-8,5	-0,4	nee	1003,0
19	11	999,2	1002,3	16,5	-3,8	-0,2	nee	1002,3
21	12	1014,4	1004,7	15,6	+12,1	+0,7	nee	1004,7
22	13	1025,7	1008,9	16,7	+21,0	+1,3	nee	1008,9
24	14	987,8	1004,7	17,6	-21,1	-1,3	nee	1004,7
25	15	1003,3	1004,4	14,3	-1,4	-0,1	nee	1004,4

$m_t$  = gemiddelde waarde van triplo op tijdstip t

$E_t$  =  $0,2 \cdot m_t + 0,8 \cdot E_{t-1}$

$E_0$  = normwaarde = 1001,4 IE/100 gram

$e_t$  =  $m_t - E_{t-1}$

$s_m$  = 28,78 IE/100 gram

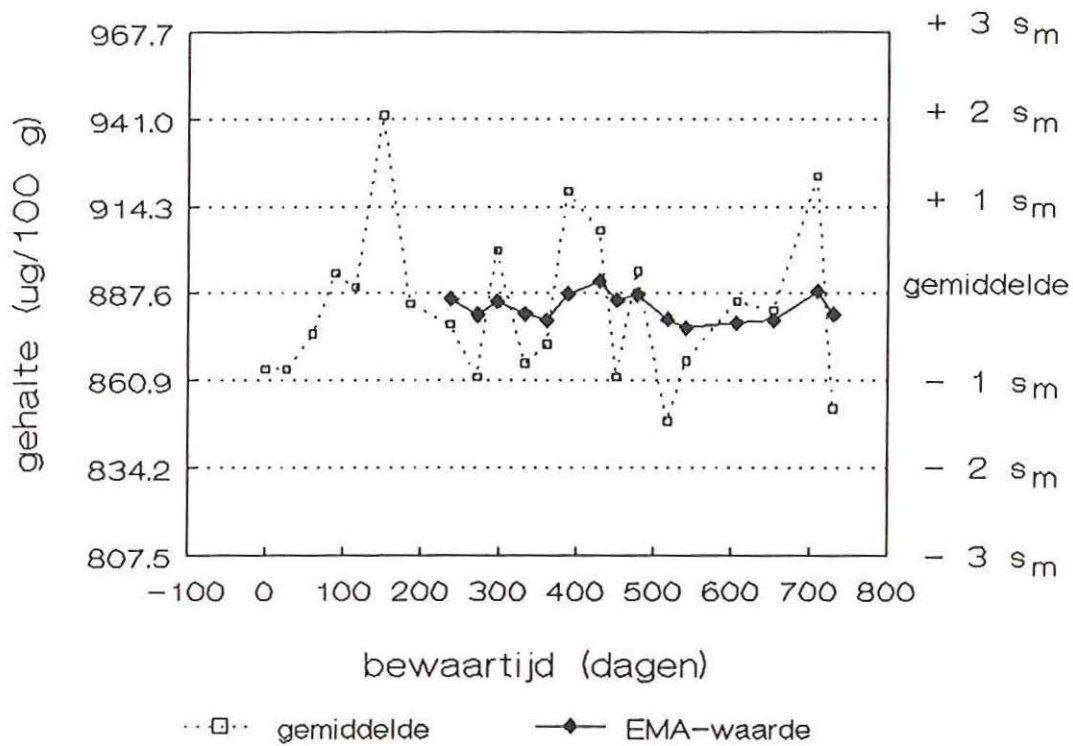
$MAD_0$  =  $0,8 \cdot s_m = 23,02$

$MAD_t$  =  $0,2 \cdot \text{abs}(e_t) + 0,8 \cdot MAD_{t-1}$

$T_t$  =  $e_t / MAD_{t-1}$ ; indien  $-4 < T_t < 4$ , dan is  $m_t$  een uitbijter

BIJLAGE D EMA-grafiek voor vitamine E

### VITAMINE E



## BIJLAGE C EMA-tabel voor vitamine E

Data voor het opstellen van de EMA-grafiek voor de analyse in drievoud van vitamine E van het controlemonster.

