

32002R2091

27.11.2002

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 322/11

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 2091/2002**z 26. novembra 2002,****ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 2870/2000, ktoré stanovuje referenčné metódy spoločenstva pre analýzu liehovín**

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Rady (EHS) č. 1576/89 z 29. mája 1989, ktoré stanovuje všeobecné pravidlá na definíciu, opis a propagáciu liehovín ⁽¹⁾, zmenené a doplnené Aktom o prístupí Rakúska, Fínska a Švédska, a najmä na jeho článok 4 ods. 8,

keďže:

- (1) Nariadenie Komisie (ES) č. 2870/2000 z 19. decembra 2000, ktoré stanovuje referenčné metódy Komisie pre analýzu liehovín ⁽²⁾, opisuje tieto metódy v prílohe.
- (2) Štyri metódy analýzy pre stanovenie trans-anetolu v liehovinách s anízovou príchuťou, glycyrizínovej kyseliny a chalkónov v pastise a vaječného žltku vo vaječnom likéri a v likéri s vajítkom, ktoré boli validované podľa medzinárodne uznávaných postupov ako súčasť výskumného projektu podporeného Komisiou.
- (3) Tieto štyri metódy môžu byť uznávané ako referenčné metódy spoločenstva a musia byť doplnené do prílohy k nariadeniu (ES) č. 2870/2000.

- (4) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výboru pre uplatňovanie ustanovení o liehovinách,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Príloha k nariadeniu (ES) č. 2870/2000 sa týmto mení a dopĺňa takto:

1. V súhrne prílohy sa v bodoch V, VI, VII a IX vypúšťa výraz „(p.m.)“.
2. Kapitoly V, VI, VII a IX v prílohe k tomuto nariadeniu sa pridávajú po kapitole III.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť siedmy deň po zverejnení v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev.

Toto nariadenie je záväzné vo svojej celistvosti a je priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 26. novembra 2002

Za Komisiu

Franz FISCHLER

člen Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 160, 12.6.1989, s. 1.⁽²⁾ Ú. v. ES L 333, 29.12.2000, s. 20.

PRÍLOHA

V. ANETOL. STANOVENIE TRANS-ANETOLU V LIEHOVINÁCH PLYNOVOU CHROMATOGRAFIU

1. **Pôsobnosť**

Táto metóda je vhodná pre stanovenie trans-anetolu v liehovinách s príchutou anízu s použitím kapilárnej plynovej chromatografie.

2. **Odkazy na normy**

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. **Princíp**

Koncentrácia trans-anetolu v liehu sa určuje plynovou chromatografiou (PC). Do skúšobnej vzorky a do referenčného roztoku trans-anetolu známej koncentrácie sa pridá rovnaké množstvo vnútorného štandardu, t. j. 4-alylanizolu (estragolu), ak nie je prirodzene prítomný vo vzorke, ktoré sa potom zriedia so 45 % roztokom etanolu a vstrekujú priamo do systému PC. Pre likéry, ktoré obsahujú veľké množstvo cukru, je pred prípravou vzorky a analýzou potrebná extrakcia.

4. **Činidlá a materiály**

Počas analýzy používame len činidlá s čistotou minimálne 98 %. Mala by sa použiť voda s minimálnou triedou 3, tak ako ju definuje ISO 3696.

Referenčné chemikálie by sa mali skladovať v chlade (pri 4 °C), chrániť pred svetlom, v hliníkových zásobníkoch alebo vo farebných (tmavých) sklenených reagenčných fľašiach. Zátky by mali byť vybavené tesnením, najvýhodnejšie hliníkovým. Pred použitím bude treba previesť trans-anetol z jeho kryštalického stavu do stavu „kvapalného“, v takom prípade teplota nesmie nikdy prekročiť 35 °C.

4.1. 96 % obj. etanol (CAS 64-17-5)

4.2. 1-metoxi-4-(1-propenyl) benzén, (trans-anetol) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-alylanizol, (estragol) (CAS 140-67-0), navrhovaný vnútorný štandard (IS)

4.4. Etanol 45 % obj.

Pridajte 560 g destilovanej vody do 378 g etanolu 96 % obj.

4.5. Príprava roztokov štandardu

Všetky roztoky štandardu treba skladovať pri teplote miestnosti (15 až 35 °C) chránené pred svetlom, v hliníkových zásobníkoch alebo vo farebných (tmavých) sklenených reagenčných fľašiach. Zátky by mali byť vybavené prednostne hliníkovým tesnením.

Trans-anetol a 4-alylanizol sú prakticky nerozpustné vo vode a preto ich treba pred pridaním 45 % etanolu (4.1.) rozpustiť v troške 96 % etanolu (4.4.).

Zásobné roztoky sa musia čerstvo pripraviť každý týždeň.

4.5.1. Roztok štandardu A

Roztok štandardu trans-anetolu (koncentrácia: 2 g/l)

Odvážte 40 mg trans-anetolu (4.2.) v 20 ml odmernej banke (alebo 400 mg v 200 ml atď.). Pridajte trošku 96 % obj. etanolu (4.1.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

4.5.2. Roztok vnútorného štandardu B

Zásobný roztok vnútorného štandardu, t. j. estragolu (koncentrácia: 2 g/l)

Odvážte 40 mg estragolu (4.3.) v 20 ml odmernej banke (alebo 400 mg v 200 ml atď.). Pridajte trošku 96 % obj. etanolu (4.1.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

4.5.3. Roztoky, ktoré sa používajú na kontrolu linearity odozvy plamenného ionizačného detektoru (PID)

Linearita odozvy PID pre analýzu sa musí skontrolovať berúc do úvahy rozsah koncentrácií trans-anetolu v liehovinách od 0 g/l až do 2,5 g/l. V procese analýzy neznáme vzorky liehovín, ktoré sa majú analyzovať, sa zriedujú 10 násobne (8.3.). Pre podmienky analýzy opísanej v tejto metóde sa pripraví zásobné roztoky zodpovedajúce koncentráciám 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 a 0,25 g/l trans-anetolu vo vzorke, ktorá sa má analyzovať, takto: vezmite 0,5, 1,5, 2 a 2,5 ml zásobného roztoku A (4.5.1) a pipetujte do oddelených 20 ml odmerných baniek; pipetujte do každej banky 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

Ako slepé vzorky (8.4) sa použijú roztoky s 0 g/l.

