

VERORDNUNG (EG) Nr. 2091/2002 DER KOMMISSION
vom 26. November 2002
zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2870/2000 mit gemeinschaftlichen Referenzanalysemethoden für Spirituosen

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 1576/89 des Rates vom 29. Mai 1989 zur Festlegung der allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Österreichs, Finnlands und Schwedens, insbesondere auf Artikel 4 Absatz 8,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In der Verordnung (EG) Nr. 2870/2000 der Kommission vom 19. Dezember 2000 mit gemeinschaftlichen Referenzanalysemethoden für Spirituosen⁽²⁾ sind im Anhang die entsprechenden Methoden festgelegt.
- (2) Vier Analysemethoden für die Bestimmung von Anethol in Spirituosen mit Anis, von Glycyrrhizinsäure und Chalkonen in Pastis sowie von Eigelb in Likör mit Eizusatz und in Eierlikör sind im Rahmen einer von der Kommission unterstützten Forschungsaktion nach international anerkannten Kriterien validiert worden.

(3) Diese vier Methoden können als gemeinschaftliche Referenzmethoden anerkannt werden und sind dem Anhang der Verordnung (EG) Nr. 2870/2000 anzufügen.

(4) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Anwendungsausschusses für Spirituosen —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Verordnung (EG) Nr. 2870/2000 wird wie folgt geändert:

1. In der Inhaltsangabe des Anhangs werden die Angaben „(p.m.)“ bei den Kapiteln V, VI, VII und IX gestrichen.
2. Die Kapitel V, VI, VII und IX im Anhang der vorliegenden Verordnung werden nach Kapitel III angefügt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am siebten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedsstaat.

Brüssel, den 26. November 2002

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. L 160 vom 12.6.1989, S. 1.

⁽²⁾ ABl. L 333 vom 29.12.2000, S. 20.

ANHANG

V. ANETHOL. BESTIMMUNG VON TRANS-ANETHOL IN SPIRITUOSEN DURCH GASCHROMATOGRAPHIE

1. Anwendungsbereich

Diese Methode eignet sich für die Bestimmung von trans-Anethol in Spirituosen mit Anis durch Kapillar-Gaschromatographie.

2. Normen

ISO 3696: 1987 Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren.

3. Prinzip

Die trans-Anethol-Konzentration von Spirituosen wird durch Gaschromatographie (GC) bestimmt. Die gleiche Menge eines internen Standards, z. B. 4-Allylanisol (Estragol), wird der Probe und einer trans-Anethol-Referenzlösung mit bekannter Konzentration zugegeben, wenn Estragol nicht natürlicherweise in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist; beide werden mit einer 45%igen Ethanollösung verdünnt und direkt in das GC-System eingespritzt. Bei Likören mit hohem Zuckergehalt muss vor der Probenvorbereitung und Analyse eine Extraktion vorgenommen werden.

4. Reagenzien und Material

Bei der Analyse sind ausschließlich Reagenzien mit einer Reinheit von mindestens 98 % zu verwenden. Es sollte Wasser von mindestens Grad 3 gemäß ISO 3696 verwendet werden.

Referenzsubstanzen sollten gekühlt (4 °C) und lichtgeschützt in Aluminiumbehältern oder in Braunglas-Standflaschen aufbewahrt werden. Die Stopfen sollten mit einer Aluminiumdichtung versehen sein. Trans-Anethol muss vor der Verwendung aus seinem kristallinen Zustand „aufgetaut“ werden, dabei darf die Temperatur aber nie 35 °C übersteigen.

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

4.2. 1-Methoxy-4-(1-propenyl)benzol; (trans-Anethol) (CAS 4180-23-8)

4.3. 4-Allylanisol, (Estragol) (CAS 140-67-0), empfohlener interner Standard (IS)

4.4. Ethanol 45 % vol.

560 g destilliertes Wasser zu 378 g Ethanol 96 % vol. zugeben.

4.5. Zubereitung von Standardlösungen

Alle Standardlösungen sind bei Zimmertemperatur (15-35 °C) und lichtgeschützt in Aluminiumbehältern oder in Braunglas-Standflaschen aufzubewahren. Der Stopfen sollte mit einer Aluminiumdichtung versehen sein.

Da trans-Anethol und 4-Allylanisol in Wasser praktisch unlöslich sind, müssen sie vor der Zugabe von 45%igem Ethanol in etwas 96%igem Ethanol (4.1) gelöst werden.

Die Stammlösungen sind jede Woche frisch anzusetzen.