periode	t	m	E	MAD	e	T	uitbijter?	EMA
	0		887,6	21,36				
9	1	878,0	885,7	19,0	-9,6	-0,4	nee	885,7
10	2	862,0	880,9	20,0	-23,7	-1,2	nee	880,9
11	3	900,7	884,9	19,9	-19,8	-1,0	nee	884,9
12	4	866,0	881,1	19,7	-18,9	-0,9	nee	881,1
13	5	872,0	879,3	17,6	-9,1	-0,5	nee	879,3
14	6	919,0	887,2	22,0	+39,7	+2,3	nee	887,2
15	7	907,0	891,2	21,6	+19,8	+0,9	nee	891,2
16	8	862,0	885,3	23,1	-29,2	-1,4	nee	885,3
17	9	894,3	887,7	20,3	9,0	+0,4	nee	887,7
18	10	848,3	879,4	24,0	-38,8	-1,9	nee	879,4
19	11	866,7	876,8	21,7	-12,7	-0,5	nee	876,8
21	12	885,0	878,5	19,0	+8,2	+0,4	nee	878,5
23	13	882,3	879,2	16,0	+3,8	+0,2	nee	879,2
24	14	923,7	888,1	21,7	+44,5	+2,8	nee	888,1
25	15	852,3	881,0	24,5	-35,8	-1,7	nee	881,0

$m_t$  = gemiddelde waarde van triplo op tijdstip t

$E_t = 0,2 \cdot m_t + 0,8 \cdot E_{t-1}$

$E_0$  = normwaarde = 887,6 ug  $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram

$e_t = m_t - E_{t-1}$

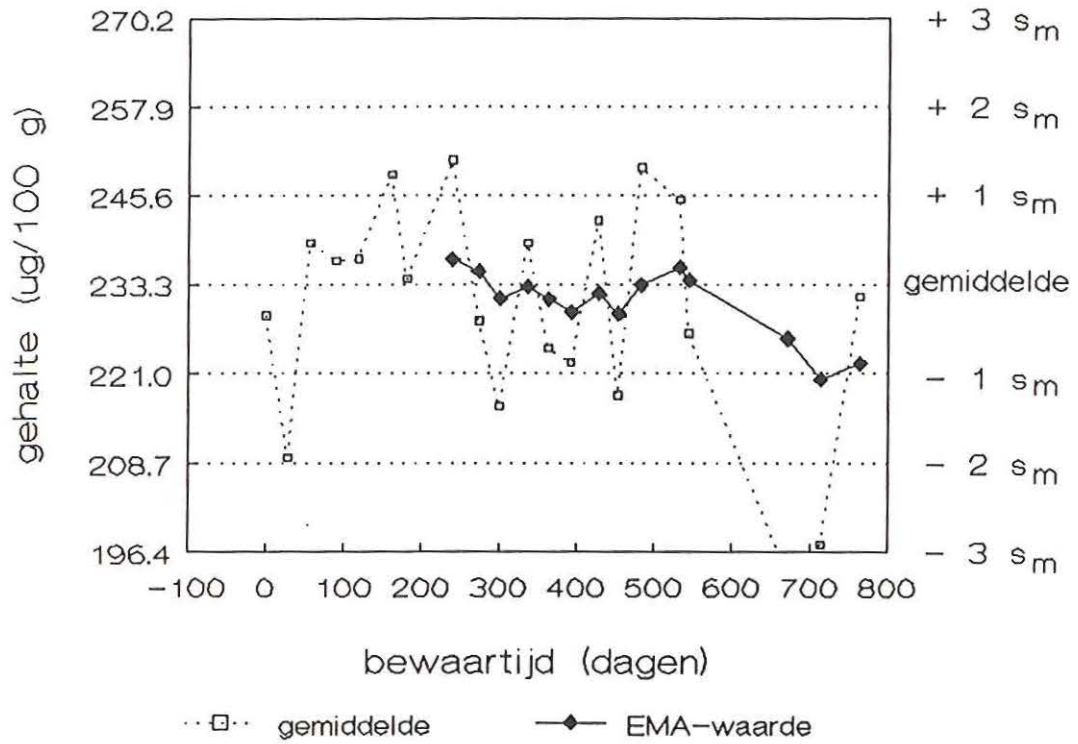
$s_m = 26,7$  ug  $\alpha$ -tocoferolacetaat/100 gram

