

32002R2091

27.11.2002.

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

L 322/11

**UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2091/2002****od 26. studenoga 2002.****o izmjeni Uredbe (EZ) br. 2870/2000 o utvrđivanju referentnih metoda Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića**

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća (EEZ) br. 1576/89 od 29. svibnja 1989. o utvrđivanju općih pravila za definiranje, opis i prezentiranje jakih alkoholnih pića <sup>(1)</sup>, kako je izmijenjena Aktom o pristupanju Austrije, Finske i Švedske, a posebno njezin članak 4. stavak 8.,

budući da:

- (1) Uredba Komisije (EZ) br. 2870/2000 od 19. prosinca 2000. o utvrđivanju referentnih metoda Zajednice za analizu jakih alkoholnih pića <sup>(2)</sup> opisuje ove metode u Prilogu.
- (2) Četiri metode za analizu za određivanje trans-anetola u alkoholnim pićima s aromom anisa, glicirizinske kiseline i kalkona u pastisu i žumanjka u liker u od jaja i liker u s jajetom potvrđene su prema međunarodno priznatim postupcima kao dio istraživačkog projekta koji je poduzela Komisija.

(3) Ove četiri metode mogu biti priznate kao referentne metode Zajednice i moraju se dodati u Prilog Uredbi (EZ) br. 2870/2000.

(4) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Provedbenog odbora za alkoholna pića,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

**Članak 1.**

Prilog Uredbi (EZ) br. 2870/2000 mijenja se kako slijedi:

1. U sadržaju Priloga, naziv „(p.m.)” pod točkama V., VI., VII. i IX. briše se.
2. Poglavlja V., VI., VII. i IX. u Prilogu ovoj Uredbi dodaju se nakon poglavlja III.

**Članak 2.**

Ova Uredba stupa na snagu sedmog dana od dana objave u Službenom listu Europskih zajednica.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 26. studenoga 2002.

Za Komisiju  
Franz FISCHLER  
Član Komisije

<sup>(1)</sup> SL L 160, 12.6.1989., str. 1.

<sup>(2)</sup> SL L 333, 29.12.2000., str. 20.

## PRILOG

## V. ANETOL. ODREĐIVANJE TRANS-ANETOLA U ALKOHOLNIM PIĆIMA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

## 1. Područje primjene

Ova je metoda prikladna za određivanje trans-anetola u alkoholnim pićima s aromom anisa primjenom kapilarne plinske kromatografije.

## 2. Referentni standardi

ISO 3696:1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

## 3. Načelo rada

Koncentracija trans-anetola alkoholnog pića određuje se plinskom kromatografijom (GC). Ista količina internog standarda, npr. 4-alilanzola (estragola) kada estragol nije prirodno prisutan u uzorku, dodaje se uzorku za ispitivanje i referentnoj otopini trans-anetola poznate koncentracije te se oba razrijede pomoću 45 %-tne otopine etanola i injektiraju izravno u sustav za plinsku kromatografiju (GC). Prije pripreme uzoraka i analize likera koji sadrže veće količine šećera potrebna je ekstrakcija.

## 4. Reagensi i materijali

Tijekom analize koriste se samo reagensi čija je čistoća najmanje 98 %. Mora se koristiti voda čiji je stupanj kakvoće najmanje 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

Referentne kemikalije trebaju se čuvati na hladnom (na 4 °C) i tamnom mjestu, u aluminijskim spremnicima ili u bocicama za reagense od obojenog (jantarnog) stakla. Poželjno je da zatvarači imaju aluminijsku brtvu. Potrebno je „otopiti“ trans-anetol iz kristalnog stanja prije uporabe, ali u tom slučaju njegova temperatura nikada ne smije prijeći 35 °C.

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

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

4.3. 4-alilanzol, (estragol) (CAS 140-67-0), preporučeni interni standard (IS)

4.4. Etanol 45 % vol.

Doda se 560 g destilirane vode u 378 g etanola 96 % vol.

4.5. Priprema standardnih otopina

Sve standardne otopine moraju se čuvati na sobnoj temperaturi (od 15 do 35 °C), na tamnom mjestu, u aluminijskim spremnicima ili u bocicama za reagense od obojenog (jantarnog) stakla. Poželjno je da zatvarači imaju aluminijsku brtvu.

Trans-anetol i 4-alilanzol praktički su netopivi u vodi te je stoga neophodno otopiti trans-anetol i 4-alilanzol u određenoj količini 96 %-tnog etanola (4.1.) prije dodavanja 45 %-tnog etanola (4.4.).

Radne otopine moraju se pripremati svježe svaki tjedan.

4.5.1. Standardna otopina A

Radna otopina trans-anetola (koncentracija: 2 g/L)

Odvagne se 40 mg trans-anetola (4.2) u odmjernu tikvicu od 20 ml (ili 400 mg u 200 ml itd.). Doda se određena količina 96 %-tnog etanola (4.1), nadopuni do oznake s 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

4.5.2. Interna standardna otopina B

Radna interna standardna otopina, npr. estragol (koncentracija: 2 g/L)

Odvagne se 40 mg estragola (4.3) u odmjernu tikvicu od 20 ml (400 mg u 200 ml itd.). Doda se određena količina 96 %-tnog etanola (4.1), nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

#### 4.5.3. Otopine koje se koriste za provjeru linearnosti odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID)

Linearnost odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID-a) mora se provjeriti za analizu, uzimajući u obzir raspon koncentracija trans-anetola u alkoholnim pićima od 0 g/L do 2,5 g/L. U postupku analize, nepoznati uzorci alkoholnih pića koji se moraju analizirati razrijede se 10 puta (8.3.). Za uvjete analize opisane u metodi, radne otopine koje odgovaraju koncentracijama od 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 i 0,25 g/L trans-anetola u uzorku koji se mora analizirati pripreme se kako slijedi: uzme se 0,5, 1, 1,5, 2 i 2,5 ml radne otopine A (4.5.1.) i pipetira u odvojene odmjerne tikvice od 20 ml; u svaku se tikvicu pipetira 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

Otopine slijepe probe (8.4.) koriste se kao 0 g/L otopina.