4.5.1. Standardlösung A

Trans-Anetholstammlösung (Konzentration: 2 g/l):

40 mg trans-Anethol (4.2) in einem 20-ml-Messkolben einwiegen (oder 400 mg in 200 ml usw.). Etwas 96%iges Ethanol (4.1) zugeben und mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke auffüllen, gründlich mischen.

4.5.2. Interne Standardlösung B

Stammlösung des internen Standards, z. B. Estragol (Konzentration: 2 g/l)

40 mg Estragol (4.3) in einem 20-ml-Messkolben einwiegen (oder 400 mg in 200 ml usw.). Etwas 96%iges Ethanol (4.1) zugeben und mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke auffüllen, gründlich mischen.

4.5.3. Lösungen zur Überprüfung der Linearreaktion des FID

Die Linearreaktion des FID muss für die Analyse bei verschiedenen Konzentrationen von trans-Anethol in Spirituosen (0 bis 2,5 g/l) überprüft werden. Im Analyseverlauf werden die zu analysierenden Blindproben der Spirituosen 10-fach verdünnt. Für die in der Methode beschriebenen Analysebedingungen werden Stammlösungen mit Konzentrationen von 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 und 0,25 g/l trans-Anethol in der zu analysierenden Probe wie folgt zubereitet: 0,5, 1, 1,5, 2 und 2,5 ml der Stammlösung A (4.5.1) in einzelne 20-ml-Messkolben pipettieren; in jeden Kolben 2 ml der internen Standardlösung B (4.5.2) zugeben und mit Ethanol 45 % vol. (4.4) zur Marke auffüllen, gründlich mischen.

Als 0 g/l-Lösung wird die Blindlösung (8.4) verwendet.

4.5.4. Standardlösung C

2 ml Standardlösung A (4.5.1) in einen 20-ml-Messkolben pipettieren, 2 ml interne Standardlösung B (4.5.2) zugeben und mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke auffüllen, gründlich mischen.

5. Geräte und Ausrüstung

5.1. Kapillar-Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) und Integrator oder anderem Datenverarbeitungssystem, das Peakhöhen oder -flächen messen kann, sowie mit automatischen Probenaufgabesystem oder der erforderlichen Ausrüstung für manuelle Probeneinspritzung.

5.2. Split/splitless-Injektor

5.3. Kapillarsäule, z. B.:

Länge: 50 m,

Innendurchmesser: 0,32 mm,

Schichtdicke: 0,2 µm,

Stationäre Phase: FFAP — modifiziertes TPA Polyethylenglykol vernetztes poröses Polymer.

5.4. Übliche Laborausrüstung: Glaslaborgeräte, Genauigkeitsklasse A, Analysenwaage (Genauigkeit: ± 0,1 mg).

6. Chromatographiebedingungen

Die Art und Größe der Säule sowie die GC-Bedingungen sollten so gewählt werden, das Anethol und der interne Standard voneinander und von allen Störsubstanzen getrennt werden. Typische Bedingungen für die unter Nummer 5.3 als Beispiel angeführte Säule sind:

6.1. Trägergas: Helium, Analysenqualität

6.2. Strömungsgeschwindigkeit: 2 ml/min

6.3. Injektortemperatur: 250 °C

6.4. Detektortemperatur: 250 °C

6.5. Ofentemperatur: isotherm, 180 °C, Laufzeit 10 Minuten

6.6. Einspritzvolumen: 1 µl, Split: 1:40

7. Proben

Proben sollten bei Zimmertemperatur und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

8. Ausführung

8.1. Untersuchung der Probe auf Estragol

Um sicherzustellen, dass die Probe kein natürliches Estragol enthält, sollte eine Blindprobe ohne Zugabe eines internen Standards analysiert werden. Wenn die Probe natürliches Estragol enthält, ist ein anderer interner Standard zu verwenden (z. B. Methanol).

2 ml der Probe werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, mit Ethanol 45 % vol. (4.4) zur Marke aufgefüllt und gründlich gemischt.

8.2. Zubereitung unbekannter Proben

2 ml der Probe werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, 2 ml interne Standardlösung B (4.5.2) zugegeben, mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke aufgefüllt und gründlich gemischt.

8.3. Blindlösung

2 ml interne Standardlösung B (4.5.2) werden in einen 20-ml-Messkolben pipettiert, mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke aufgefüllt und gründlich gemischt.

8.4. Linearitätsprüfung

Vor Beginn der Analyse sollte die Linearität des FID überprüft werden, indem jede der Linearitätsstandardlösungen (4.5.3) dreimal hintereinander analysiert wird.

