

32002R2091

L 322/11

JURNALUL OFICIAL AL COMUNITĂȚILOR EUROPENE

27.11.2002

**REGULAMENTUL (CE) NR. 2091/2002 AL COMISIEI
din 26 noiembrie 2002****de modificare a Regulamentului (CE) nr. 2870/2000 de stabilire a metodelor comunitare de referință
pentru analiza băuturilor spirtoase**

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 al Consiliului din 29 mai 1989 de stabilire a normelor generale cu privire la definirea, desemnarea și prezentarea băuturilor spirtoase ⁽¹⁾, modificat de Actul de aderare al Austriei, Finlandei și Suediei, în special articolul 4 alineatul (8),

întrucât:

- (1) Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 al Comisiei din 19 decembrie 2000 de stabilire a metodelor comunitare de referință pentru analiza băuturilor spirtoase ⁽²⁾ descrie aceste metode într-o anexă.
- (2) Patru metode de analiză pentru determinarea anetolului în băuturile spirtoase cu aromă de anason, a acidului glicirizic și a calconelor în pastis, precum și a gălbenușului de ou în lichiorul de ou și în lichiorul pe bază de ou au fost validate în conformitate cu criteriile recunoscute internațional în cadrul unui proiect de cercetare susținut de către Comisie.

(3) Aceste patru metode pot fi recunoscute ca metode comunitare de referință și trebuie adăugate la anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000.

(4) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului de aplicare pentru băuturi spirtoase,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Anexa la Regulamentul (CE) nr. 2870/2000 se modifică după cum urmează:

- (1) În sumarul anexei, termenii „(p.m.)” de la punctele V, VI, VII și IX se elimină.
- (2) Punctele V, VI, VII și IX din anexa la prezentul regulament se adaugă după capitolul III.

*Articolul 2*Prezentul regulament intră în vigoare în a șaptea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 26 noiembrie 2002.

Pentru Comisie

Franz FISCHLER

Membru al Comisiei

⁽¹⁾ JO L 160, 12.6.1989, p. 1.

⁽²⁾ JO L 333, 29.12.2000, p. 20.

ANEXĂ

V. ANETOL. DETERMINAREA TRANS-ANETOLULUI ÎN BĂUTURILE SPIRTOASE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN FAZĂ GAZOASĂ**1. Domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea trans-anetolului în băuturile spirtoase cu aromă de anason prin cromatografie capilară în fază gazoasă.

2. Referințe normative

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. Principiu

Concentrația în trans-anetol a băuturii spirtoase se determină prin cromatografie în fază gazoasă (GC). După adăugarea aceleiași cantități de etalon intern, de exemplu 4-alilanol (estragol), când estragolul nu este prezent în mod natural în eșantion, eșantionul de testare, pe de o parte, și soluția de referință conținând trans-anetol de concentrație cunoscută, pe de altă parte, ambele se diluează apoi cu ajutorul unei soluții de etanol de 45 % și se injectează direct în cromatograf. Este necesară o extracție înainte de prepararea și analiza eșantionului pentru băuturile spirtoase cu o concentrație mare în glucide.

4. Reactivi și materiale

În cursul analizei, se utilizează exclusiv reactivi de o puritate de minimum 98 % și apă din minimum clasa 3, în conformitate cu definiția standardului ISO 3696.

Substanțele de referință trebuie păstrate la rece (aproximativ 4 °C), la adăpost de lumină, în recipiente de aluminiu sau flacoane speciale din sticlă colorată (brună) pentru reactivi. Dopurile trebuie prevăzute, de preferință, cu un dispozitiv de etanșare din aluminiu. Trans-anetolul trebuie „decongelat” din starea sa cristalină înainte de utilizare, dar în nici un caz temperatura sa nu trebuie să depășească 35 °C.

4.1. Etanol de 96 % vol. (CAS 64-17-5)

4.2. 1-metoxi-4-(1-propenil) benzen; (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3. Etalon intern propus: 4-alilanol, (estragol) (CAS 140-67-0)

4.4. Etanol de 45 % vol.

Se adaugă 560 g de apă distilată la 378 g de etanol de 96 % vol.

4.5. Prepararea soluțiilor etalon

Toate soluțiile etalon trebuie păstrate la temperatura camerei (15-35 °C), la adăpost de lumină, în recipiente de aluminiu sau flacoane din sticlă colorată (brună) pentru reactivi. Dopurile trebuie prevăzute, de preferință, cu un dispozitiv de etanșare din aluminiu.

Trans-anetolul și 4-alilanolul sunt practic insolubile în apă, de aceea este necesar să fie dizolvate în puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) înainte de adăugarea etanolului de 45 % (punctul 4.4).

Soluțiile-mamă trebuie reinnoite săptămânal.

4.5.1. Soluția etalon A

Soluție-mamă de trans-anetol (concentrație: 2 g/l)

Se cântăresc 40 mg de trans-anetol (punctul 4.2) într-un balon gradat de 20 ml (sau 400 mg în 200 ml etc.). Se adaugă puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

4.5.2. Soluția etalon intern B

Soluție-mamă de etalon intern, de exemplu de estragol (concentrație: 2 g/l)

Se cântăresc 40 mg de estragol (vezi punctul 4.3) într-un balon gradat de 20 ml (sau 400 mg în 200 ml etc.). Se adaugă puțin etanol de 96 % (punctul 4.1) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

4.5.3. Soluții utilizate pentru verificarea linearității răspunsului detectorului cu ionizare în flacără

Răspunsul privind linearitatea la detectorul cu ionizare în flacără trebuie controlat în vederea analizei pentru o serie de concentrații a trans-anetolului din băuturile spirtoase de la 0 g/l până la 2,5 g/l. În timpul procedurii de analiză, eșantioanele necunoscute de băuturi spirtoase ce trebuie analizate se diluează de 10 ori (punctul 8.3). Pentru condițiile analizei descrise în prezenta metodă, soluțiile-mamă ce corespund unor concentrații de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 și 0,25 g/l de trans-anetol în eșantionul de analizat se prepară după cum urmează: se prelevează cu ajutorul pipetelor 0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 ml de soluție-mamă A (punctul 4.5.1) și se introduc prelevările în baloane gradate separate de 20 ml. În fiecare balon, se introduc cu o pipetă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. Se amestecă bine.