4.5.4. Roztok štandardu C

Vezmite 2 ml roztoku štandardu A (4.5.1.) a pipetujte do 20 ml odmernej banky, potom pridajte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

5. Prístroj a zariadenie

5.1. Kapilárny plynový chromatograf vybavený plamenným ionizačným detektorom (PID) a integrátorom alebo iným zariadením na spracovanie údajov pre meranie výšky píku alebo plochy a s automatickým alebo manuálnym dávkovačom.

5.2. Injektor split/splitless

5.3. Kapilárna kolóna, napríklad:

Dĺžka: 50 m

Vnútorný priemer: 0,32 mm

Hrúbka filmu: 0,2 μ m

Stacionárna fáza: FFAP – modifikovaný TPA polyetylén glykol sieťový, porézny polymér.

5.4. Bežné laboratórne zariadenie: A stupeň kvality odmerných sklenených nádob, analytické váhy (presnosť \pm 0,1 mg).

6. Chromatografické podmienky

Typ kolóny a rozmery a podmienky chromatografie by mali byť také, aby anetol a vnútorný štandard boli oddelené jeden od druhého a bez akýchkoľvek rušiacich látok. Typické podmienky pre kolónu sú uvedené ako príklad v 5.3.:

6.1. Nosný plyn: analytické hélium

6.2. Prietok: 2 ml/min

6.3. Teplota injektora: 250 °C

6.4. Teplota detektora: 250 °C

6.5. Teplotné podmienky pece: izotermický režim, 180 °C, čas chodu 10 minút

6.6. Vstrekaný objem: 1 μ l, split 1:40

7. Vzorky

Vzorky by sa mali skladovať pri teplote miestnosti, chránené pred svetlom a chladom.

8. Postup

8.1. Kontrola vzorky na estragol

Aby sme zabezpečili, že vo vzorke nie je prítomný žiadny estragol, musí sa vykonať analýza slepej vzorky bez prídania vnútorného štandardu. Ak je estragol prirodzene prítomný, potom sa musí vybrať iný vnútorný štandard (napríklad mentol).

Pipetujte 2 ml vzorky do 20 ml odmernej banky a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

8.2. Príprava neznámych vzoriek

Pipetujte 2 ml vzorky do 20 ml odmernej banky, potom pridajte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

- 8.3. Slepý pokus
Pipetujte 2 ml roztoku vnútorného štandardu B (4.5.2.) do 20 ml odmernej banky a doplňte po značku 45 % obj. etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.
- 8.4. Skúška linearity
Pred začatím analýzy by sa mala skontrolovať linearita odozvy PID postupne analýzou v trikrát opakovaných nástrekoch každého z roztokov štandardu linearity (4.5.3.).
Z plôch píkovo alebo z výšok píkovo integrátora pre každý nástrek zostrojíte graf koncentrácií ich materských roztokov (g/l) voči pomeru R.
R = výška píku alebo plocha trans-anetolu delená výškou píku alebo plochou estragolu.
Graf by mal byť lineárny.
- 8.5. Stanovenie
Vstreknite roztok slepej vzorky (8.3.), po ktorom nasleduje roztok štandardu C (4.5.4.), po ktorom nasleduje jeden z roztokov štandardu pre určenie linearity (4.5.3.), ktorý sa použije ako kontrolná vzorka kvality (táto sa môže vybrať ako referenčná k predpokladanej koncentrácii trans-anetolu v neznámej vzorke), po ktorej nasleduje päť neznámych vzoriek (8.2.); nastreknite štandard pre kontrolu linearity (kontrola kvality) po každých piatich neznámych vzorkách, aby ste zabezpečili analytickú stabilitu.
9. **Výpočet faktoru odozvy**
Zmerajte buď plochy píkovo (použitím integrátora alebo inej data stanice) alebo výšky píkovo (ručná integrácia) pre píky trans-anetolu a vnútorného štandardu.
- 9.1. Výpočet faktoru odozvy (RF_i)
Faktor odozvy sa vypočíta takto:
$$RF_i = (C_i / \text{plocha alebo výška}_i) \cdot (\text{plocha alebo výška}_{is} / C_{is})$$
kde:
C_i koncentrácia trans-anetolu v roztoku štandardu A (4.5.1),
C_{is} koncentrácia vnútorného štandardu v roztoku štandardu B (4.5.2),
plocha_i je plocha píku (alebo výška píku) trans-anetolu,
plocha_{is} je plocha píku (alebo výška píku) vnútorného štandardu,
RF_i sa vypočíta z piatich vzoriek roztoku C (4.5.4.)
- 9.2. Analýza linearity odozvy analyzovaných roztokov
Vstreknite roztoky (4.5.3.) pre skúšku linearity odozvy.
- 9.3. Analýza vzorky
Vstreknite neznámy roztok vzorky (8.2.).
10. **Výpočet výsledkov**
Vzorec pre výpočet koncentrácie trans-anetolu je nasledujúci:
$$c_i = C_{is} \cdot (\text{plocha alebo výška}_i / \text{plocha alebo výška}_{is}) \cdot RF_i$$
kde:
c_i je neznáma koncentrácia trans-anetolu,
C_{is} je koncentrácia vnútorného štandardu v neznámej vzorke (4.5.2)
plocha alebo výška_i je plocha píku alebo výška píku trans-anetolu,
plocha alebo výška_{is} je plocha píku alebo výška píku vnútorného štandardu
RF_i je koeficient odozvy (vypočítaný ako 9.1.).
Koncentrácia trans-anetolu je vyjadrená v g/l na jedno desatinné miesto.