Auf der Grundlage der Integrator-Peakflächen oder Peakhöhen für jede Injektion wird ein Graph ihrer Mutterlösungskonzentration in g/l gegen das Verhältnis R für jede Lösung aufgezeichnet.

$R = \text{trans-Anethol-Peakhöhe oder -fläche} / \text{Estragol-Peakhöhe oder -fläche}$.

Dabei sollte sich eine lineare Kurve ergeben.

8.5. Bestimmung

Die Blindlösung (8.3) wird eingespritzt, darauf die Standardlösung C (4.5.4) und darauf einer der Linearitätsstandards (4.5.3), der als Qualitätskontrollprobe fungieren wird (diese kann unter Berücksichtigung der wahrscheinlichen Konzentration von trans-Anethol in der unbekannt Probe gewählt werden), darauf folgen fünf unbekannte Probenlösungen (8.2). Zur Gewährleistung der analytischen Stabilität ist nach jeweils fünf unbekannt Probenlösungen eine Linearitätsprobe (Qualitätskontrolle) einzufügen.

9. Berechnung des Reaktionsfaktors

Die Peakflächen (mit einem Integrator oder einem anderen Datenverarbeitungssystem) oder die Peakhöhen (manuelle Integration) für Peaks von trans-Anethol und internem Standard werden gemessen.

9.1. Berechnung des Reaktionsfaktors (RF_i)

Der Reaktionsfaktor wird wie folgt berechnet:

$$RF_i = (C_i / \text{Fläche oder Höhe}_i) * (\text{Fläche oder Höhe}_{is} / C_{is})$$

Dabei ist:

C_i die trans-Anethol-Konzentration in der Standardlösung A (4.5.1)

C_{is} die Konzentration des internen Standards in der Standardlösung B (4.5.2)

Fläche_i die Fläche (oder Höhe) des trans-Anethol-Peaks

Fläche_{is} die Fläche (oder Höhe) des internen Standard-Peaks

RF_i wird auf der Grundlage der fünf Proben von Lösung C (4.5.4) berechnet.

9.2. Analyse der Linearitätsprüflösungen

Die Linearitätsprüflösungen (4.5.3) werden eingespritzt.

9.3. Analyse der Probe

Die Lösung der unbekannt Probe (8.2) wird eingespritzt.

10. Berechnung der Ergebnisse

Die trans-Anethol-Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c_i = C_{is} * (\text{Fläche oder Höhe}_i / \text{Fläche oder Höhe}_{is}) * RF_i$$

Dabei ist:

c_i die unbekannte trans-Anethol-Konzentration

C_{is} (4.5.2) die Konzentration des internen Standards in der unbekannt Probe (4.5.2)

Fläche oder Höhe_i die Fläche oder Höhe des trans-Anethol-Peaks

Fläche oder Höhe_{is} die Fläche oder Höhe des internen Standard-Peaks

RF_i der (gemäß Nummer 9.1 berechnete) Reaktionskoeffizient

Die trans-Anethol-Konzentration wird mit einer Dezimalstelle in Gramm pro Liter ausgedrückt.

11. Qualitätssicherung und -kontrolle

Die Chromatogramme sollten so ausfallen, dass Anethol und der interne Standard voneinander und von allen Störsubstanzen getrennt sind. Der RF_i -Wert wird auf der Grundlage der Ergebnisse der fünf Injektionen von Lösung C (4.5.4) berechnet. Liegt der Variationskoeffizient ($CV\% = (\text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}) \cdot 100$) innerhalb von $\pm 1\%$, so kann der RF_i -Durchschnittswert akzeptiert werden.

Die obige Berechnung sollte zur Berechnung der Konzentration von trans-Anethol in der Probe verwendet werden, die für die Qualitätskontrolle auf der Grundlage der Linearitätskontrolllösungen (4.5.3) gewählt wurde.

Liegen die durchschnittlichen berechneten Ergebnisse aus der Analyse der Linearitätslösung, die als interne Qualitätskontrollprobe (IQC) gewählt wurde, in einer Bandbreite zwischen $\pm 2,5\%$ um ihren theoretischen Wert, so können die Ergebnisse für die unbekanntenen Proben akzeptiert werden.

12. Behandlung einer Spirituosenprobe mit hohem Zuckergehalt und einer Likörprobe vor der GC-Analyse

Extraktion von Alkohol aus einer Spirituose mit hohem Zuckergehalt, um die trans-Anethol-Konzentration durch Kapillar-Gaschromatographie bestimmen zu können.