Se utilizează soluția martor (punctul 8.4) ca soluție de 0 g/l.

4.5.4. Soluția etalon C

Se introduc cu pipeta 2 ml de soluție etalon A (punctul 4.5.1) într-un balon gradat de 20 ml, se adaugă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

5. Aparatură și echipamente

5.1. Cromatograf în fază gazoasă, dotat cu un detector cu ionizare în flacără și cu un integrator sau orice alt sistem de colectare și de gestionare a datelor capabil să măsoare ariile sau înălțimile vârfului și echipat cu un dispozitiv automat de eșantionare sau cu aparatele necesare pentru injectarea manuală a eșantionului.

5.2. Injector divizat/nedivizat

5.3. Coloană cromatografică capilară cu următoarele caracteristici, de exemplu:

lungime: 50 m,

diametru intern: 0,32 mm,

grosimea filmului: 0,2 μm

fază staționară: FFAP – polimer poros reticulat din polietilen glicol modificat cu TPA.

5.4. Materiale de laborator de utilizare curentă: sticlărie gradată de precizie A, balanță de analiză (precizie: ± 0,1 mg).

6. Condiții de desfășurare a cromatografiei în fază gazoasă

Tipul și dimensiunile coloanei, precum și condițiile de operare ale cromatografiei în fază gazoasă trebuie să permită separarea anetolului de etalonul intern și de orice altă substanță ce ar putea interveni. Condițiile tipice de lucru pentru coloana prezentată ca exemplu la punctul 5.3 sunt următoarele:

6.1. gaz transportor: heliu analitic

6.2. debit: 2 ml/min

6.3. temperatura injectorului: 250 °C

6.4. temperatura detectorului: 250 °C

6.5. condiții de temperatură ale cuptorului: palier izoterm la 180 °C timp de 10 minute

6.6. volum de injectare: 1 μl, raport 1:40.

7. Eșantioane

Eșantioanele trebuie păstrate la temperatura camerei, ferite de lumină și de frig.

8. Mod de lucru

8.1. Căutarea prezenței eventuale a estragolului în eșantion

Pentru a se asigura că eșantionul nu conține în mod natural estragol, este necesar să se efectueze o analiză martor fără adăugarea vreunui etalon intern. Dacă eșantionul conține în mod natural estragol, atunci se alege alt etalon intern (de exemplu, mentolul).

Se introduc cu o pipetă 2 ml de eșantion într-un balon gradat de 20 ml și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.2. Prepararea eșantioanelor necunoscute

Se introduc cu o pipetă 2 ml de eșantion într-un balon gradat de 20 ml, apoi se adaugă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.3. Analiză martor

Se introduc cu o pipetă 2 ml de soluție etalon intern B (punctul 4.5.2) într-un balon gradat de 20 ml și se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Se amestecă bine.

8.4. Test de linearitate

Înainte de începerea analizei, trebuie verificată linearitatea răspunsului detectorului cu ionizare în flacără, analizând de trei ori succesiv fiecare dintre soluțiile etalon pentru controlarea linearității (punctul 4.5.3).

De la ariile sau înălțimile vârfului integratorului, pentru fiecare injectare, se reprezintă grafic concentrația în g/l a soluției-mamă corespunzătoare în funcție de raportul R.

$R = \text{aria sau înălțimea vârfului trans-anetolului} \div \text{înălțimea sau aria vârfului estragolului}$.

Se obține o reprezentare lineară.

8.5. Determinare

Se injectează soluția martor (punctul 8.3), apoi soluția etalon C (punctul 4.5.4), urmată de unul dintre etaloanele de linearitate (punctul 4.5.3) care va servi drept eșantion de control al calității (acesta se poate alege cu referire la concentrația probabilă a trans-anetolului în eșantionul necunoscut), apoi cinci eșantioane necunoscute (punctul 8.2). Pentru a asigura stabilitatea analitică, se introduce un eșantion de control al linearității (de control al calității) după fiecare serie de cinci eșantioane necunoscute.

9. Calcularea factorului de răspuns

Se măsoară ariile vârfului (utilizând un integrator sau alt sistem de colectare și de gestionare a datelor) sau înălțimile vârfului (integrare manuală) pentru trans-anetol și pentru etalonul intern.

9.1. Calcularea factorului de răspuns (RF_i)

Factorul de răspuns se calculează în următorul mod:

$$RF_i = (C_i / \text{aria sau înălțimea}_i) * (\text{aria sau înălțimea}_{is} / C_{is})$$

unde:

C_i este concentrația trans-anetolului în soluția etalon A (punctul 4.5.1)

C_{is} este concentrația etalonului intern în soluția etalon B (punctul 4.5.2)

aria_i este aria (sau înălțimea) vârfului trans-anetolului

aria_{is} este aria (sau înălțimea) vârfului etalonului intern

Factorul RF_i se calculează din cele cinci eșantioane de soluție C (punctul 4.5.4).

9.2. Analiza soluțiilor de testare a linearității răspunsului detectorului cu ionizare în flacără

Se injectează soluțiile de testare a linearității (punctul 4.5.3).

9.3. Analiza eșantionului

Se injectează soluția de eșantion necunoscut (punctul 8.2).