$MAD_0 = 0,8 \cdot s_m = 21,36$

$MAD_t = 0,2 \cdot \text{abs}(e_t) + 0,8 \cdot MAD_{t-1}$

$T_t = e_t / MAD_{t-1}$ ; indien  $-4 < T_t < 4$ , dan is  $m_t$  een uitbijter

### VITAMINE B1



## BIJLAGE E EMA-tabel voor vitamine B<sub>1</sub>

Data voor het opstellen van de EMA-grafiek voor de analyse in viervoud van vitamine B<sub>1</sub> van het controlemonster.

periode	t	m	E	MAD	e	T	uitbijter?	EMA
	0		233,3	9,82				
9	1	250,5	236,7	11,3	+17,2	+1,8	nee	236,7
10	2	228,2	235,0	10,7	-8,5	-0,8	nee	235,0
11	3	216,5	231,3	12,3	-18,5	-1,7	nee	231,3
12	4	239,0	232,9	11,4	+7,7	+0,6	nee	232,9
13	5	224,5	231,2	10,8	-8,4	-0,7	nee	231,2
14	7	222,5	229,5	10,4	-8,7	-0,8	nee	229,5
15	8	242,0	232,0	10,8	+12,5	+1,2	nee	232,0
16	9	218,0	229,2	11,4	-14,0	-1,3	nee	229,2
17	10	249,5	233,2	13,2	+20,3	+1,8	nee	233,2
19	11	245,0	235,6	12,9	+11,8	+0,9	nee	235,6
20	12	226,5	233,8	12,2	-9,1	-0,7	nee	233,8
23	13	194,0	225,8	17,7	-39,8	-3,3	nee	225,8
24	14	197,5	220,2	19,8	-28,3	-1,6	nee	220,2
26	15	231,5	222,4	18,1	+11,3	+0,6	nee	222,4