12.1. Prinzip

Einer aliquoten Menge der Likörprobe wird der interne Standard in einer Konzentration zugesetzt, die mit der des Analyten (trans-Anethol) im Likör vergleichbar ist. Dann werden Natriumphosphat Dodecahydrat und wasserfreies Ammoniumsulfat zugegeben. Die Mischung wird gründlich geschüttelt und gekühlt, wobei sich zwei Schichten bilden; die obere Alkoholschicht wird entfernt. Eine aliquote Menge dieser Alkoholschicht wird mit 45%iger Ethanollösung (4.4) verdünnt (Hinweis: Zu diesem Zeitpunkt wird kein interner Standard zugegeben, da er bereits zugegeben wurde). Die Lösung wird durch Gaschromatographie analysiert.

12.2. Reagenzien und Material

Bei der Extraktion sind nur Reagenzien mit einer Reinheit von mehr als 99 % zu verwenden.

12.2.1. Ammoniumsulfat, wasserfrei, (CAS 7783-20-2)**12.2.2. Natriumphosphat, zweibasisch, Dodecahydrat, (CAS 10039-32-4)****12.3. Geräte und Ausrüstung**

Erlenmeyerkolben, Trennkolben, Kühlschrank.

12.4. Verfahren**12.4.1. Untersuchung der Probe auf Estragol**

Um sicherzustellen, dass die Probe kein natürliches Estragol enthält, sollte eine Blindextraktion (12.6.2) und Analyse ohne Zugabe eines internen Standards durchgeführt werden. Wenn die Probe natürliches Estragol enthält, ist ein anderer interner Standard zu verwenden.

12.4.2. Extraktion

5 ml des 96%igen Ethanol (4.1) werden in einen Erlenmeyerkolben pipettiert; in diesen Kolben werden 50 mg des internen Standards (4.3) eingewogen, und 50 ml der Probe werden zugegeben. 12 g Ammoniumsulfat, wasserfrei (12.2.1) und 8,6 g zweibasisches Natriumphosphat, Dodecahydrat (12.2.2) zugeben. Den Erlenmeyerkolben verschließen.

Der Kolben wird mindestens 30 Minuten lang geschüttelt. Eine mechanische Schüttelvorrichtung kann verwendet werden, aber keine teflonbeschichteten Magnetrührer, da das Teflon einen Teil des Analyten absorbieren würde. Zugegebene Salze werden nicht vollständig gelöst.

Der mit Stopfen verschlossene Kolben wird mindestens zwei Stunden in einen Kühlschrank ($T < 5\text{ °C}$) gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit sollten sich zwei getrennte Flüssigkeitsschichten und ein fester Rückstand zeigen. Die Alkoholschicht sollte klar sein; ist dies nicht der Fall, wird der Kolben wieder in den Kühlschrank gestellt, bis eine klare Trennung erreicht ist.

Wenn die Alkoholschicht klar ist, wird — ohne die wässrige Schicht zu stören — vorsichtig eine aliquote Menge (z. B. 10 ml) entnommen und in eine Braunglasampulle überführt. Die Ampulle wird fest verschlossen.

12.4.3. Vorbereitung der zu analysierenden extrahierten Probe

Den Extrakt (12.4.2) Zimmertemperatur erreichen lassen.

2 ml der Alkoholschicht der extrahierten Probe in einen 20-ml-Messkolben pipettieren, mit 45%igem Ethanol (4.4) zur Marke auffüllen und gründlich mischen.

12.5. Bestimmung

Das Verfahren gemäß Nummer 8.5 durchführen.

12.6. Berechnung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden nach folgender Formel berechnet:

$$C_i = (m_{is}/V) * (Fläche_i/Fläche_{is}) * Rf_i$$

Dabei ist:

m_{is} das Gewicht des verwendeten (12.4.2) internen Standards (4.3) (in mg)

V das Volumen der unbekannt Probe (50 ml)

RF_i der Reaktionsfaktor (9.1.)

Fläche_i die Fläche des trans-Anethol-Peaks

Fläche_{is} die Fläche des internen Standard-Peaks

Die Ergebnisse werden mit einer Dezimalstelle in Gramm pro Liter ausgedrückt.

12.7. Qualitätssicherung und -kontrolle

Das Verfahren gemäß Nummer 11 durchführen.

13. Leistungsmerkmale der Methode (Präzision)

Statistische Ergebnisse des Ringversuchs:

In den nachstehenden Tabellen sind die Werte für Anethol zusammengefasst.