10. Calcularea rezultatelor

Formula pentru calcularea concentrației trans-anetolului este următoarea:

$$c_i = C_{is} * (\text{aria sau înălțimea}_i / \text{aria sau înălțimea}_{is}) * RF_i$$

unde

c_i este concentrația necunoscută a trans-anetolului

C_{is} este concentrația etalonului intern în eșantionul necunoscut (punctul 4.5.2)

$\text{aria sau înălțimea}_i$ este aria sau înălțimea vârfului trans-anetolului

$\text{aria sau înălțimea}_{is}$ este aria sau înălțimea vârfului etalonului intern

RF_i este coeficientul răspunsului (calculat conform punctului 9.1)

Concentrația trans-anetolului se exprimă în grame pe litru, cu o zecimală.

11. Asigurarea și controlul calității

Cromatogramele trebuie să prezinte o bună separare a anetolului de etalonul intern, precum și de orice alte substanțe ce ar putea interveni. Valoarea RF_i se calculează din rezultatele celor cinci injecții de soluție C (punctul 4.5.4). În cazul în care coeficientul de variație [$CV \% = (\text{decalaj standard}/\text{medie}) \cdot 100$] se încadrează în jurul valorii de 1 %, valoarea medie a factorului RF_i este acceptabilă.

Calculul anterior trebuie utilizat pentru a se calcula concentrația trans-anetolului din eșantionul ales pentru controlul calității dintre soluțiile pentru controlarea linearității (punctul 4.5.3).

Dacă rezultatele medii calculate pornind de la analiza soluției pentru controlarea linearității alese ca eșantion intern de control al calității (ICC) se încadrează în jurul valorii de 2,5 % din valoarea lor teoretică, atunci rezultatele obținute pentru eșantioanele necunoscute sunt considerate acceptabile.

12. Tratarea eșantioanelor de băuturi spirtoase cu un conținut mare de zahăr și a eșantioanelor de lichior înainte de analiza prin cromatografie în fază gazoasă

Extragerea alcoolului din băuturile spirtoase cu un conținut mare de zahăr pentru a determina concentrația în trans-anetol prin cromatografia capilară în fază gazoasă.

12.1. Principiu

Se prelevează o parte alicotă din eșantionul de lichior, la care se adaugă etalonul intern, la o concentrație similară celei a analitului (trans-anetolul) prezent în lichior. Se adaugă apoi fosfat de sodiu dodecahidrat și sulfat de amoniu anhidru. Amestecul se agită bine și se refrigerează. Se separă două faze, iar faza alcoolică superioară se recuperează. Se prelevează o parte alicotă din această fază alcoolică și se diluează cu o soluție de etanol de 45 % vol. (punctul 4.4). Trebuie menționat că în acest stadiu nu se adaugă nici un etalon intern, deoarece a fost deja adăugat. Soluția obținută se analizează prin cromatografie în fază gazoasă.

12.2. Reactivi și materiale

În cursul extracției, se utilizează exclusiv reactivi de o puritate de minimum 99 %.

12.2.1. Sulfat de amoniu anhidru (CAS 7783-20-2).**12.2.2. Fosfat de sodiu dibazic, dodecahidrat (CAS 10039-32-4).****12.3. Aparatură și echipamente**

Baloane conice, baloane de separare, frigider.

12.4. Mod de lucru**12.4.1. Căutarea estragolului în eșantion**

Pentru a se asigura că eșantionul nu conține în mod natural estragol, este necesar să se efectueze o prelevare martor (punctul 12.6.2) și să se realizeze analiza acestuia fără a se adăuga vreun etalon intern. Dacă se dovedește că eșantionul conține în mod natural estragol, este necesar să se aleagă alt etalon intern.

12.4.2. Extragerea

Se introduc cu pipeta 5 ml de etanol de 96 % vol. (punctul 4.1) într-un balon conic, apoi se adaugă succesiv 50 mg de etalon intern (punctul 4.3) și 50 ml de eșantion. Se adaugă 12 g de sulfat de amoniu anhidru (punctul 12.2.1) și 8,6 g de fosfat de sodiu dibazic, dodecahidrat (punctul 12.2.2). Se închide balonul conic.

Se agită balonul timp de cel puțin treizeci de minute. Se poate utiliza un dispozitiv de agitare mecanică, dar nu o bară magnetică pentru agitare acoperită cu teflon, deoarece teflonul absoarbe o parte din analit. Trebuie reținut că sărurile adăugate nu se vor dizolva complet.

Balonul închis se pune într-un frigider ($T < 5^\circ\text{C}$), timp de cel puțin două ore.

După aceea, ar trebui să poată fi observate două straturi distincte în fază lichidă și un reziduu solid. Stratul de alcool trebuie să fie limpede; dacă nu este așa, se pune din nou balonul în frigider până se observă o separare netă.

Când stratul de alcool este limpede, se prelevează cu grijă o parte alicotă (10 ml, de exemplu), fără a tulbura stratul apos, apoi se pune într-un flacon de sticlă brună și se închide cu grijă.

12.4.3. Prepararea extractului de eșantion ce trebuie analizat

Se așteaptă până când extractul (punctul 12.4.2) ajunge la temperatura camerei.

Se prelevează 2 ml din stratul de alcool al extractului de eșantion la temperatura camerei, se introduc cu pipeta într-un balon gradat de 20 ml, se completează la capacitate cu etanol de 45 % vol. (punctul 4.4) și se amestecă bine.

12.5. Determinare

Se urmează modul de lucru prezentat la punctul 8.5.