$m_t$  = gemiddelde waarde van 4-voud op tijdstip t

$$E_t = 0,2 \cdot m_t + 0,8 \cdot E_{t-1}$$

$E_0$  = normwaarde = 233,3 ug thiaminechloride/100 gram

$$e_t = m_t - E_{t-1}$$

$s_m$  = 12,27 ug thiaminechloride/100 gram

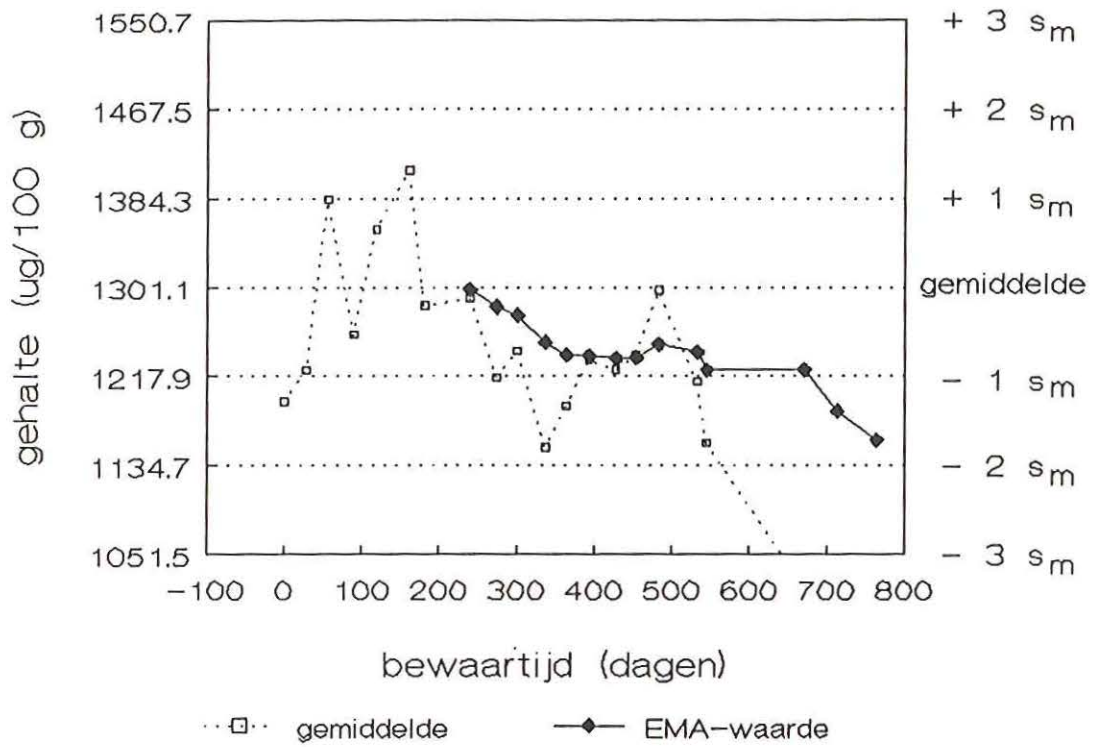
$$MAD_0 = 0,8 \cdot s_m = 9,64$$

$$MAD_t = 0,2 \cdot \text{abs}(e_t) + 0,8 \cdot MAD_{t-1}$$

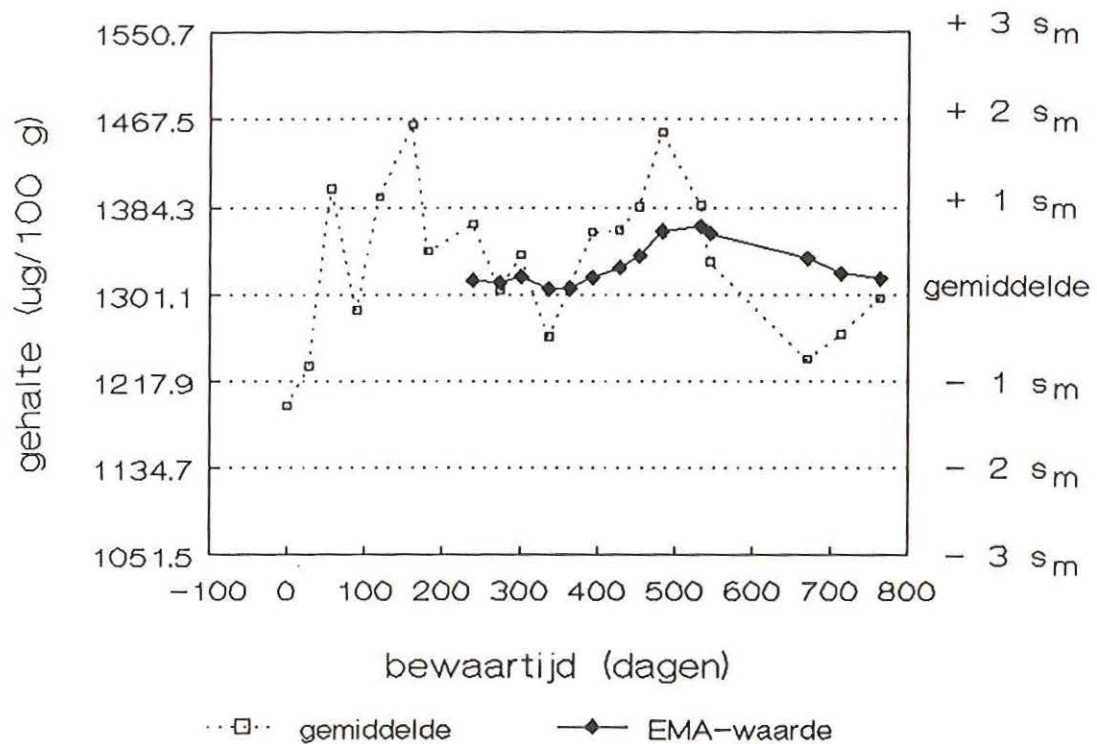
$T_t = e_t / MAD_{t-1}$ ; indien  $-4 < T_t < 4$ , dan is  $m_t$  een uitbijter