#### 4.5.4. Standardna otopina C

Uzme se 2 ml standardne otopine A (4.5.1.) i pipetira u odmjernu tikvicu od 20 ml, zatim se doda 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), dopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

### 5. Aparatura i oprema

5.1. Kapilarni plinski kromatograf opremljen plamenim ionizacijskim detektorom (FID) i integratorom ili drugim sustavom za obradu podataka koji mjeri visine ili površine pikova te uređajem za automatsko uzorkovanje ili potrebnom opremom za ručno injektiranje uzoraka.

5.2. Injektor sa i bez razdjeljenja

5.3. Kapilarni stupac, na primjer:

Dužina: 50 m

Unutarnji promjer: 0,32 mm

Debljina filma: 0,2 µm

Stacionarna faza: FFAP – modificirani TPA polietilen glikol umreženi porozni polimer.

5.4. Uobičajena laboratorijska oprema: odmjerne staklene posuđe razine A, analitička vaga (preciznost: ± 0,1 mg).

### 6. Kromatografski uvjeti

Vrsta i dimenzije stupca te uvjeti plinske kromatografije moraju biti takvi da su anetol i interni standard odvojeni jedan od drugog i od svih interferirajućih tvari. Uobičajeni uvjeti za stupac iz primjera u 5.3. su:

6.1. Plin nosilac: analitički helij

6.2. Brzina protoka: 2 ml/min

6.3. Temperatura injektora: 250 °C

6.4. Temperatura detektora: 250 °C

6.5. Temperatura peći: izotermna, 180 °C, vrijeme rada 10 minuta

6.6. Volumen injektiranja: 1 µL, razdjeljenje 1:40.

### 7. Uzorci

Uzorci se moraju čuvati na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetla i hladnoće.

### 8. Postupak

8.1. Pretraživanje uzorka na estragol

Za provjeru je li estragol prirodno prisutan u uzorku, mora se napraviti analiza slijepe probe bez dodatka bilo kojeg internog standarda. Ako je estragol prirodno prisutan, tada se mora odabrati neki drugi interni standard (na primjer, mentol).

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml uzorka, nadopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

8.2. Priprema nepoznatih uzoraka

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml uzorka, zatim se doda 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 % -tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

## 8.3. Slijepa proba

U odmjernu tikvicu od 20 ml pipetira se 2 ml interne standardne otopine B (4.5.2.), nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) te dobro promiješa.

## 8.4. Ispitivanje linearnosti

Prije početka analize mora se provjeriti linearnost odziva plamenog ionizacijskog detektora (FID-a) sukcesivnom trostrukom analizom svake standardne otopine za provjeru linearnosti (4.5.3.).

Iz površine pikova ili visine pikova integratora za svako se injektiranje napravi grafički prikaz koncentracije njihove matične otopine u g/L prema omjeru R za svaku.

$R = \text{visina ili površina pika za trans-anetol} / \text{površina ili visina pika za estragol}$ .

Mora se dobiti linearna krivulja.

## 8.5. Određivanje

Ubrizga se otopina slijepa probe (8.3.), zatim standardna otopina C (4.5.4.) i jedna od standardnih otopina za provjeru linearnosti (4.5.3.) koja će djelovati kao uzorak za kontrolu kakvoće (može se odabrati s obzirom na vjerojatnu koncentraciju trans-anetola u nepoznatom uzorku) te pet nepoznatih uzoraka (8.2.); umetne se uzorak za provjeru linearnosti (kontrolu kakvoće) nakon svakih pet nepoznatih uzoraka kako bi se osigurala analitička stabilnost.

## 9. Računanje faktora odziva

Mjere se ili površine pika (pomoću integratora ili drugog sustava za obradu podataka) ili visine pika (ručna integracija) za pikove trans-anetola i internog standarda.

9.1. Računanje faktora odziva ( $RF_i$ )

Faktor odziva računa se kako slijedi

$$RF_i = (C_i / \text{površina ili visina}_i) * (\text{površina ili visina}_{is} / C_{is})$$

gdje je:

$C_i$  koncentracija trans-anetola u standardnoj otopini A (4.5.1.)

$C_{is}$  koncentracija internog standarda u standardnoj otopini B (4.5.2.)

$\text{površina}_i$  površina (ili visina) pika trans-anetola

$\text{površina}_{is}$  površina (ili visina) pika internog standarda

$RF_i$  se računa iz pet uzoraka otopine C (4.5.4.).

## 9.2. Analiza otopina za ispitivanje linearnosti odziva

Ubrizgaju se otopine za ispitivanje linearnosti odziva (4.5.3.).

## 9.3. Analiza uzorka

Ubrizga se otopina nepoznatog uzorka (8.2.).

## 10. Računanje rezultata

Formula za izračun koncentracije trans-anetola je sljedeća:

$$c_i = C_{is} * (\text{površina ili visina}_i / \text{površina ili visina}_{is}) * RF_i$$

gdje je:

$c_i$  nepoznata koncentracija trans-anetola

$C_{is}$  koncentracija internog standarda u nepoznatoj tvari (4.5.2.)

$\text{Površina ili visina}_i$  površina ili visina pika trans-anetola

$\text{Površina ili visina}_{is}$  površina ili visina pika internog standarda

$RF_i$  koeficijent odziva (izračunan kao pod 9.1.)

Koncentracija trans-anetola izražava se u gramima po litri, na jednu decimalu.