12.6. Calcularea rezultatelor

Pentru calcularea rezultatelor se utilizează următoarea formulă:

$$C_i = (m_{is}/V) * (area_i/area_{is}) * RF_i$$

unde:

m_{is} este masa etalonului intern (punctul 4.3) prelevat (punctul 12.4.2) (în miligrame)

V este volumul eșantionului necunoscut (50 ml)

RF_i este factorul de răspuns (punctul 9.1)

$area_i$ este aria vârfului trans-anetolului

$area_{is}$ este aria vârfului etalonului intern

Rezultatele se exprimă în grame pe litru, cu o zecimală.

12.7. Controlul și asigurarea calității

Se urmează modul de lucru prezentat la punctul 11.

13. Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare:

Tabelele de mai jos prezintă valorile anetolului.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare	1 998
Numărul de laboratoare	16
Numărul de eșantioane	10
Analit	anetol

Pastis:

Eșantioane	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	15	15	15	13	16	16
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	1	1	1	3	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	30	30	30	26	16	16
Valoare medie g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipuri de eșantioane:

A pastis, duplicate oarbe

B pastis, duplicate oarbe

C pastis, duplicate oarbe

D pastis, duplicate oarbe

E pastis, duplicate unice

F pastis, duplicate unice

Alte băuturi spirtoase cu aromă de anason:

Eșantioane	G	H	I	J
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	16	14	14	14
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	–	2	1	1
Numărul rezultatelor acceptate	32	28	28	28
Valoare medie g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipuri de eșantioane:

G ouzo, niveluri de ramificare (*)

H anason, duplicate oarbe

I lichior cu aromă de anason, duplicate

J lichior cu aromă de anason, duplicate.

VI. ACID GLICIRIZIC. DETERMINAREA ACIDULUI GLICIRIZIC PRIN CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ

1. Domeniu de aplicare

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea acidului glicirizic în băuturile spirtoase cu aromă de anason prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Regulamentul (CEE) nr. 1576/89 prevede că orice băutură spirtoasă cu aromă de anason numită „pastis” trebuie să prezinte un conținut în acid glicirizic cuprins între 0,05 g și 0,5 g per litru.

2. Referințe normative

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. Principiu

Concentrația în acid glicirizic se determină utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu detectare UV. Se filtrează o soluție etalon și eșantionul de testare și se injectează separat și direct în sistemul HPLC.

4. Reactivi și materiale

În cursul analizei, se folosesc exclusiv reactivi adaptați la cromatografia lichidă, etanol absolut și apă de clasa 3, în conformitate cu definiția din standardul ISO 3696.

- 4.1. Etanol de 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Glicirizinat de amoniu $C_{42}H_{62}O_{16}\cdot NH_3$ (Sare de acid glicirizic monoamoniacal)
(Masă molară: 839,98) (CAS 53956-04-0): puritate de minimum 90 %
(Masă molară a acidului glicirizic: 822,94)
- 4.3. Acid acetic cristalizabil, CH_3COOH , (CAS 64-19-7)
- 4.4. Metanol, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5. Etanol de 50 % vol.
Pentru 1 000 ml la 20 °C:
— etanol de 96 % vol. (punctul 4.1): 521 ml
— apă (punctul 2.0): 511 ml.
- 4.6. Prepararea soluțiilor de eluare pentru cromatografie lichidă de înaltă performanță
 - 4.6.1. Solvent de eluare A (exemplu)
80 de părți (volum) de apă (punctul 2.0)
20 de părți (volum) de acid acetic (punctul 4.3).
Se degazează solventul de eluare timp de cinci minute.
Notă: dacă apa care se utilizează nu a fost microfiltrată, se recomandă filtrarea solventului de eluare preparat cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici cu un diametru al porilor mai mic sau egal cu 0,45 μm .
 - 4.6.2. Solvent de eluare B
Metanol (punctul 4.4)
- 4.7. Prepararea soluțiilor etalon
Toate soluțiile etalon trebuie reînnoite la fiecare două luni.
 - 4.7.1. Soluția de referință C
Se cântăresc, cu o eroare de maximum 0,1 mg, 25 mg de glicirizinat de amoniu (punctul 4.2) într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se dizolvă glicirizinatul de amoniu. După dizolvare, se completează până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5).
Se filtrează cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici.
 - 4.7.2. Soluții etalon (folosite pentru a controla linearitatea răspunsului instrumentelor)
Se prepară o soluție-mamă de 1,0 g/l introducând, cu o eroare de maximum 0,1 mg, 100 mg de glicirizinat de amoniu într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă puțin etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se dizolvă glicirizinatul de amoniu. După dizolvare, se completează până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5).
Se prepară cel puțin alte patru soluții ce corespund la 0,05, 0,1, 0,25 și 0,5 g/l de glicirizinat de amoniu, prelevând cu ajutorul unei pipete respectiv 5 ml, 10 ml, 25 ml și 50 ml din soluția-mamă de 1,0 g/l în baloane gradate separate de 100 ml. Se completează apoi până la semn cu o nouă cantitate de etanol de 50 % vol. (punctul 4.5) și se amestecă bine.
Se filtrează toate soluțiile cu ajutorul unui filtru pentru solvenți organici.
5. **Aparatură și echipamente**
 - 5.1. Sistem de separare
 - 5.1.1. Cromatografie lichidă de înaltă performanță
 - 5.1.2. Sistem de pompare ce permite obținerea și menținerea unui debit constant sau programat de înaltă precizie
 - 5.1.3. Sistem de detectare prin spectrofotometrie în domeniul UV: se reglează la 254 nm
 - 5.1.4. Sistem de degazare a solvenților
 - 5.2. Integrator computerizat sau înregistrator ce funcționează în deplină compatibilitate cu restul sistemului

- 5.3. Coloană (exemplu):
 material: oțel inoxidabil sau sticlă
 diametru interior: 4-5 mm
 lungime: 100-250 mm
 fază staționară: silicagel reticulat cu grup funcțional octadecil (C18), de preferință sferic, cu o granulometrie maximă de 5 μm
- 5.4. Echipament de laborator
- 5.4.1. Balanță de analiză (precizie: 0,1 mg)
- 5.4.2. Sticlărie gradată de precizie (clasa A)
- 5.4.3. Dispozitiv de filtrare pentru volume mici pe micromembrană

6. Condiții ale cromatografiei

6.1. Caracteristicile eluării (exemplu):

- debit: 1 ml/minut;
- solvent A = 30 %;
- solvent B = 70 %.