11. Zabezpečovanie a kontrola kvality

Chromatogramy musia byť také, aby anetol a vnútorný štandard boli oddelené jeden od druhého a od akýchkoľvek rušiacich látok. Hodnota R_F sa vypočíta z výsledkov pre päť nástrekov roztoku C (4.5.4.). Ak koeficient variácie ($CV \% = (\text{štandardná odchýlka} / \text{stredná}) * 100$) je v rozsahu plus alebo mínus 1 %, priemerná hodnota R_F je prijateľná.

Uvedený výpočet treba použiť na výpočet koncentrácie trans-anetolu vo vzorke vybratej pre kontrolu kvality z roztokov na kontrolu linearity (4.5.3.).

Ak stredné vypočítané výsledky z analýzy roztoku linearity vybratej pre vzorku vnútornej kontroly kvality (IQC) sú v rozsahu plus alebo mínus 2,5 % ich teoretickej hodnoty, potom výsledky pre neznáme vzorky môžu byť prijateľné.

12. Úprava vzorky liehoviny, ktorá obsahuje veľké množstvo cukru a so vzorkou likéru pred analýzou PC

Extrakcia alkoholu z liehového nápoja obsahujúceho veľké množstvo cukru tak, aby bol vhodný na stanovenie koncentrácie trans-anetolu použitím kapilárnej plynovej chromatografie.

12.1 Princíp

Odoberie sa podiel vzorky likéru a pridá sa k nej vnútorný štandard, v koncentrácii podobnej stanovovanej zložke (trans-anetol) v likéri. K tomuto sa pridá dodekahydrát hydrogenufosforečnanu disodného a bezvodý síran amónny. Výsledná zmes sa dobre zamieša a schladí, vytvoria sa dve vrstvy a horná alkoholická vrstva sa odstráni. Odoberie sa podiel tejto alkoholovej vrstvy a zriedi 45 % roztokom etanolu (4.4.) (Poznámka: v tomto stupni sa žiadny vnútorný štandard nepridáva, pretože už bol pridaný). Výsledný roztok sa analyzuje plynovou chromatografiou.

12.2 Činidlá a materiály

Počas extrakcie používajte len činidlá s čistotou viac než 99 %.

12.2.1. Síran amónny, bezvodý (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Dodekahydrát hydrogenufosforečnanu disodného (CAS 10039-32-4).

12.3 Prístroj a zariadenia

Kuželové banky, deliace banky, chladnička.

12.4 Postup

12.4.1. Kontrola vzorky na estragol

Na zabezpečenie, aby vo vzorke nebol prirodzene prítomný žiadny estragol, bolo by potrebné vykonať extrakciu slepej vzorky (12.6.2.) a analýzu urobiť bez prídania vnútorného štandardu. Ak je estragol prirodzene prítomný, potom sa musí vybrať iný vnútorný štandard.

12.4.2. Extrakcia

Pipetujte 5 ml 96 % etanolu (4.1.) do kuželovej banky, navážte do tejto banky 50 mg vnútorného štandardu (4.3.) a pridajte 50 ml vzorky. Pridajte 12 g síranu amónneho, bezvodého (12.2.1.) a 8,6 g dodekahydrátu hydrogenufosforečnanu disodného (12.2.2). Zazátkujte kuželovú banku.

Traste bankou aspoň 30 minút. Môžete použiť aj mechanickú trepačku, ale nie magnetickú miešaciu tyčinku pokrytú teflónom, pretože teflón by mohol absorbovať časť stanovovanej zložky. Sledujte, až kým sa pridané soli úplne nerozpustia.

Umiestnite zazátkovanú banku do chladničky ($T < 5^{\circ}\text{C}$) na minimálne dve hodiny.

Po tomto čase by sa mali vytvoriť dve rozdielne kvapalné vrstvy a pevný zvyšok. Alkoholová vrstva by mala byť číra; ak nie je, dajte banku znovu do chladničky, až kým sa nedosiahne číre oddelenie.

Keď je alkoholová vrstva číra, opatrne odoberte podiel (napr. 10 ml) bez porušenia vodnej vrstvy, dajte do vialky z tmavého skla a bezpečne uzatvorte.

12.4.3. Príprava extrahovanej vzorky, ktorá sa má analyzovať

Nechajte extrakt (12.4.2.) tak, aby dosiahol teplotu miestnosti.

Veźmite 2 ml alkoholovej vrstvy temperovanej vzorky a pipetujte do 20 ml odmernej banky, doplňte po značku 45 % etanolom (4.4.), dôkladne zamiešajte.

12.5. Stanovenie

Dodrżujte postup opísaný v 8.5.

12.6. Výpočet výsledkov

Použite nasledujúci vzorec na výpočet výsledkov:

$$C_i = (m_{is}/V) * (plocha_i/plocha_{is}) * RF_i$$

kde:

m_i je hmotnosť (v mg) odobratého (12.4.2.) vnútorného štandardu (4.3),

V je objem neznámej vzorky (50 ml),

RF_i je faktor odozvy (9.1)

$plocha_i$ je plocha píku trans-anetolu,

$plocha_{is}$ je plocha píku vnútorného štandardu.

Výsledky sú vyjadrené v g/l na jedno desatinné miesto.

12.7. Zabezpečovanie a kontrola kvality

Dodrżujte postup opísaný v 11.

13. Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúce tabuľky uvádzajú hodnoty pre anetol.