## 11. Osiguranje i kontrola kakvoće

Kromatogrami moraju biti takvi da su anetol i interni standard odvojeni jedan od drugog i od svih interferirajućih tvari. Vrijednost  $RF_i$  izračuna se iz rezultata za pet injektiranja otopine C (4.5.4.). Ako je koeficijent varijacije ( $CV\% = (\text{standardno odstupanje} / \text{srednja vrijednost}) * 100$ ) unutar plus ili minus 1 %, prosječna vrijednost  $RF_i$  je prihvatljiva.

Gornji se izračun mora koristiti za računanje koncentracije trans-anetola u uzorku koji je odabran za kontrolu kakvoće iz otopina za kontrolu linearnosti (4.5.3.).

Ako su srednji izračunati rezultati iz analize otopina za kontrolu linearnosti koje su odabrane za uzorke interne kontrole kakvoće (IQC) unutar plus ili minus 2,5 % njihove teoretske vrijednosti, tada se mogu prihvatiti rezultati za nepoznate uzorke.

## 12. Obrada uzorka alkoholnog pića koji sadrži veću količinu šećera i uzorka likera prije analize plinskom kromatografijom

Ekstrakcija alkohola iz alkoholnog pića koje sadrži veću količinu šećera kako bi se mogla odrediti koncentracija trans-anetola primjenom kapilarne plinske kromatografije.

### 12.1. Načelo rada

Uzme se alikvot uzorka likera i doda mu se interni standard čija je koncentracija slična koncentraciji analita (trans-anetola) u liker. Tome se doda natrijev fosfat dodekahidrat i bezvodni amonijev sulfat. Dobivena se mješavina dobro promiješa i ohladi, nastaju dva sloja, a gornji alkoholni sloj se ukloni. Uzme se alikvot tog alkoholnog sloja i razrijedi 45 %-tnom otopinom etanola (4.4.) (Napomena: u ovoj se fazi ne dodaje nijedan interni standard, budući da je već dodan). Dobivena se otopina analizira plinskom kromatografijom.

### 12.2. Reagensi i materijali

Tijekom ekstrakcije se koriste samo reagensi čija je čistoća veća od 99 %.

#### 12.2.1. Amonijev sulfat, bezvodni (CAS 7783-20-2).

#### 12.2.2. Natrijev fosfat, dibazični, dodekahidrat (CAS 10039-32-4).

### 12.3. Aparatura i oprema

Konusne tikvice, tikvice za odjeljivanje, hladnjak.

### 12.4. Postupak

#### 12.4.1. Pretraživanje uzorka na estragol

Kako bi bili sigurni da estragol nije prirodno prisutan u uzorku, mora se izvršiti ekstrakcija slijepa probe (12.6.2.) i analiza bez dodavanja bilo kojeg internog standarda. Ako je estragol prirodno prisutan, tada se mora odabrati neki drugi interni standard.

#### 12.4.2. Ekstrakcija

U konusnu se tikvicu pipetira 5 ml 96 %-tnog etanola (4.1.); u ovu se tikvicu odvagne 50 mg internog standarda (4.3.) i doda 50 ml uzorka. Doda se 12 g amonijeva sulfata, bezvodnog (12.2.1.) i 8,6 g dibazičnog natrijeva fosfata, dodekahidrata (12.2.2.). Konusna tikvica se začepi.

Tikvica se mućka najmanje 30 minuta. Može se koristiti i mehanički uređaj za mućkanje, ali ne i magnetni mješalica obložen teflonom, jer teflon upija određenu količinu analita. Dodane soli neće se potpuno otopiti.

Začepljena se tikvica stavi u hladnjak ( $T < 5\text{ °C}$ ) na najmanje 2 sata.

Nakon toga trebaju nastati dva odvojena tekuća sloja i čvrsti ostatak. Alkoholni sloj treba biti bistar; ako nije, stavi se ponovno u hladnjak dok ne postane bistar.

Kada alkoholni sloj postane bistar, pažljivo se uzme alikvot (npr. 10 ml) bez narušavanja vodenog sloja, stavi u bočicu od jantarnog stakla i zatvori sigurnosnim zatvaračem.

#### 12.4.3. Priprema ekstrahiranog uzorka za analizu

Pusti se da ekstrakt (12.4.2.) dosegne sobnu temperaturu.

Uzme se 2 ml alkoholnog sloja ekstrahiranog uzorka regulirane temperature i pipetira u odmjernu tikvicu od 20 ml, nadopuni do oznake 45 %-tnim etanolom (4.4.) i dobro promiješa.

## 12.5. Određivanje

Slijedi se postupak opisan pod 8.5.

## 12.6. Računanje rezultata

Za računanje rezultata koristi se sljedeća formula:

$$C_i = (m_{is}/V) * (površina_i/površina_{is}) * RF_i$$

gdje je:

$m_{is}$  masa uzetog internog standarda (4.3.) (12.4.2.) (u miligramima)

$V$  volumen nepoznatog uzorka (50 ml)

$RF_i$  faktor odziva (9.1.)

$površina_i$  površina pika trans-anetola

$površina_{is}$  površina pika internog standarda

Rezultati se izražavaju u gramima po litri, na jednu decimalu.

## 12.7. Kontrola i osiguranje kakvoće

Slijedi se postupak opisan pod 11. gore.