6.2. Detectare:

- UV = 254 nm.

7. Mod de lucru

7.1. Prepararea eșantionului de băutură spirtoasă

Se filtrează, dacă este necesar, printr-un filtru pentru solvenți organici (diametrul porilor: 0,45 μm).

7.2. Determinare

După stabilizarea condițiilor cromatografice:

- se injectează 20 μl de soluție de referință C (punctul 4.7.1)
- se injectează 20 μl de soluție de eșantion
- se compară cele două cromatograme. Se identifică vârfurile acidului glicirizic după timpul lor de retenție. Se măsoară ariile (sau înălțimile) lor și se calculează concentrația în g/l, până la două zecimale, folosind următoarea ecuație:

$$c = C \times \frac{h \times P \times 823}{H \times 100 \times 840}$$

unde:

- c este concentrația în g/l a acidului glicirizic în băutura spirtoasă analizată
- C este concentrația în g/l a glicirizinatului de amoniu în soluția de referință
- h este aria (sau înălțimea) vârfului acidului glicirizic din băutura spirtoasă analizată
- H este aria (sau înălțimea) vârfului acidului glicirizic din soluția de referință
- P este puritatea glicirizinatului de amoniu utilizat ca substanță de referință (în %)
- 823 este masa molară a acidului glicirizic
- 840 este masa molară a glicirizinatului de amoniu

8. Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos prezintă valorile acidului glicirizic.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare: 1 998
 Numărul de laboratoare: 16
 Numărul de eșantioane: 5
 Analit: acid glicirizic

Eșantioane	A	B	C	D	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	13	14	15	16	16
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	3	2	1	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	26	28	30	32	32
Valoare medie g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limită de repetabilitate (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limită de reproductibilitate (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipuri de eșantioane:

- A pastis, duplicate oarbe
- B pastis, duplicate, la două niveluri de concentrare (*)
- C pastis, duplicate oarbe
- D pastis, duplicate oarbe
- E pastis, duplicate oarbe

VII. CALCONE. METODĂ DE CROMATOGRAFIE LICHIDĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ PENTRU A VERIFICA PREZENȚA CALCONELOR ÎN PASTIS

1. Domeniu de aplicare

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea prezenței calconelor în băuturile cu aromă de anason. Calconele sunt coloranți naturali din familia flavonoidelor, prezenți în lemnul dulce (*Glycyrrhiza glabra*).

Pentru ca o băutură spirtoasă cu aromă de anason să se numească „pastis”, aceasta trebuie să conțină calcone [Regulamentul (CEE) nr. 1576/89].

2. Referințe normative

ISO 3696: 1987 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare.

3. Principiu

Se prepară o soluție de extract de lemn dulce de referință. Prezența sau absența calconelor se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu detectare UV.

4. Reactivi și materiale

În cursul analizei, se folosesc doar reactivi adaptați la cromatografia lichidă de înaltă performanță. Etanolul trebuie să fie de 96 % vol. Trebuie să se folosească doar apă de clasa 3 (în conformitate cu definiția din norma ISO 3696).

- 4.1. Etanol de 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Acetonitril CH_3CN , (CAS 75-05-8)