BIJLAGE H EMA-grafieken voor vitamine B<sub>2</sub>

**VITAMINE B<sub>2</sub>**



**VITAMINE B<sub>2</sub>**  
NA CORRECTIE VERLOOP





## BIJLAGE G EMA-tabel voor vitamine B<sub>2</sub>

Data voor het opstellen van de EMA-grafiek voor de analyse in viervoud van riboflavine van het controlemonster.

periode	t	m	E	MAD	e	T	uitbijter?	EMA
<u>zonder</u> correctie voor verloop van het gehalte								
	0		1301,1	66,54				
9	1	1291,0	1299,1	55,2	-10,1	-0,2	nee	1299,1
10	2	1216,5	1282,6	60,7	-82,6	-1,5	nee	1282,6
11	3	1241,5	1274,4	56,8	-41,1	-0,7	nee	1274,4
12	4	1151,5	1249,8	70,0	-122,9	-2,2	nee	1249,8
13	5	1190,0	1237,8	68,0	-59,8	-0,9	nee	1237,8
14	7	1233,5	1237,0	55,2	-4,3	-0,1	nee	1237,0
15	8	1224,0	1234,4	46,8	-13,0	-0,2	nee	1234,4
16	9	1237,2	1234,9	38,0	+2,8	+0,1	nee	1234,9
17	10	1298,5	1247,6	43,1	+63,6	+1,7	nee	1247,6
19	11	1212,8	1240,7	41,5	-34,8	-0,8	nee	1240,7
20	12	1155,5	1223,6	50,2	-85,2	-2,1	nee	1223,6
23	13	1021,3	1223,6	80,6	-202,3	-4,0	ja	1223,6
24	14	1031,0	1185,1	103,0	-192,6	-2,4	nee	1185,1
26	15	1049,8	1158,0	109,5	-135,3	-1,3	nee	1158,0
<u>met</u> correctie voor verloop van het gehalte								
	0		1301,1	66,54				
9	1	1368,7	1314,6	66,7	+67,6	+1,0	nee	1314,6
10	2	1305,5	1312,8	55,2	-9,0	-0,1	nee	1312,8
11	3	1339,3	1318,1	49,5	+26,5	+0,5	nee	1318,1
12	4	1261,0	1306,7	51,0	-57,1	-1,2	nee	1306,7
13	5	1308,3	1307,0	41,1	+1,6	+0,0	nee	1307,0
14	7	1361,2	1317,8	43,7	+54,2	+1,3	nee	1317,8
15	8	1363,1	1326,9	44,0	+45,3	+1,0	nee	1326,9
16	9	1384,8	1338,5	46,8	+57,9	+1,3	nee	1338,5
17	10	1455,5	1361,9	60,8	+117,0	+2,5	nee	1361,9
19	11	1386,0	1366,7	53,5	+24,1	+0,4	nee	1366,7
20	12	1332,6	1359,9	49,6	+34,2	-0,6	nee	1359,9
23	13	1239,3	1335,8	63,8	-120,6	-2,4	nee	1335,8
24	14	1263,1	1321,8	65,6	-72,7	-1,1	nee	1321,2
26	15	1298,1	1316,6	57,1	-23,1	-0,4	nee	1316,6

$m_t$  = gemiddelde waarde van 4-voud op tijdstip t

$$E_t = 0,2 \cdot m_t + 0,8 \cdot E_{t-1}$$

$E_0$  = normwaarde = 1301,1 ug riboflavine/100 gram

$$e_t = m_t - E_{t-1}$$

$s_m$  = 83,17 ug riboflavine/100 gram

$$MAD_0 = 0,8 \cdot s_m = 61,63$$

$$MAD_t = 0,2 \cdot \text{abs}(e_t) + 0,8 \cdot MAD_{t-1}$$

$T_t = e_t / MAD_{t-1}$ ; indien  $-4 < T_t < 4$ , dan is  $m_t$  een uitbijter