Tieto údaje boli získané z medzinárodnej štúdie vybraných metrologických parametrov metódy vykonanej medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	16
Počet vzoriek	10
Skúmaná látka	anetol

Pastis:

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchýlených výsledkov	15	15	15	13	16	16
Počet odchýlených výsledkov (laboratóriá)	1	1	1	3	–	–
Počet prijateľných výsledkov	30	30	30	26	16	16
Stredná hodnota g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	–	–
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD _r) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	–	–
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	–	–
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD _R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Typy vzoriek:

A pastis, slepé duplikáty

B pastis, slepé duplikáty

C pastis, slepé duplikáty

D pastis, slepé duplikáty

E pastis, jednotlivé duplikáty

F pastis, jednotlivé duplikáty

Ostatné liehové nápoje s príchuťou anízu:

Vzorky	G	H	I	J
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchylených výsledkov	16	14	14	14
Počet odchylených výsledkov (laboratóriá)	–	2	1	1
Počet prijateľných výsledkov	32	28	28	28
Stredná hodnota g/l	0,778 0,530*	1,742	0,351	0,599
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_i) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD _i) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD _R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Typy vzoriek:

G ouzo, delené hladiny*

H aníz slepé duplikáty

I likér s príchuťou anízu, duplikáty

J likér s príchuťou anízu, duplikáty

VI. GLYCYRIZÍNOVÁ KYSELINA. STANOVENIE GLYCYRIZÍNOVEJ KYSELINY POUŽITÍM VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRFIE

1. Rozsah

Táto metóda je vhodná na stanovenie glycyrizínovej kyseliny v liehových nápojoch s príchuťou anízu použitím vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC). Nariadenie (EHS) č. 1576/89 určuje, aby akákoľvek liehovina s príchuťou anízu, ktorá sa volá „pastis“, obsahovala glycyrizínovú kyselinu v rozmedzí 0,05 až 0,5 g/l.

2. Odkazy na normy

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. Princíp

Koncentrácia glycyrizínovej kyseliny sa určuje použitím vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC) s UV detekciou. Roztok štandardu a skúšobná vzorka sa prefiltrujú a oddelene vstrekujú do systému VUKC.

4. Činidlá a materiály

Počas analýzy používajte len činidlá s triedou čistoty pre VUKC, absolútny etanol a vodu v triede 3, ako ju definuje ISO 3696.

- 4.1. Etanol 96 % obj. (CAS 64-17-5)
 - 4.2. Glycyrizinát amónny, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (amónna soľ kyseliny glycyrizínovej)
(pomerná molekulová hmotnosť 839,98) (CAS 53956-04-0), čistota minimálne 90 %
kyselina glycyrizínová (pomerná molekulová hmotnosť 822,94)
 - 4.3. Ladová kyselina octová, CH_3COOH , (CAS 64-19-7)
 - 4.4. Metanol, CH_3OH (CAS 67-56-1).
 - 4.5. Etanol 50 % obj.
Na 1 000 ml pri 20°C je potrebné:
— 96 % obj. etanol (4.1.): 521 ml
— voda (2.0.): 511 ml.
 - 4.6. Príprava elučných roztokov pre VUKC
 - 4.6.1. Elučné rozpúšťadlo A (príklad)
80 častí (objemových) vody (2.0.)
20 častí (objemových) kyseliny octovej (4.3.).
Elučné rozpúšťadlo odplyňte päť minút.
Poznámka:
Ak použitá voda nebola mikrofiltrovaná, odporúča sa filtrovať pripravené elučné rozpúšťadlo na filtri pre organické rozpúšťadlá s veľkosťou pórov menších alebo rovných 0,45 μm .
 - 4.6.2. Elučné rozpúšťadlo B
Metanol (4.4.).
 - 4.7. Príprava roztokov štandardu
Všetky roztoky štandardu musia byť po dvoch mesiacoch čerstvo pripravené.
 - 4.7.1. Referenčný roztok C
Navážte do odmernej banky s presnosťou na 0,1 mg, 25 mg glycyrizinátu amónneho (4.2.) v 100 ml odmernej banke. Pridajte trochu 50 % obj. etanolu (4.5.) a rozpustite glycyrizinát amónny. Keď je rozpustený, doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.).
PREFILTRUJTE cez filter pre organické rozpúšťadlá.
 - 4.7.2. Roztoky štandardu používané na kontrolu linearity odozvy prístrojového vybavenia.
1,0 g/l zásobného roztoku sa pripraví navážením 100 mg glycyrizinátu amónneho s presnosťou na 0,1 mg do 100 ml odmernej banky. Pridajte trochu 50 % obj. etanolu (4.5.) a nechajte rozpustiť glycyrizinát amónny. Keď je rozpustený, doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.).
Pripravujú sa minimálne štyri ďalšie roztoky zodpovedajúce 0,05, 0,1, 0,25 a 0,5 g/l glycyrizinátu amónneho pipetovaním príslušných 5 ml, 10 ml, 25 ml a 50 ml 1,0 g/l zásobného roztoku do jednotlivých 100 ml odmerných baniek. Potom doplňte po značku s 50 % obj. etanolom (4.5.), dôkladne zamiešajte.
PREFILTRUJTE všetky roztoky cez filter pre organické rozpúšťadlá.
5. **Prístroje a zariadenie**
- 5.1. Deliaci systém
 - 5.1.1. Vysoko účinný kvapalinový chromatograf.
 - 5.1.2. Čerpací systém umožňujúci dosiahnuť a udržiavať konštantnú alebo naprogramovanú rýchlosť prietoku s veľkou presnosťou.
 - 5.1.3. UV spektrofotometrický detekčný systém: treba nastaviť na 254 nm.
 - 5.1.4. Zariadenie na odplynenie eluenta.
 - 5.2. Integrátor alebo zapisovač, ktoré sú kompatibilné so zvyškom systému.