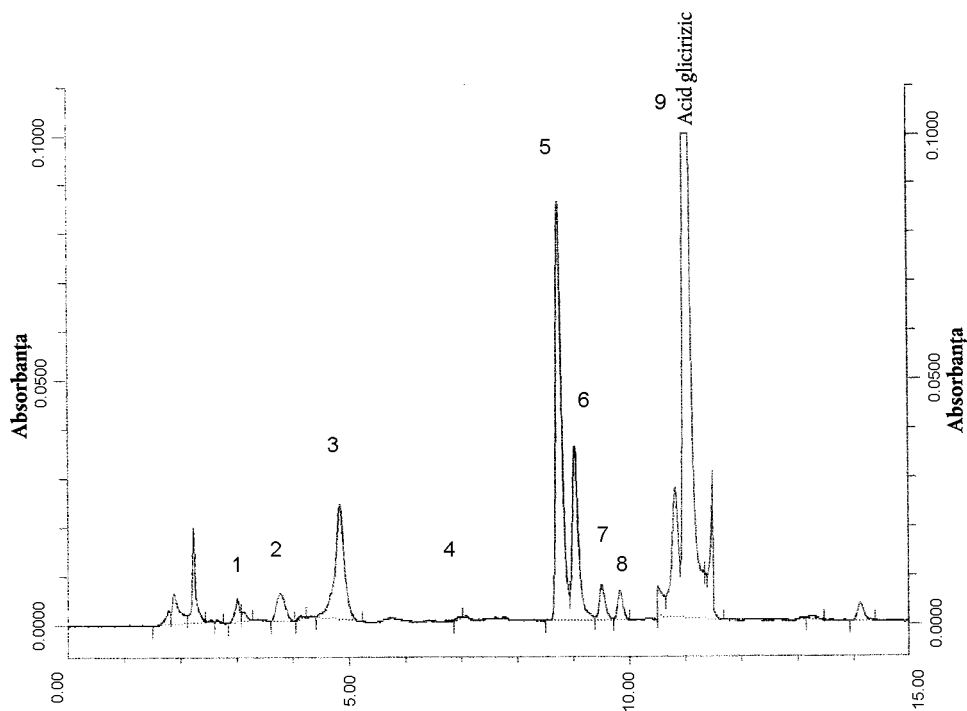
- 4.3. Substanță de referință: *Glycyrrhiza glabra* (lemn dulce)
Lemn dulce (*Glycyrrhiza glabra*) măcinat mare. Dimensiuni medii ale particulelor de tip „batonașe”: lungimea 10-15 mm, grosimea 1-3 mm.
- 4.4. Acetat de sodiu CH₃COONa, (CAS 127-09-3)
- 4.5. Acid acetic cristalizabil CH₃COOH, (CAS 64-19-7)
- 4.6. Prepararea soluțiilor
- 4.6.1. Etanol de 50 % vol.
Pentru 1 000 ml la 20 °C:
— etanol de 96 % vol. (punctul 4.1): 521 ml
— apă (punctul 2.0): 511 ml.
- 4.6.2. Solventul A: acetonitril
Acetonitril (punctul 4.2) de puritate analitică pentru HPLC.
Se degazează
- 4.6.3. Solventul B: 0,1 M dintr-o soluție tampon de acetat de sodiu cu pH de 4,66
Se cântăresc 8,203 g de acetat de sodiu (punctul 4.4), se adaugă 6,005 g de acid acetic cristalizabil (punctul 4.5) și se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 2) într-un balon gradat.
5. **Prepararea extractului de referință din *Glycyrrhiza glabra* (punctul 4.3)**
- 5.1. Se cântăresc 10 g de lemn dulce măcinat (*Glycyrrhiza glabra*) (punctul 4.3) și se pun într-un balon de distilare cu fund rotund.
— Se adaugă 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1)
— Se distilează sub reflux timp de o oră
— Se filtrează
— Se rezervă filtratul pentru o utilizare ulterioară.
- 5.2. Se recuperează extractul de lemn dulce prezent în filtru.
— Se pune într-un balon de distilare cu fund rotund
— Se adaugă 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1)
— Se fierbe sub reflux pentru o oră
— Se filtrează. Se păstrează filtratul pentru o utilizare ulterioară.
- 5.3. Extragerea de lemn dulce trebuie să se efectueze de trei ori succesiv.
- 5.4. Se combină cele trei filtrate.
- 5.5. Se evaporă faza solvent (punctul 5.4) cu ajutorul unui evaporator de tip rotativ.
- 5.6. Se recuperează extractul rezidual (punctul 5.5) cu 100 ml de etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1).
6. **Aparatură și echipamente**
- 6.1. Sistem de separare
- 6.1.1. Cromatografie lichidă de înaltă performanță
- 6.1.2. Sistem de pompare ce permite obținerea și menținerea unui debit constant sau programat la înaltă presiune
- 6.1.3. Sistem de detectare prin spectrofotometrie în domeniul UV/vizibil care se poate regla la 254 nm și 370 nm
- 6.1.4. Sistem de degazare a solvenților
- 6.1.5. Cuptor în coloană cu temperatura reglată la 40 °C ± 0,1 °C
- 6.2. Integrator computerizat sau înregistrator ce funcționează în compatibilitate cu restul sistemului de separare

- 6.3. Coloana:
material: oțel inoxidabil sau sticlă
diametru interior: 4-5 mm
fază staționară: silicașel reticulat cu grupare funcțională de tip derivat octadecil (C18), cu o granulometrie maximă de 5 μm (faza reticulată).
- 6.4. Echipament obișnuit de laborator, mai ales:
- 6.4.1. balanță de analiză (precizie: $\pm 0,1$ mg)
- 6.4.2. aparat de distilare echipat cu un condensator cu reflux ce cuprinde, de exemplu:
- un balon de 250 ml cu fund rotund cu îmbinare șlefuită standardizată
 - un condensator cu reflux de o lungime de 30 cm
 - o sursă de căldură (orice pirogenare a materiilor extractive trebuie evitată cu ajutorul unui dispozitiv corespunzător)
- 6.4.3. Aparat de evaporare de tip rotativ
- 6.4.4. Dispozitiv de filtrare (pâlnie Buchner, de exemplu)
- 6.5. Condiții ale cromatografiei (exemplu)
- 6.5.1. Caracteristici de eluare a solvenților A (punctul 4.6.2) și B (punctul 4.6.3):
- se trece de la gradientul 20/80 (v/v) la 50/50 (v/v) în 15 minute
 - se trece de la gradientul 50/50 (v/v) la 75/25 (v/v) în 5 minute
 - tărie egală la 75/25 (v/v) timp de 5 minute
 - stabilizare a coloanei între două injecții
 - tărie egală la 20/80 (v/v) timp de 5 minute.
- 6.5.2. Debit: 1 ml/minut
- 6.5.3. Reglări ale detectorului cu UV
- Detectorul trebuie reglat la 370 nm pentru a detecta prezența calconelor și apoi la 254 nm pentru a detecta acidul glicirizic.
- Notă: schimbarea lungimilor de undă (de la 370 nm la 254 nm) trebuie efectuată cu 30 de minute înainte de începerea vârfului de eluare a acidului glicirizic.
7. **Mod de lucru**
- 7.1. Prepararea eșantionului de băutură spirtoasă
Se filtrează printr-un filtru pentru solvenți organici (diametrul porilor: 0,45 μm).
- 7.2. Prepararea extractului rezidual de lemn dulce (punctul 5.6)
Înainte analizei, se procedează la o diluare de 1:10 în etanol de 50 % vol. (punctul 4.6.1).
- 7.3. Determinare
- 7.3.1. Se injectează 20 μl din extractul de lemn dulce preparat (punctul 7.2). Se efectuează analiza în condițiile cromatografice descrise anterior (punctul 6.5).
- 7.3.2. Se injectează 20 μl din eșantion (băutură spirtoasă cu aromă de anason, punctul 7.1). Se efectuează analiza în condițiile cromatografice descrise anterior (punctul 6.5).
- 7.3.3. Se compară cele două cromatograme obținute. Trebuie să existe o mare asemănare între cele două cromatograme în zona de ieșire a calconelor (în timpul detectării la 370 nm în condițiile de analiză descrise anterior). Vezi figura 1.