## 13. Svojstva metode (preciznost)

Statistički rezultati interlaboratorijskog ispitivanja:

Sljedeće tablice daju vrijednosti za anetol.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina interlaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	16
Broj uzoraka	10
Analit	anetol

Pastis:

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	15	15	15	13	16	16
Broj odstupanja (laboratorija)	1	1	1	3	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	30	30	30	26	16	16
Srednja vrijednost g/L	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Standardno odstupanje ponovljivosti ( $S_t$ ) g/L	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti ( $RSD_t$ ) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Granica ponovljivosti ( $\tau$ ) g/L	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Standardno odstupanje obnovljivosti ( $S_R$ ) g/L	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti ( $RSD_R$ ) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Granica obnovljivosti (R) g/L	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Vrste uzoraka

A pastis, slijepe probe u duplikatu

B pastis, slijepe probe u duplikatu

C pastis, slijepe probe u duplikatu

D pastis, slijepe probe u duplikatu

E pastis, jednostruki duplikati

F pastis, jednostruki duplikati

Druga alkoholna pića s aromom anisa:

Uzorci	G	H	I	J
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	16	14	14	14
Broj odstupanja (laboratorija)	—	2	1	1
Broj prihvaćenih rezultata	32	28	28	28
Srednja vrijednost g/L	0,778 0,530*	1,742	0,351	0,599
Standardno odstupanje ponovljivosti ( $S_t$ ) g/L	0,020	0,012	0,013	0,014
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti ( $RSD_t$ ) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Granica ponovljivosti ( $r$ ) g/L	0,056	0,033	0,038	0,038
Standardno odstupanje obnovljivosti ( $S_R$ ) g/L	0,031	0,029	0,021	0,030
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti ( $RSD_R$ ) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Granica obnovljivosti ( $R$ ) g/L	0,088	0,080	0,058	0,084

Vrste uzoraka

G ouzo, razdijeljene razine(\*)

H anis, slijepe probe u duplikatu

I liker a aromom anisa, u duplikatu

J liker a aromom anisa, u duplikatu.

## VI. GLICIRIZNA KISELINA. ODREĐIVANJE GLICIRIZNE KISELINE PRIMJENOM VISOKODJELOTVORNE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

### 1. Svrha

Ova metoda je prikladna za određivanje glicirizne kiseline u alkoholnim pićima s aromom anisa primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC). Uredba (EEZ) br. 1576/89 određuje da svako alkoholno piće s aromom anisa koje se naziva „pastis” mora sadržavati između 0,05 i 0,5 g glicirizne kiseline po litri.

### 2. Referentni standardi

ISO 3696: 1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

### 3. Načelo rada

Koncentracija glicirizne kiseline se određuje pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) s UV detekcijom. Standardna otopina i probni uzorak filtriraju se i odvojeno injektiraju izravno u sustav HPLC-a.

### 4. Reagensi i materijali

Tijekom analize, koriste se samo reagensi za HPLC, apsolutni etanol i voda čiji stupanj kakvoće iznosi 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

- 4.1. Etanol 96 % vol. (CAS 64-17-5).
- 4.2. Amonij glicirizinat,  $C_{42}H_{62}O_{16}\cdot NH_3$  (amonijeva sol glicirizne kiseline)  
(Relativna molekulska masa 839,98) (CAS 53956-04-0): čistoća najmanje 90 %  
(Relativna molekulska masa: glicirizinska kiselina 822,94).
- 4.3. Ledena octena kiselina,  $CH_3COOH$  (CAS 64-19-7).
- 4.4. Metanol,  $CH_3OH$  (CAS 67-56-1).
- 4.5. Etanol 50 % vol.  
Za 1 000 ml na 20 °C:  
— 96 %-tni etanol (4.1.): 521 ml  
— voda (2.0.): 511 ml.
- 4.6. Priprema HPLC otopina za eluciju
  - 4.6.1. Otapalo za eluciju A (primjer)  
80 dijelova (po volumenu) vode (2.0.)  
20 dijelova (po volumenu) octene kiseline (4.3.).  
Otapalo za eluciju degazira se u trajanju od pet minuta.  
*Napomena:* Ako voda koja se koristi nije mikrofiltrirana, preporučuje se filtrirati pripremljeno otapalo za eluciju na filteru za organska otapala s veličinom pora koja je manja ili jednaka 0,45  $\mu m$ .
  - 4.6.2. Otapalo za eluciju B  
Metanol (4.4.).
- 4.7. Priprema standardnih otopina  
Sve standardne otopine moraju se svježe pripremiti nakon dva mjeseca.
  - 4.7.1. Referentna otopina C  
U odmjernu tikvicu od 100 ml odvagane se 25 mg amonijeva glicirizinata (4.2) s točnošću od 0,1 mg. Doda se etanol 50 % vol. (4.5.) i otopi amonijev glicirizinat. Kad je otopljen, dopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.).  
Filtrira se kroz filter za organska otapala.
  - 4.7.2. Standardne otopine koje se koriste za provjeru linearnosti odziva uređaja  
Radna otopina od 1,0 g/L se pripremi odvagom s točnošću od 0,1 mg, 100 mg amonijeva glicirizinata u odmjernu tikvicu od 100 ml. Doda se etanol 50 % vol. (4.5.) i otopi amonijev glicirizinat. Kad je otopljen, nadopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.).  
Pripreme se najmanje četiri druge otopine koje odgovaraju 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 g/L amonijeva glicirizinata pipetiranjem 5 ml, 10 ml, 25 ml, odnosno 50 ml radne otopine masene koncentracije 1,0 g/L u odvojene odmjerne tikvice od 100 ml. Nadopuni se do oznake etanolom 50 % vol. (4.5.) i dobro promiješa.  
Sve se otopine filtriraju kroz filter za organska otapala.
5. **Aparatura i oprema**
  - 5.1. Sustav za odjeljivanje
    - 5.1.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf
    - 5.1.2. Sustav pumpi koji omogućuje postizanje i održavanje stalne ili programirane brzine protoka s visokom preciznošću.
    - 5.1.3. UV spektrofotometar: mora biti postavljen na 254 nm.
    - 5.1.4. Sustav za degaziranje otapala.
  - 5.2. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji rad je kompatibilan s ostatkom sustava.