- 5.3. Kolóna (príklad):
 Materiál: nehrdzavejúca oceľ alebo sklo
 Vnútorý priemer: 4 až 5 mm
 Dĺžka: 100 až 250 mm
 Stacionárna fáza: sieťový oxid kremičitý s (výhodnejší je sférický) oktadecyl funkčnou skupinou (C18), maximálna veľkosť častíc: 5 µm.
- 5.4. Laboratórne zariadenie
- 5.4.1. Analytické váhy s presnosťou 0,1 mg
- 5.4.2. Analytické odmerné nádoby triedy presnosti A
- 5.4.3. Mikromembránová filtračná zostava pre malé objemy

6. Chromatografické podmienky

- 6.1. Elučné charakteristiky: (príklad)
- prietoková rýchlosť: 1 ml/min,
 - rozpúšťadlo A = 30 %,
 - rozpúšťadlo B = 70 %.

- 6.2. Detekcia:
- UV = 254 nm

7. Postup

- 7.1. Príprava liehovej vzorky
 Prefiltrujte, ak treba, cez filter na organické rozpúšťadlá (priemer pórov: 0,45 µm).

7.2. Stanovenie

Len čo sú chromatografické podmienky stabilizované:

- vstreknite 20 µl referenčného roztoku C (4.7.1.),
- vstreknite 20 µl roztoku vzorky,
- porovnajte tieto dva chromatogramy. Určite píky glycyrizínovej kyseliny z ich retenčných časov. Zmerajte ich plochy (alebo výšky) a vypočítajte koncentráciu v g/l na dve desatinné čísla s použitím nasledujúcej rovnice:

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

kde:

- c je koncentrácia v g/l glycyrizínovej kyseliny v liehu, ktorý bol analyzovaný,
- C je koncentrácia v g/l glycyrizinátu amónneho v referenčnom roztoku,
- H je plocha (alebo výška) píku glycyrizínovej kyseliny liehu, ktorý analyzujeme,
- H je plocha (alebo výška) píku glycyrizínovej kyseliny referenčného roztoku,
- P je čistota referenčného glycyrizinátu amónneho (v %),
- 823 je hmota jedného mólu glycyrizínovej kyseliny,
- 840 je hmota jedného mólu glycyrizinátu amónneho.

8. Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza hodnoty pre glycyrizínovú kyselinu.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie metrologických parametrov metódy medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	16
Počet vzoriek	5
Skúmaná látka	glycyrizínová kyselina

Vzorky	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchylených výsledkov	13	14	15	16	16
Počet odchylených výsledkov (laboratóriá)	3	2	1	–	–
Počet prijatých výsledkov	26	28	30	32	32
Stredná hodnota g/l	0,046	0,092 *0,099	0,089	0,249	0,493
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_p) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD _p) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limit opakovateľnosti (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD _R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Typy vzoriek:

- A pastis, slepé duplikáty
- B pastis, delené hladiny*
- C pastis, slepé duplikáty
- D pastis, slepé duplikáty
- E pastis, jednotlivé duplikáty

VII. CHALKÓNY. VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA. METÓDA NA OVERENIE PRÍTOMNOSTI CHALKÓNOV V PASTISE

1. Rozsah

Táto metóda je vhodná na zistenie, či sú chalkóny prítomné v nápojoch s príchutou anízu, alebo nie. Chalkóny sú prírodné farbivá zo skupiny flavonoidov, ktoré sú prítomné v koreni sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*).

Liehovina s príchutou anízu, ktorá sa volá „pastis“, musí obsahovať chalkóny (nariadenie (EHS) č. 1576/89).

2. Odkazy na normy

ISO 3696: 1987, Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. Princíp

Pripraví sa referenčný roztok extraktu zo sladovky hladkoplodej. Prítomnosť alebo neprítomnosť chalkónov sa určí pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie (VUKC) s UV detekciou.

4. Činidlá a materiály

Počas analýzy používajte len činidlá s čistotou triedy pre VUKC. Etanol 96 % obj. Vodu treba použiť len triedy čistoty 3, ako ju definuje ISO 3696.

- 4.1. Etanol 96 % obj. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Acetonitril, CH₃CN (CAS 75-05-8)

- 4.3. Referenčná látka: sladovka hladkoplodá (*Glycyrrhiza glabra*), „sladké drevko“.
Hrubo zomleté korene sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*). Priemerné rozmery tyčinkovitých častí: dĺžka: 10 až 15 mm, hrúbka 1 až 3 mm.
- 4.4. Octan sodný, CH₃COONa, (CAS 127-09-3)
- 4.5. Ľadová kyselina octová, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)
- 4.6. Príprava roztokov
- 4.6.1. Etanol 50 % obj.
Na 1 000 ml pri 20 °C treba:
— Etanol 96 % obj. (4.1.): 521 ml,
— voda (2.0.): 511 ml.
- 4.6.2. Rozpúšťadlo A: acetonitril
Acetonitril (4.2.) s analytickou čistotou pre VUKC.
Odplyňte.
- 4.6.3. Rozpúšťadlo B: 0,1 M octan sodný, tlmivý roztok, pH 4,66.
Odvážte 8,203 g octanu sodného (4.4.), pridajte 6,005 g ľadovej kyseliny octovej (4.5.) a doplňte vodou (2) odmernú banku na 1 000 ml.
5. **Príprava referenčného extraktu z (*Glycyrrhiza glabra* (4.3))**
- 5.1. Odvážte 10 g zomletého koreňa sladovky hladkoplodej (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3.) a vložte do destilačnej banky s guľatým dnom:
— pridajte 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.),
— varte refluxom jednu hodinu,
— prefiltrujte,
— odložte filtrát bokom na neskoršie použitie.
- 5.2. Získanie extraktu sladovky z filtra:
— vložte ho do banky s guľatým dnom,
— pridajte 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.),
— varte refluxom jednu hodinu,
— prefiltrujte. Odložte filtrát bokom na neskoršie použitie.
- 5.3. Extrakcia koreňa sladovky sa musí vykonať trikrát po sebe.
- 5.4. Spojte tieto tri filtráty.
- 5.5. Odparte rozpúšťadlo (z 5.4.) na rotačnom odparovacom zariadení.
- 5.6. Rozpusťte zvyšok (z 5.5.) so 100 ml 50 % obj. etanolu (4.6.1.).
6. **Prístroje a zariadenie**
- 6.1. Deliaci systém.
- 6.1.1. Vysoko účinná kvapalinová chromatografia.
- 6.1.2. Čerpací systém umožňujúci dosiahnuť a udržiavať konštantnú alebo naprogramovanú rýchlosť prietoku s veľkou presnosťou.
- 6.1.3. UV/VIS spektrofotometrický detekčný systém, ktorý môže byť nastavený na 254 a 375 nm.
- 6.1.4. Zariadenie na odplyňovanie rozpúšťadla:
- 6.1.5. Kolónový termostat, ktorý sa dá nastaviť na teplotu 40 ± 0,1°C.
- 6.2. Integrátor alebo zapisovač, ktoré sú kompatibilné so zvyškom deliaceho systému.