8. Cromatograma caracteristică pentru pastis

Figura 1

Cromatogramă obținută prin metoda descrisă anterior, indicând prezența calconelor într-un pastis. Vârful de la 1 la 8 corespund calconelor, iar vârful 9 acidului glicirizic.



9. Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)

Rezultatele testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos prezintă caracteristicile de performanță pentru identificarea prezenței sau absenței calconelor în pastis și în băuturile spirtoase cu aromă de anason.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare:	1 998
Numărul de laboratoare:	14
Numărul de eșantioane:	11
Analit:	calcone

Eșantioane	A	B	C	D	E	F
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	14	14	14	14	14	13
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	–	–	–	–	–	1 (*)
Numărul rezultatelor acceptate	28	14	14	28	28	26
Numărul rezultatelor atestând prezența calconelor	28	14	14	0	28	0
Numărul rezultatelor atestând absența calconelor	0	0	0	28	0	26
Procentul rezultatelor corecte (%)	100	100	100	100	100	100

(*) Rezultate incompatibile între cele două duplicate, datorate unei erori de eșantionare.

Eșantioane	G	H	I	J	K
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	14	14	14	14	14
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	–	–	–	–	–
Numărul rezultatelor acceptate	28	14	14	28	28
Numărul rezultatelor atestând prezența calconelor	0	0	0	0	0
Numărul rezultatelor atestând absența calconelor	28	14	14	28	28
Procentul rezultatelor corecte (%)	100	100	100	100	100

Tipuri de eșantioane:

- A pastis, duplicate oarbe
- B pastis, eșantion unic
- C pastis, eșantion unic
- D „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe
- E „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe
- F lichior cu aromă de anason (fără calcone), duplicate oarbe
- G lichior cu aromă de anason (fără calcone), duplicate oarbe
- H ouzo, (fără calcone), eșantion unic
- I ouzo, (fără calcone), eșantion unic
- J anason (fără calcone), duplicate oarbe
- K „pastis” (fără calcone), duplicate oarbe.

IX. GĂLBENUȘ DE OU. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI DE GĂLBENUȘ DE OU DIN BĂUTURILE SPIRTOASE – METODA FOTOMETRICĂ

1. Domeniu de aplicare

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea concentrației de gălbenuș de ou de la 40 la 250 g/l în lichiorul de ou și lichiorul pe bază de ou.

2. Referințe normative

ISO 3696: 1897 Apă pentru utilizare analitică de laborator – Caracteristici și metode de testare

3. Principiu

Compușii fosforoși solubili în etanol prezenți în gălbenușul de ou se extrag și se determină prin fotometrie sub formă de complex fosfo-molibdenic.

4. Reactivi

- 4.1. Apă dublu-distilată
- 4.2. Diatomit
- 4.3. Etanol de 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.4. Soluție de acetat de magneziu de 15 % (CAS 16674-78-5)
- 4.5. Acid sulfuric de 10 % (CAS 7664-93-9)

- 4.6. Acid sulfuric 1N
- 4.7. Soluție de fosfat monobazic de potasiu (CAS 778-77-0), KH_2PO_4 , de 0,16 g/l
- 4.8. Reactiv pentru determinarea fosfatului:
se dizolvă 20 g de molibdat de amoniu (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ în 400 ml de apă la 50 °C.
Se dizolvă, în alt recipient, 1 g de vanadat de amoniu (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 , în 300 ml de apă caldă, se lasă să se răcească, apoi se adaugă 140 ml de acid nitric concentrat (CAS 7697-37-2). Se combină soluțiile răcite într-un balon gradat de 1 000 ml și se completează până la gradația de 1 000 ml.

5. Aparatură și echipamente

- 5.1. Balon conic de 100 ml
- 5.2. Baie ultrasonică (sau agitator magnetic)
- 5.3. Balon conic de 100 ml
- 5.4. Baie de apă la 20 °C
- 5.5. Filtru (Whatman nr. 4 sau echivalent)
- 5.6. Creuzet de porțelan (sau de platină)
- 5.7. Baie de apă clocotită
- 5.8. Placă fierbinte
- 5.9. Cuptor închis
- 5.10. Balon gradat de 50 ml
- 5.11. Balon gradat de 20 ml
- 5.12. Spectrofotometru reglat la 420 nm
- 5.13. Cuvă de 1 cm.

6. Eșantioane

Eșantioanele se păstrează la temperatura camerei înainte de analiză.