- 5.3. Kolona (primjer):  
Materijal: nehrđajući čelik ili staklo  
Unutarnji promjer: 4 do 5 mm  
Duljina: 100 do 250 mm  
Stacionarna faza: umreženi silicijev dioksid s (poželjno sferičnom) oktadecilnom funkcijskom grupom (C18), najveća veličina čestica: 5 µm.
- 5.4. Laboratorijska oprema
- 5.4.1. Analitička vaga s preciznošću očitavanja od 0,1 mg
- 5.4.2. Odmjerno stakleno posuđe razine A
- 5.4.3. Mirkomembranski filtri za male volumene.

## 6. Kromatografski uvjeti

- 6.1. Svojstva elucije (primjer)
- brzina protoka: 1 ml/minuta,
  - otapalo A = 30 %,
  - otapalo B = 70 %.
- 6.2. Detekcija
- UV = 254 nm

## 7. Postupak

- 7.1. Priprema uzorka alkoholnog pića
- Filtrira se, ako je potrebno, kroz filter za organska otapala (promjer pora: 0,45 µm).
- 7.2. Određivanje
- Kad se stabiliziraju kromatografski uvjeti,
- injektira se 20 µL referentne otopine C (4.7.1),
  - injektira se 20 µL otopine uzorka,
  - usporede se dva kromatograma. Identificiraju se pikovi glicirizne kiseline na temelju njihovih vremena retencije. Izmjere se njihove površine (ili visine) i izračuna koncentracija u g/L na dvije decimale primjenom sljedeće jednadžbe:

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

gdje je:

- c* koncentracija u gramima po litri glicirizne kiseline u alkoholnom piću koje se analizira
- C* koncentracija u gramima po litri amonijeva glicirizinata u referentnoj otopini
- h* površina (ili visina) pika glicirizne kiseline alkoholnog pića koje se analizira
- H* površina (ili visina) pika glicirizne kiseline referentne otopine
- P* čistoća referentnog amonijeva glicirizinata (u %)
- 823 masa jednog mola glicirizne kiseline
- 840 masa jednog mola amonijeva glicirizinata.

## 8. Svojstva metode (preciznost)

Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:  
sljedeće tablice daju vrijednosti za gliciriznu kiselinu.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	16
Broj uzoraka	5
Analit	glicirizna kiselina

Uzorci	A	B	C	D	E
Broj zadržanih laboratorija nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	13	14	15	16	16
Broj odstupanja (laboratorija)	3	2	1	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	26	28	30	32	32
Srednja vrijednost g/L	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Standardno odstupanje ponovljivosti ( $S_t$ ) g/L	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti ( $RSD_t$ ) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Granica ponovljivosti ( $r$ ) g/L	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Standardno odstupanje obnovljivosti ( $S_R$ ) g/L	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti ( $RSD_R$ ) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Granica obnovljivosti ( $R$ ) g/L	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Vrste uzoraka

- A pastis, slijepe probe u duplikatu
- B pastis, razdijeljene razine (\*)
- C pastis, slijepe probe u duplikatu
- D pastis, slijepe probe u duplikatu
- E pastis, slijepe probe u duplikatu

## VII. KALKONI. VISOKODJELOTVORNA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ZA PROVJERU PRISUSTVA KALKONA U PASTISU

### 1. Svrha

Ova je metoda prikladna za određivanje prisutnosti kalkona u alkoholnim pićima s aromom anisa. Kalkoni su prirodna bojila iz skupine flavonoida koji se nalaze u slatkom korijenu (*Glycyrrhiza glabra*).

Da bi se alkoholno piće s aromom anisa moglo zvati „pastis”, mora sadržavati kalkone (Uredba (EEZ) br. 1576/89).

### 2. Referentni standardi

ISO 3696: 1987 Voda za uporabu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

### 3. Načelo rada

Pripremi se referentna otopina ekstrakta slatkog korijena. Prisutnost ili odsutnost kalkona određuje se visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s UV detekcijom.

### 4. Reagensi i materijali

Tijekom analize, koriste se samo reagensi HPLC čistoće. Etanol treba biti 96 % vol. Treba se koristiti samo voda čiji stupanj kakvoće iznosi 3 prema definiciji standarda ISO 3696.

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

4.2. Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN (CAS 75-05-8)