- 6.3. Kolóna
- Materiál: nehrdzavejúca oceľ alebo sklo
- Vnútorý priemer: 4 až 5 mm
- Stacionárna fáza: sieťový oxid kremičitý s oktadecyl funkčnou skupinou (C18), veľkosť častíc: maximálne 5 µm (sieťová fáza).
- 6.4. Bežné laboratórne zariadenie zahŕňa:
- 6.4.1. analytické váhy s presnosťou $\pm 0,1$ mg;
- 6.4.2. destilačný prístroj s refluxným kondenzátorom skladajúci sa napr. z:
- 250 ml banky s guľatým dnom so štandardizovaným spojom so zábrusom,
 - 30 cm dlhého refluxného kondenzátora a
 - tepelného zdroja (treba sa vyhnúť akejkoľvek pyrogénnej reakcii v súvislosti s extrakčnou hmotou použitím príslušnej zostavy).
- 6.4.3. Zariadenie na rotačné odparovanie.
- 6.4.4. Filtračná zostava (t. j. Buchnerov lievik).
- 6.5. Chromatografické podmienky (príklad).
- 6.5.1. Elučné charakteristiky rozpúšťadiel A (4.6.2.) a B (4.6.3.):
- posun z 20/80 (v/v) na 50/50 (v/v) gradient počas 15 minút,
 - posun z 50/50 (v/v) na 75/25 (v/v) gradient počas 5 minút,
 - rovnaká elučná mohutnosť pri 75/25 (v/v) počas 5 minút,
 - stabilizácia kolóny medzi nástrekmi,
 - rovnaká elučná mohutnosť pri 20/80 (v/v) počas 5 minút.
- 6.5.2. Rýchlosť prietoku: 1 ml/min.
- 6.5.3. Nastavenia UV detektora:
- tento detektor musí byť nastavený na 370 nm, aby detekoval prítomnosť chalkónov a potom na 254 nm, aby detekoval kyselinu glycyrizínovú.

Poznámka:

zmena vlnovej dĺžky (z 370 nm na 254 nm) sa musí vykonať 30 sekúnd pred začiatkom elúcie píku kyseliny glycyrizínovej.

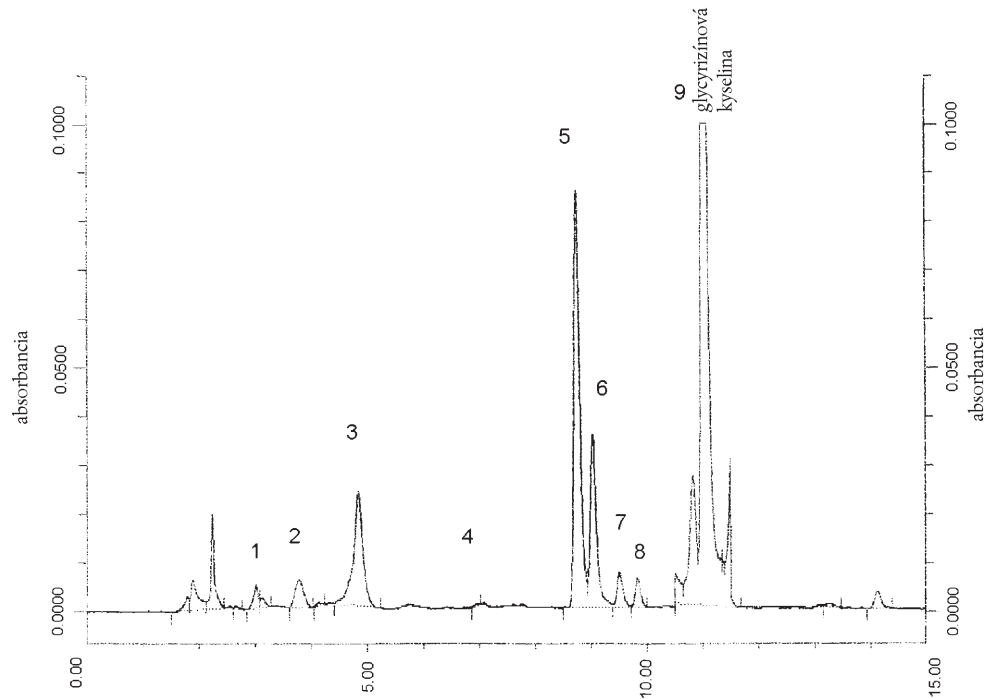
7. Postup

- 7.1. Príprava vzorky liehu
- Prefiltrujte cez filter pre organické rozpúšťadlá (priemer póru: 0,45 µm).
- 7.2. Príprava zvyškového extraktu sladovky (5.6.)
- Zriedte pred analýzou v pomere 1:10 s 50 % obj. etanolom (4.6.1.).
- 7.3. Stanovenie
- 7.3.1. Nastreknite 20 µl pripraveného extraktu sladovky (7.2.). Vykonajte analýzu za použitia chromatografických podmienok uvedených hore (6.5.).
- 7.3.2. Nastreknite 20 µl vzorky (7.1.) (anizovou príchuťou fortifikovanú vzorku liehu). Vykonajte analýzu za použitia chromatografických podmienok opísaných vyššie (6.5.).
- 7.3.3. Porovnajte tieto dva chromatogramy. Musí byť veľká podobnosť medzi nimi vo výstupnej zóne chalkónu (počas detekcie pri 370 nm pri analytických podmienkach uvedených hore) (pozri obrázok 1).