7. Mod de lucru

- 7.1. Pregătirea eșantioanelor
- 7.1.1. Se introduc 10 g de eșantion într-un balon conic de 100 ml (punctul 5.1).
- 7.1.2. Se adaugă 70 ml de etanol treptat și în cantități mici, amestecând la fiecare adăugare. Amestecul se introduce într-o baie ultrasonică (punctul 5.2) timp de 15 minute [sau se amestecă cu ajutorul unui agitator magnetic (punctul 5.2) timp de 10 minute la temperatura camerei].
- 7.1.3. Se transferă conținutul balonului într-un balon gradat de 100 ml (punctul 5.3) și se adaugă volume de etanol de spălare (punctul 4.3). Se completează cu etanol (punctul 4.3) până la gradația de etalonare, apoi baloanele se pun într-o baie de apă la 20 °C (punctul 5.4). Se completează până la semnul de etalonare, la temperatura de 20 °C.
- 7.1.4. Se adaugă o cantitate mică de diatomit (punctul 4.2) și se filtrează (punctul 5.5), eliminând primii 20 ml.
- 7.1.5. Se transferă 25 ml de filtrat într-un creuzet de porțelan (sau de platină) (punctul 5.6). Filtratul trebuie apoi să se concentreze prin evaporare ușoară într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7), după adăugarea a 5 ml de soluție de acetat de magneziu de 15 % (punctul 4.4).
- 7.1.6. Se așează creuzetele pe o placă fierbinte (punctul 5.8) și se încălzesc până sunt aproape uscate.
- 7.1.7. Se calcinează reziduul uscat încălzindu-l până la incandescență, la 600 °C, într-un cuptor închis (punctul 5.9) până se obține o cenușă albă. Operațiunea durează cel puțin o oră și jumătate, dar se poate prelungi toată noaptea.
- 7.1.8. Se recuperează cenușa cu ajutorul a 10 ml de acid sulfuric de 10 % (punctul 4.5) și se transferă cu ajutorul spălărilor de apă distilată (punctul 4.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 5.10). Conținutul se completează cu apă distilată până la semn, la temperatura camerei. Se rezervă o parte alicotă de 5 ml din această soluție de cenușă pentru prepararea soluției de eșantion ce se utilizează pentru testarea fotometrică a fosfaților.
- 7.2. Testare fotometrică a fosfaților
- 7.2.1. Soluție comparativă
- 7.2.1.1. Se introduc 10 ml de acid sulfuric de 10 % (punctul 4.5) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 5.10) și se completează până la semn cu apă distilată (punctul 4.1).

- 7.2.1.2. Într-un balon gradat de 20 ml (punctul 5.11), se introduce o parte alicotă de 5 ml din această soluție (punctul 7.2.1.1), apoi se adaugă 1 ml de acid sulfuric de 1 N (punctul 4.6) și 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8). Se completează până la un volum de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).
- 7.2.1.3. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute.
- 7.2.1.4. Se varsă această soluție comparativă într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13).

7.2.2. Soluție de eșantion

- 7.2.2.1. Într-un balon gradat de 20 ml (punctul 5.11), se introduce o parte alicotă de 5 ml din soluția de cenușă (punctul 7.1.8), apoi se adaugă 1 ml de acid sulfuric de 1 N (punctul 4.6) și 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8). Se completează până la un volum de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).
- 7.2.2.2. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute.
- 7.2.2.3. Soluția galbenă care se formează se analizează imediat spectrofotometric (punctul 5.12) într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13) la 420 nm în raport cu soluția comparativă (punctul 7.2.1.4).

7.2.3. Curba de etalonare

- 7.2.3.1. Pentru a stabili curba de etalonare, se adaugă părți alicote de 2 ml de reactiv la fosfat (punctul 4.8) în baloane gradate de 20 ml (punctul 5.11) care conțin fiecare 1 ml de acid sulfuric 1 N (punctul 4.6) și, respectiv, 0, 2, 4, 6, 8 și 10 ml de soluție de fosfat monobazic de potasiu (punctul 4.7) și se completează până la gradația de 20 ml cu apă distilată (punctul 4.1).
- 7.2.3.2. Se închide, fără a fixa ermetic dopul, se agită și se încălzește într-o baie de apă clocotită (punctul 5.7) timp de 10 minute, apoi se lasă să se răcească într-o baie de apă (punctul 5.4) la 20 °C timp de 20 de minute și se analizează spectrofotometric la 420 nm (punctul 5.12), într-o cuvă de 1 cm (punctul 5.13), în raport cu soluția comparativă (punctul 7.2.1.4).
- 7.2.3.3. Stabilirea curbei de etalonare

Soluție de fosfat monobazic (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Exprimarea rezultatelor

Conținutul în gălbenuș de ou, exprimat în g/l, se calculează după următoarea formulă:

$$\text{g/l gălbenuș de ou} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{densitate}}{E/40}$$

unde:

110 este factorul de conversie pentru cantitatea totală de P₂O₅ în g din 100 g de gălbenuș de ou

mg P₂O₅ este valoare determinată de curba de etalonare

densitate este masa per unitate de volum (g/ml) de lichior de ou la temperatura de 20 °C

E este masa lichiorului de ou în g

40 este factorul de diluare pentru o porțiune de 5 ml de soluție de cenușă.

9. Caracteristicile de performanță ale metodei (precizia)

Rezultate statistice ale testului interlaboratoare

Tabelul de mai jos oferă valorile pentru gălbenușul de ou.

Datele menționate provin dintr-un studiu internațional privind performanțele metodei, realizat conform procedurilor autorizate la nivel internațional.

Anul testului interlaboratoare:	1 998
Numărul de laboratoare:	24
Numărul de eșantioane:	5
Analit:	gălbenușul de ou

Eșantioane	A	B	C	D	E
Numărul laboratoarelor reținute după eliminarea rezultatelor excepționale	19	20	22	20	22
Numărul rezultatelor excepționale (laboratoare)	3	4	2	4	2
Numărul rezultatelor acceptate	38	40	44	40	44
Valoare medie	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Decalaj standard de repetabilitate (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Decalaj standard relativ de repetabilitate (RSD_r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limită de repetabilitate (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Decalaj standard de reproductibilitate (S_R) (%)	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Decalaj standard relativ de reproductibilitate (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limită de reproductibilitate (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipuri de eșantioane:

A Advocaat, duplicate oarbe

B Advocaat, duplicate oarbe

C Advocaat, duplicate oarbe

D Advocaat (diluat), niveluri de ramificare (*)

E Advocaat, duplicate oarbe