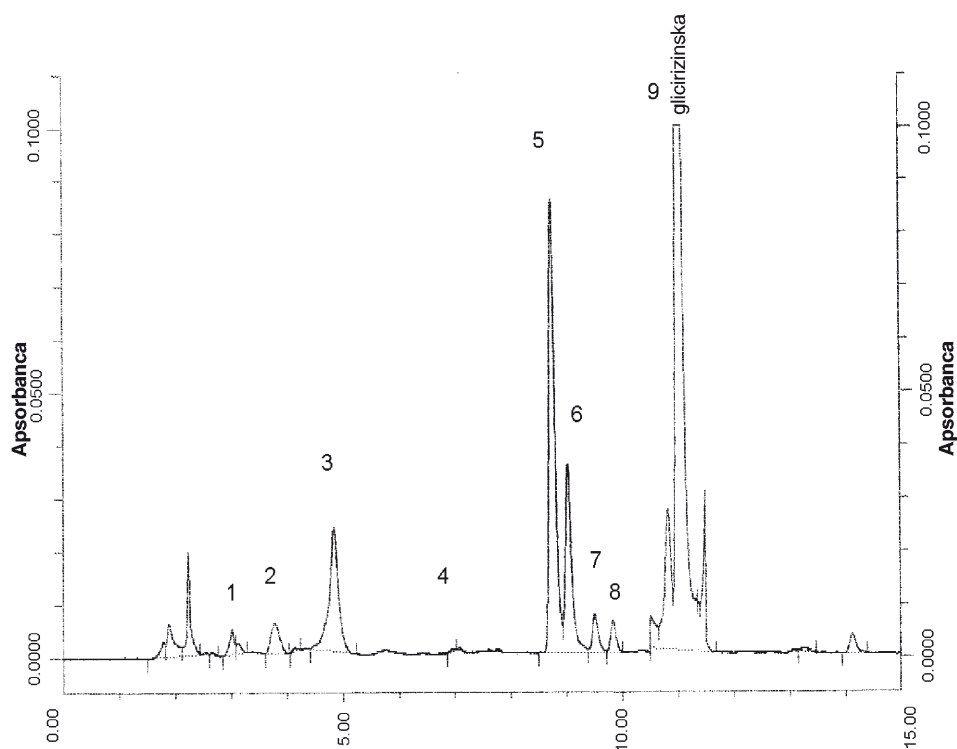
- 4.3. Referentna tvar: *Glycyrrhiza glabra*: slatki korijen  
Grubo mljeveni slatki korijen (*Glycyrrhiza glabra*). Prosječne dimenzije štapićastih čestica: dužina: 10 do 15 mm, debljina: 1 do 3 mm.
- 4.4. Natrijev acetat, CH<sub>3</sub>COONa (CAS 127-09-3)
- 4.5. Ledena octena kiselina, CH<sub>3</sub>COOH (CAS 64-19-7)
- 4.6. Priprema otopina
- 4.6.1. Etanol 50 % vol.  
Za 1 000 ml na 20 °C:  
— etanol 96 % vol. (4.1.): 521 ml  
— voda (2.0.): 511 ml.
- 4.6.2. Otapalo A: acetonitril  
Acetonitril (4.2.) analitičke čistoće za HPLC.  
Degazira se.
- 4.6.3. Otapalo B: 0,1 M puferška otopina natrijeva acetata, pH 4,66.  
U odmjernu se tikvicu odvagne 8,203 g natrijeva acetata (4.4.), doda 6,005 g ledene octene kiseline (4.5.) i nadopuni do 1 000 ml vodom (2.).
5. **Priprema referentnog ekstrakta iz *Glycyrrhiza glabra* (4.3)**
- 5.1. Odvagne se 10 g mljevenog slatkog korijena (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3.) i stavi u destilacijsku tikvicu s okruglim dnom  
— doda se 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.),  
— pusti se da vrije u refluksu sat vremena,  
— filtrira se. i  
— filtrat se odloži za kasniju uporabu.
- 5.2. S filtra se skine ekstrakt slatkog korijena,  
— stavi u destilacijsku tikvicu s okruglim dnom,  
— doda se 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.),  
— pusti se da vrije u refluksu sat vremena,  
— filtrira se. Filtrat se odloži za kasniju uporabu.
- 5.3. Ekstrakcija slatkog korijena mora se napraviti tri puta za redom.
- 5.4. Kombiniraju se tri filtrata.
- 5.5. Na rotacijskom isparivaču se ispari otapalo (iz 5.4.).
- 5.6. Pokupi se ostatni ekstrakt (iz 5.5.) sa 100 ml etanola 50 % vol. (4.6.1.).
6. **Aparatura i oprema**
- 6.1. Sustav za odjeljivanje.
- 6.1.1. Visokodjelotvorni tekućinski kromatograf.
- 6.1.2. Sustav pumpi koji omogućuje postizanje i održavanje stalne ili programirane brzine protoka pri visokom tlaku.
- 6.1.3. UV/VID spektrofotometar: mora biti postavljen na 254 i 370 nm.
- 6.1.4. Sustav za degaziranje otapala.
- 6.1.5. Peć s kolonom koja se može podesiti na temperaturu od 40 ± 0,1 °C.
- 6.2. Računalni integrator ili uređaj za snimanje čiji je rad kompatibilan s ostatkom sustava za odjeljivanje.

- 6.3. Kolona
- Materijal: nehrđajući čelik ili staklo
- Unutarnji promjer: 4 do 5 mm
- Stacionarna faza: umreženi silicij dioksid s oktadecilnom funkcijskom grupom (C18), maksimalna veličina čestica: najviše 5  $\mu\text{m}$  (umrežena faza).
- 6.4. Uobičajena laboratorijska oprema, uključujući:
- 6.4.1. analitičku vagu (preciznost:  $\pm 0,1$  mg);
- 6.4.2. uređaj za destilaciju s povratnim hladilom koji se sastoji od, na primjer:
- tikvice s okruglim dnom od 250 ml i standardnim spojem od ubrušenog stakla,
  - 30 cm dugog povratnog hladila, i
  - izvora topline (bilo koja pirogena reakcija koja uključuje ekstrakt mora se izbjeći uporabom prikladnog sustava).
- 6.4.3. Rotacijski uređaj za isparivanje.
- 6.4.4. Filtracija (tj. lijevak Büchner).
- 6.5. Kromatografski uvjeti (primjer).
- 6.5.1. Svojstva elucije otapala A (4.6.2.) i B (4.6.3.):
- pomak s gradijenta 20/80 (V/V) na 50/50 (V/V) u 15 minuta,
  - pomak s gradijenta 50/50 (V/V) na 75/25 (V/V) u pet minuta,
  - jednaka jakost na 75/25 (V/V) tijekom 5 minuta,
  - stabilizacija kolone između injektiranja,
  - jednaka jakost na 20/80 (V/V) tijekom pet minuta.
- 6.5.2. Brzina protoka: 1 ml/minuta.
- 6.5.3. Podešavanja UV detektora:
- detektor mora biti podešen na 370 nm za detekciju prisustva kalkona, a zatim na 254 nm za detekciju glicirizne kiseline.
- Napomena:* promjena valne duljine (s 370 nm na 254 nm) mora se izvršiti 30 sekundi prije početka pika elucije glicirizne kiseline.
7. **Postupak**
- 7.1. Priprema uzorka alkoholnog pića
- Filtrira se kroz filtar za organska otapala (promjer pora: 0,45  $\mu\text{m}$ ).
- 7.2. Priprema ostatnog ekstrakta slatkog korijena (5.6.)
- Prije analize napravi se razrjeđenje jedan u deset pomoću etanola 50 % vol. (4.6.1.).
- 7.3. Određivanje
- 7.3.1. Injektira se 20  $\mu\text{L}$  pripremljenog ekstrakta slatkog korijena (7.2.). Analiza se vrši uz kromatografske uvjete opisane gore (6.5.).
- 7.3.2. Injektira se 20  $\mu\text{L}$  uzorka (7.1) (uzorak alkoholnog pića s aromom anisa). Analiza se vrši uz kromatografske uvjete opisane gore (6.5.).
- 7.3.3. Usporede se dva kromatograma. Mora postojati velika sličnost između dva kromatograma u zoni izlaza kalkona (tijekom detekcije na 370 nm u uvjetima analize koji su opisani gore (vidjeti sliku 1.).