8. Charakteristický chromatogram pre pastis

Obrázok 1

Chromatogram získaný metódou uvedenou hore ukazujúci prítomnosť chalkónov v „pastise“. Píky 1 až 8 sú chalkóny a pík 9 je glycyrizínová kyselina.



9. Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)

Výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza schopnosť metódy pre uznanie prítomnosti alebo neprítomnosti chalkónov v pastise a liehovinách s príchutou anízu.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie parametrov metódy vykonanej medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky	1 998
Počet laboratórií	14
Počet vzoriek	11
Skúmaná látka	chalkóny

Vzorky	A	B	C	D	E	F
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchylených výsledkov	14	14	14	14	14	13
Počet odchylených výsledkov (laboratóriá)	–	–	–	–	–	1 (*)
Počet prijatých výsledkov	28	1	14	28	28	26
Počet výsledkov na prítomnosť chalkónov	28	14	14	0	28	0
Počet výsledkov na neprítomnosť chalkónov	0	0	0	28	0	26
Percento správnych výsledkov (%)	100	100	100	100	100	100

(*) rozporné výsledky medzi dvoma duplikátmi, poukazujúce na chybu vzorkovania

Vzorok	G	H	I	J	K
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchylených výsledkov	14	14	14	14	14
Počet odchylených výsledkov (laboratóriá)	–	–	–	–	–
Počet prijatých výsledkov	28	14	14	28	28
Počet výsledkov na prítomnosť chalkónov	0	0	0	0	0
Počet výsledkov na neprítomnosť chalkónov	28	14	14	28	28
Percento správnych výsledkov (%)	100	100	100	100	100

Typy vzoriek:

- A pastis, slepé duplikáty,
- B pastis, jediná vzorka,
- C pastis, jediná vzorka,
- D „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,
- E „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,
- F likér s príchutou anžzu (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,
- G likér s príchutou anžzu (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,
- H ouzo (neobsahujúce chalkóny), jediná vzorka,
- I ouzo (neobsahujúce chalkóny), jediná vzorka,
- J aníz (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty,
- K „pastis“ (neobsahujúci chalkóny), slepé duplikáty.

IX. VAJEČNÝ ŽLTOK. STANOVENIE VAJEČNÉHO ŽLTOKU V LIEHOVÝCH NÁPOJOCH – FOTOMETRICKÁ METÓDA

1. Rozsah

Táto metóda je vhodná na stanovenie vaječného žltku v rozmedzí 40 až 250 g/l vo vaječnom likéri alebo likéri s vajíčkom.

2. Odkazy na normy

ISO 3696: 1987 Voda pre použitie v analytickom laboratóriu – Špecifikácie a skúšobné metódy.

3. Princíp

V etanole rozpustné zlúčeniny obsahujúce fosfor, ktoré sa nachádzajú vo vaječnom žltku, sa extrahujú a skúšajú fotometricky ako komplex molybdenanu fosforečného.

4. Činidlá a materiály

- 4.1. Redestilovaná voda
- 4.2. Infuzóriová hlinka
- 4.3. Etanol 96 % obj. (CAS 64-17-5)
- 4.4. Roztok 15 % octanu horečnatého (CAS 16674-78-5)
- 4.5. 10 % kyselina sírová (CAS 7664-93-9)

- 4.6. 1 N kyselina sírová
- 4.7. Roztok 0,16 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného (CAS 778-77-0), KH₂PO₄
- 4.8. Činidlo pre stanovenie forforečnanu:
rozpustite 20 g molybdenanu amónneho (CAS 12054-85-2), (NH₄M₁₀O₂₄·4H₂O v 400 ml vody pri 50 °C;
v ďalšej nádobe rozpustite 1 g vanadičnanu amónneho (CAS 7803-55-6), NH₄VO₃ v 300 ml horúcej vody, nechajte ochladiť, potom pridajte 140 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej (CAS 7697-37-2). Spojte ochladené roztoky do 1 000 ml odmernej banky a doplňte po značku na 1 000 ml.

5. Prístroje a zariadenie

- 5.1. 100 ml kužeľová banka
- 5.2. Ultrazvukový kúpeľ (alebo magnetické miešadlo)
- 5.3. 100 ml odmerná banka
- 5.4. Kúpeľ s 20 °C vodou
- 5.5. Filter (Whatman č. 4 alebo rovnocenný)
- 5.6. Porcelánový (alebo platinový) téglík
- 5.7. Vodný kúpeľ
- 5.8. Horúca platňa
- 5.9. Muflová pec
- 5.10. 50 ml odmerná banka
- 5.11. 20 ml odmerná banka
- 5.12. Spektrofotometer nastavený na 420 nm
- 5.13. 1 cm kveta

6. Vzorky

Pred analýzou sa vzorky skladujú pri izbovej teplote.