Bei einem internationalen Ringversuch ergaben sich nach einem international abgestimmten Verfahren:

Jahr der Ringversuchs	1998
Anzahl Laboratorien	16
Anzahl Proben	10
Analyt	Anethol

Pastis:

Proben	A	B	C	D	E	F
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	15	15	15	13	16	16
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	1	1	1	3	—	—
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	30	30	30	26	16	16
Mittelwert g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Wiederholstandardabweichung (S_w) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_w) (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Wiederholgrenze (r) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Vergleichstandardabweichung (S_R) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Relative Vergleichstandardabweichung (RSD_R) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Vergleichgrenze (R) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Art der Proben:

A Pastis, Blindduplikate

B Pastis, Blindduplikate

C Pastis, Blindduplikate

- D Pastis, Blinnduplikate
 E Pastis, Einzelprobe
 F Pastis, Einzelprobe

Andere Spirituosen mit Anis:

Proben	G	H	I	J
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	16	14	14	14
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	—	2	1	1
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	32	28	28	28
Mittelwert g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Wiederholstandardabweichung (S_r) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Wiederholgrenze (r) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Vergleichstandardabweichung (S_R) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Relative Vergleichstandardabweichung (RSD_R) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Vergleichgrenze (R) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Art der Proben:

- G Ouzo, Splitwerte (*)
 H Anis, Blinnduplikate
 I Likör mit Anis, Duplikate
 J Likör mit Anis, Duplikate

VI. GLYCYRRHIZINSÄURE. BESTIMMUNG VON GLYCYRRHIZINSÄURE DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

1. Anwendungsbereich

Diese Methode eignet sich für die Bestimmung von Glycyrrhizinsäure in Spirituosen mit Anis durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Nach der Verordnung (EWG) Nr. 1576/89 müssen Spirituosen mit Anis, die die Bezeichnung „Pastis“ tragen, einen Glycyrrhizinsäuregehalt von 0,05 g/l bis 0,5 g/l aufweisen.

2. Normen

ISO 3696: 1987 Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren.

3. Prinzip

Die Glycyrrhizinsäurekonzentration wird durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit UV-Detektor bestimmt. Eine Standardlösung und die Probe werden filtriert und getrennt direkt in das HPLC-System eingespritzt.

4. Reagenzien und Material

Bei der Analyse sind ausschließlich Reagenzien von HPLC-Qualität, reines Ethanol und Wasser Grad 3 gemäß ISO 3696 zu verwenden.

- 4.1. Ethanol 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.2. Ammoniumglycyrrhizinat, $C_{42}H_{62}O_{16} \cdot NH_3$ (Ammoniumsalz der Glycyrrhizinsäure)
(MG 839,98) (CAS 53956-04-0): Reinheit mindestens 90 %.
(MG Glycyrrhizinsäure 822,94)
- 4.3. Eisessig, CH_3COOH (CAS 64-19-7)
- 4.4. Methanol, CH_3OH (CAS 67-56-1)
- 4.5. Ethanol 50 % vol.
Herstellung von 1 000 ml bei 20 °C:
— 521 ml Ethanol 96 % vol. (4.1),
— 511 ml Wasser (2.0).
- 4.6. Zubereitung der HPLC-Elutionslösungen
 - 4.6.1. Elutionslösung A (Beispiel):
80 Volumteile Wasser (2.0)
20 Volumteile Essigsäure (4.3).
Das Elutionsmittel wird fünf Minuten lang entgast.
Hinweis: Wenn das verwendete Wasser nicht mikrofiltriert wurde, sollte das zubereitete Elutionsmittel durch ein Filter für organische Lösungsmittel mit einer Porengröße von höchstens 0,45 µm filtriert werden.
 - 4.6.2. Elutionslösung B
Methanol (4.4)
- 4.7. Zubereitung von Standardlösungen
Alle Standardlösungen müssen nach zwei Monaten frisch angesetzt werden.
 - 4.7.1. Referenzlösung C
25 mg Ammoniumglycyrrhizinat (4.2) werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Etwas Ethanol 50 % vol. (4.5) zugeben und das Ammoniumglycyrrhizinat auflösen. Wenn es gelöst ist, wird mit Ethanol 50 % vol. (4.5) zur Marke aufgefüllt.
Durch ein Filter für organische Lösungsmittel filtrieren.
 - 4.7.2. Standardlösungen (zur Überprüfung der Linearität der Reaktion der Instrumente)
Zur Herstellung einer 1,0-g/l-Stammlösung werden 100 mg Ammoniumglycyrrhizinat (4.2) auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Messkolben eingewogen. Etwas Ethanol 50 % vol. (4.5) zugeben und das Ammoniumglycyrrhizinat auflösen. Wenn es gelöst ist, wird mit Ethanol 50 % vol. (4.5) zur Marke aufgefüllt.
Mindestens vier weitere Lösungen von 0,05, 0,1, 0,25 und 0,5 g/l Ammoniumglycyrrhizinat herstellen: 5, 10, 25 bzw. 50 ml der 1,0-g/l-Stammlösung in einzelne 100-ml-Messkolben pipettieren, mit Ethanol 45 % vol. (4.4) zur Marke auffüllen und gründlich mischen.
Alle Lösungen durch ein Filter für organische Lösungsmittel filtrieren.
5. **Geräte und Ausrüstung**
 - 5.1. Trennsystem
 - 5.1.1. Hochleistungsflüssigchromatograph
 - 5.1.2. Pumpsystem zur Erzielung und Aufrechterhaltung einer konstanten oder programmierten Durchflussmenge mit hoher Genauigkeit
 - 5.1.3. Detektorsystem durch Spektralphotometrie im UV-Bereich, einstellbar auf 254 nm
 - 5.1.4. Lösungsmittelentgaser
 - 5.2. Computergestützter Integrator oder Schreiber, dessen Leistungsfähigkeit mit den übrigen Geräten kompatibel ist