## 8. Svojstva kromatograma za pastis

Slika 1

Kromatogram dobiven gore opisanom metodom, koji pokazuje prisutnost kalkona u „pastisu”. Pikovi od 1. do 8. su kalkoni, a pik 9 je glicirizinska kiselina.



## 9. Svojstva metode (preciznost)

Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:

sljedeća tablica daje rezultate za potvrđivanje prisustva ili odsustva kalkona u pastisu i alkoholnim pićima s aromom anisa.

Sljedeći podaci dobiveni su iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu su međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja	1998.
Broj laboratorija	14
Broj uzoraka	11
Analit	kalkoni

Uzorci	A	B	C	D	E	F
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	14	14	14	14	14	13
Broj odstupanja (laboratorija)	—	—	—	—	—	1 (*)
Broj prihvaćenih rezultata	28	14	14	28	28	26
Broj rezultata za prisutnost kalkona	28	14	14	0	28	0
Broj rezultata za odsutnost kalkona	0	0	0	28	0	26
Postotak točnih rezultata (%)	100	100	100	100	100	100

(\*) Nedosljedni rezultati između dvaju duplikata pripisani pogreški u uzorkovanju

Uzorci	G	H	I	J	K
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	14	14	14	14	14
Broj odstupanja (laboratorija)	—	—	—	—	—
Broj prihvaćenih rezultata	28	14	14	28	28
Broj rezultata za prisutnost kalkona	0	0	0	0	0
Broj rezultata za odsutnost kalkona	28	14	14	28	28
Postotak točnih rezultata (%)	100	100	100	100	100

Vrste uzoraka:

- A pastis, slijepa proba u duplikatu
- B pastis, jedan uzorak
- C pastis, jedan uzorak
- D „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu
- E „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu
- F liker s okusom anisa (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu
- G liker s okusom anisa (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu
- H ouzo (ne sadrži kalkone), jedan uzorak
- I ouzo (ne sadrži kalkone), jedan uzorak
- J anis (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu
- K „pastis” (ne sadrži kalkone), slijepa proba u duplikatu

#### IX. ŽUMANJAK. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ŽUMANJKA U ALKOHOLNIM PIĆIMA – FOTOMETRIJSKA METODA

##### 1. Svrha

Ova je metoda prikladna za određivanje koncentracije žumanjka u rasponu od 40 do 250 g/L u liker u od jaja i liker u s jajetom.

##### 2. Referentni standardi

ISO 3696:1897 Voda za upotrebu u analitičkom laboratoriju – Specifikacije i metode ispitivanja.

##### 3. Načelo rada

Fosfori spojevi topivi u etanolu koji se nalaze u žumanjku ekstrahiraju se i analiziraju fotometrijski kao molibdatni fosfori kompleksi.

##### 4. Reagensi i materijali

- 4.1. Dvostruko destilirana voda
- 4.2. Dijatomejska zemlja
- 4.3. Etanol 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.4. 15 %-tna otopina magnezijeva acetata (CAS 16674-78-5)
- 4.5. 10 %-tna sumporna kiselina (CAS 7664-93-9)

- 4.6. 1 N sumporne kiseline.
- 4.7. 0,16 g/L otopina kalijeva dihidrogen fosfata (CAS 778-77-0),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 4.8. Reagens za određivanje fosfata:  
otopi se 20 g amonijeva molibdata (CAS 12054-85-2),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  u 400 ml vode na 50 °C;  
u drugoj se posudi otopi 1 g amonijeva vanadata (CAS 7803-55-6),  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , u 300 ml vruće vode, pusti da se ohladi, a zatim se doda 140 ml koncentrirane dušične kiseline (CAS 7697-37-2). Ohlađene se otopine pomiješaju u odmjernoj tikvici od 1 000 ml i nadopune se do oznake od 1 000 ml.

## 5. Aparatura i oprema

- 5.1. Konusna tikvica od 100 ml
- 5.2. Ultrazvučna kupelj (ili magnetski mješač)
- 5.3. Odmjerna tikvica od 100 ml
- 5.4. Vodena kupelj na 20 °C
- 5.5. Filtar (Whatman br. 4 ili ekvivalentni)
- 5.6. Porculanski (ili platinasti) lončić
- 5.7. Kipuća vodena kupelj
- 5.8. Vruća metalna ploča
- 5.9. Mufolna peć
- 5.10. Odmjerna tikvica od 50 ml
- 5.11. Odmjerna tikvica od 20 ml
- 5.12. Spektrofotometar podešen na 420 nm
- 5.13. Kiveta od 1 cm.

## 6. Uzorci

Uzorci se skladište na sobnoj temperaturi prije analize.