7. Postup

- 7.1. Príprava vzorky
- 7.1.1. Navážte 10 g vzorky do 100 ml kužeľovej banky (5.1.).
- 7.1.2. Pridávajte postupne 70 ml etanolu (4.3.) po malých častiach s krúžením pri každom pridaní a vložte do ultrazvukového kúpeľa (5.2.) na 15 minút (alebo miešajte zmes magnetickým miešadlom (5.2.) 10 minút pri izbovej teplote).
- 7.1.3. Preneste obsah banky do 100 ml odmernej banky (5.3.) s premytím etanolom (4.3.). Upravte po kalibračnú značku etanolom (4.3.) a položte banku do 20 °C vodného kúpeľa (5.4.). Upravte po kalibračnú značku pri 20 °C.
- 7.1.4. Pridajte malé množstvo infuzórivej hlinky (4.2.) a prefiltrujte (5.5.), odstráňte prvých 20 ml.
- 7.1.5. Preneste 25 ml filtrátu do porcelánového/platinového téglíka (5.6.). Filtrát sa musí potom zahustiť jemným odparovaním na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) pridaním 5 ml 15 % roztoku octanu horečnatého (4.4.).
- 7.1.6. Položte téglíky na horúci platňu (5.8) a zohrievajte kým nie sú suché.
- 7.1.7. Spopolnite zvyšok ohrievaním do bieleho žiaru pri 600 °C v muflovej peci (5.9.), pokiaľ nie je popol biely, minimálne jeden a pol hodiny, môže tam byť ale aj cez noc.
- 7.1.8. Pridajte do popola 10 ml 10 % kyseliny sírovej (4.5.) a preneste zmes prepláchnutím destilovanou vodou (4.1.) do 50 ml odmernej banky (5.10.) a pri izbovej teplote doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.). 5 ml podiel tohto roztoku popola sa má použiť na prípravu roztoku vzorky na fotometrické stanovenie.
- 7.2. Fotometrické stanovenie fosforečnanu
- 7.2.1. Porovnávací roztok
- 7.2.1.1. Dajte 10 ml 10 % kyseliny sírovej (4.5.) do 50 ml odmernej banky a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).

- 7.2.1.2. Pridajte do 5 ml podielu tohto roztoku (7.2.1.1.) v 20 ml odmernej banke (5.11.), 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 2 ml fosforečného činidla (4.8.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).
- 7.2.1.3. Zazátkujte s voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladieť vo vodnom kúpeli s 20 °C vodou (5.4.) 20 minút.
- 7.2.1.4. Naplňte 1 cm kyvetu (5.13.) týmto porovnávacím roztokom.
- 7.2.2. Roztok vzorky
- 7.2.2.1. Pridajte do 5 ml podielu roztoku popola (7.1.8.) v 20 ml odmernej banke (5.11.) 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 2 ml fosforečného činidla (4.8.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).
- 7.2.2.2. Zazátkujte s voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladieť na vodnom kúpeli 20 °C vodou (5.4.) 20 minút.
- 7.2.2.3. Žltý roztok, ktorý sa vytvoril, sa ihneď analyzuje spektrofotometricky (5.12.) v 1 cm kyvete (5.13.) pri 420 nm voči porovnávaciemu roztoku (7.2.1.4.).
- 7.2.3. Kalibračná krivka
- 7.2.3.1. S cieľom skonštruovania kalibračnej krivky dajte 2 ml podiely fosforečného činidla (4.8.) do 20 ml odmernej baniek (5.11.), každá z nich obsahuje 1 ml 1 N kyseliny sírovej (4.6.) a 0, 2, 4, 6, 8 a 10 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (4.7.) a doplňte po značku destilovanou vodou (4.1.).
- 7.2.3.2. Zazátkujte voľne vloženou zátkou, potraste a zohrievajte na vodnom kúpeli s vriacou vodou (5.7.) 10 minút, potom nechajte chladieť na vodnom kúpeli 20 °C vodou (5.4.) 20 minút a analyzuje spektrofotometricky (5.12.) v 1 cm kyvete (5.13.) pri 420 nm voči porovnávaciemu roztoku (7.2.1.4.).
- 7.2.3.3. Zostrojenie kalibračnej krivky:

roztok dihydrogenfosforečnanu (ml)	0	2	4	6	8	10
P ₂ O ₅ (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

8. Vyjadrenie výsledkov

Obsah vaječného žltka v g/l sa vypočíta z tejto rovnice:

$$\text{g/l vaječného žltka} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{hustota}}{E/40}$$

kde:

- 110 je prepočítavací faktor na celkový P₂O₅ v g v 100 g vaječného žltka,
- mg P₂O₅ je hodnota stanovená z kalibračnej krivky,
- hustota je hmotnosť na jednotku objemu (g/ml) likéru na báze vajčeka pri 20 °C,
- E váha likéru na báze vajčeka v g,
- 40 faktor zriedenia pre 5 ml podiel roztoku popola.

9. Charakteristika vybraných metrologických parametrov metódy (presnosť)

Štatistické výsledky medzilaboratórnej skúšky:

nasledujúca tabuľka uvádza hodnoty pre vaječný žltok.

Nasledujúce údaje boli získané z medzinárodnej štúdie určenia vybraných parametrov metódy získané medzinárodne dohodnutým postupom.

Rok medzilaboratórnej skúšky:	1 998
Počet laboratórií:	24
Počet vzoriek:	5
Skúmaná látka:	vaječný žltok

Vzorok	A	B	C	D	E
Počet laboratórií, ktoré boli ponechané po odstránení odchylených výsledkov	19	20	22	20	22
Počet odchylených výsledkov (laboratóriá)	3	4	2	4	2
Počet prijatých výsledkov	38	40	44	40	4
Stredná hodnota	147,3	241,1	227,4	51,9*) 72,8*)	191,1
Štandardná odchýlka opakovateľnosti (S_r) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relatívna štandardná odchýlka opakovateľnosti (RSD _r) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limit opakovateľnosti (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relatívna štandardná odchýlka reprodukovateľnosti (RSD _R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limit reprodukovateľnosti (R) g/l	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Typy vzoriek:

- A Advocaat, slepé duplikáty,
- B pastis, jediná vzorka,
- C Advocaat, jediná vzorka,
- D Advocaat (zriedený), delené hladiny*
- E Advocaat, slepé duplikáty,