## 7. Postupak

- 7.1. Priprema uzorka
  - 7.1.1. U konusnu tikvicu od 100 ml odvagane se 10 g uzorka (5.1.).
  - 7.1.2. Postupno se uz miješanje doda 70 ml etanola (4.3.) u malim obrocima i stavi u ultrazvučnu kupelj (5.2.) na 15 minuta (ili se mješavina miješa magnetskim mješačem (5.2.) 10 minuta na sobnoj temperaturi).
  - 7.1.3. Sadržaj tikvice se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml (5.3.) s ispicima etanola (4.3.). Do kalibracijske oznake dopuni se etanolom (4.3.), a tikvice se stave u vodenu kupelj na 20 °C (5.4.). Do kalibracijske oznake se dopuni na 20 °C.
  - 7.1.4. Doda se manja količina dijatomejske zemlje (4.2.) i filtrira (5.5.) te se odbaci prvih 20 ml.
  - 7.1.5. Prelije se 25 ml filtrata u porculanski (ili platinasti) lončić (5.6.). Filtrat se tada mora koncentrirati blagim isparavanjem u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) uz dodatak 5 ml 15 %-tne otopine magnezijeva acetata (4.4.).
  - 7.1.6. Lončići se stave na vruću metalnu ploču (5.8.) i zagrijavaju do trenutka kad se osuše.
  - 7.1.7. Ostatak se spali zagrijavanjem do užarenosti na 600 °C u mufolnoj peći (5.9.) dok pepeo ne pobijeli, najmanje sat i pol vremena, ali se može ostaviti i preko noći.
  - 7.1.8. Pokupi se pepeo s 10 ml 10 %-tne sumporne kiseline (4.5.) i prebaci s ispicima destilirane vode (4.1.) u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.10.) te nadopuni do oznake destiliranom vodom na sobnoj temperaturi (4.1.). Alikvot od 5 ml ove otopine pepela koristi se za pripremu otopine uzorka za fotometrijsko određivanje fosfata.
- 7.2. Fotometrijsko određivanje fosfata
  - 7.2.1. Poredbena otopina
    - 7.2.1.1. Stavi se 10 ml 10 %-tne sumporne kiseline (4.5.) u odmjernu tikvicu od 50 ml (5.10.) i nadopuni do oznake destiliranom vodom (4.1.).

- 7.2.1.2. Alikvotu od 5 ml ove otopine (7.2.1.1.) u odmjerne tikvici od 20 ml (5.11.) doda se 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 2 ml fosfatnog reagensa (4.8.) te dopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).
- 7.2.1.3. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta.
- 7.2.1.4. Kiveta od 1 cm (5.13.) napuni se ovom poredbenom otopinom.
- 7.2.2. Otopina uzorka
- 7.2.2.1. Alikvotu od 5 ml otopine pepela (7.1.8.), u odmjerne tikvici od 20 ml (5.11.), doda se 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 2 ml fosfatnog reagensa (4.8.) te nadopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).
- 7.2.2.2. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta.
- 7.2.2.3. Žuta otopina koja je nastala odmah se analizira spektrofotometrijski (5.12.) u kiveti od 1 cm (5.13.) na 420 nm u odnosu na poredbenu otopinu (7.2.1.4.).
- 7.2.3. Kalibracijska krivulja
- 7.2.3.1. Za dobivanje kalibracijske krivulje doda se 2 ml alikvota fosfatnog reagensa (4.8.) u odmjerne tikvice od 20 ml (5.11.), od kojih svaka sadrži 1 ml 1 N sumporne kiseline (4.6.) i 0, 2, 4, 6, 8 i 10 ml otopine kalijeva dihidrogenfosfata (4.7.) te dopuni do 20 ml destiliranom vodom (4.1.).
- 7.2.3.2. Začepi se labavo umetnutim čepom, promućka te grije u kipućoj vodenoj kupelji (5.7.) 10 minuta, a zatim hladi u vodenoj kupelji na 20 °C (5.4.) tijekom 20 minuta te analizira spektrofotometrijski (5.12.) u kiveti od 1 cm (5.13.) na 420 nm u odnosu na poredbenu otopinu (7.2.1.4.).
- 7.2.3.3. Izrada kalibracijske krivulje:

otopina dihidrogenfosfata (ml)	0	2	4	6	8	10
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

## 8. Izražavanje rezultata

Sadržaj žumanjka u g/L izračuna se pomoću sljedeće formule:

$$\text{g/l egg yolk} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{density}}{E/40}$$

gdje je:

110. faktor konverzije za ukupni P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> u g u 100 g žumanjka
- mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vrijednost utvrđena kalibracijskom krivuljom
- gustoća masa po jediničnom volumenu (g/ml) likera na bazi žumanjka na 20 °C
- E masa likera na bazi žumanjka u g
- 40 faktor razrjeđenja za alikvot od 5 ml otopine pepela.

## 9. Svojstva metode (preciznost)

Statistički rezultati međulaboratorijskog ispitivanja:

sljedeća tablica daje vrijednosti za žumanjak.

Sljedeći su podaci dobiveni iz međunarodnog ispitivanja svojstava metode koje je provedeno u skladu s međunarodno dogovorenim postupcima.

Godina međulaboratorijskog ispitivanja:	1998.
Broj laboratorija:	24
Broj uzoraka:	5
Analit:	žumanjak



Uzorci	A	B	C	D	E
Broj laboratorija zadržan nakon eliminacije netipičnih vrijednosti	19	20	22	20	22
Broj odstupanja (laboratorija)	3	4	2	4	2
Broj prihvaćenih rezultata	38	40	44	40	44
Srednja vrijednost	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Standardno odstupanje ponovljivosti ( $S_t$ ) g/L	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relativno standardno odstupanje ponovljivosti ( $RSD_t$ ) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Granica ponovljivosti ( $r$ ) g/L	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Standardno odstupanje obnovljivosti ( $S_R$ ) g/L	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relativno standardno odstupanje obnovljivosti ( $RSD_R$ ) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Granica obnovljivosti ( $R$ ) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

## Vrste uzoraka

- A Advocaat, slijepe probe u duplikatu
- B Advocaat, slijepe probe u duplikatu
- C Advocaat, slijepe probe u duplikatu
- D Advocaat (razrijeđen), razdijeljene razine (\*)
- E Advocaat, slijepe probe u duplikatu