- 5.3. Säule (Beispiel):
 Werkstoff: rostfreier Stahl oder Glas
 Innendurchmesser: 4-5 mm
 Länge: 100-250 mm
 Stationäre Phase: octadecylmodifiziertes (C18) Kieselgel, vorzugsweise kugelförmig, mit einer max. Korngröße von 5 µm.
- 5.4. Laborgeräte
- 5.4.1. Analysenwaage, Genauigkeit 0,1 mg
- 5.4.2. Laborglasgeräte, Genauigkeitsklasse A
- 5.4.3. Mikromembran-Filtervorrichtung für kleine Volumina

6. Chromatographiebedingungen

- 6.1. Elutionsmerkmale: (Beispiel)
 — Förderrate: 1 ml/min.
 — Lösungsmittel A = 30 %
 — Lösungsmittel B = 70 %
- 6.2. Detektor:
 — UV = 254 nm

7. Verfahren

- 7.1. Vorbereitung der Spirituosenprobe
 Erforderlichenfalls durch ein Filter für organische Lösungsmittel filtrieren (Porengröße: 0,45 µm).
- 7.2. Bestimmung
 Nach Stabilisierung der Chromatographiebedingungen
 — 20 µl der Referenzlösung C (4.7.1) einspritzen
 — 20 µl der Probenlösung einspritzen.
 — Die beiden Chromatogramme vergleichen. Die Glycyrrhizinsäure-Peaks nach ihren Retentionszeiten bestimmen. Ihre Flächen (oder Höhen) werden gemessen, und die Konzentration in g/l wird bis auf zwei Dezimalstellen genau mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

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

Dabei ist:

- c die Konzentration der in der untersuchten Spirituose enthaltenen Glycyrrhizinsäure in Gramm je Liter,
 C die Konzentration des in der Referenzlösung enthaltenen Ammoniumglycyrrhizinats in Gramm je Liter,
 H die Fläche (oder Höhe) des Glycyrrhizinsäurepeaks der Referenzlösung,
 h die Fläche (oder Höhe) des Peaks der in der untersuchten Spirituose enthaltenen Glycyrrhizinsäure,
 P die Reinheit der Referenzsubstanz Ammoniumglycyrrhizinat (in %),
 823 die Molmasse von Glycyrrhizinsäure,
 840 die Molmasse von Ammoniumglycyrrhizinat.

8. Leistungsmerkmale der Methode (Präzision)

Statistische Ergebnisse des Ringversuchs:

In der nachstehenden Tabelle sind die Werte für Glycyrrhizinsäure zusammengefasst.

Bei einem internationalen Ringversuch ergaben sich nach einem international abgestimmten Verfahren:

Jahr des Ringversuchs	1998
Anzahl Laboratorien	16
Anzahl Proben	5
Analyt	Glycyrrhizinsäure

Proben	A	B	C	D	E
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	13	14	15	16	16
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	3	2	1	—	—
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	26	28	30	32	32
Mittelwert g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Wiederholstandardabweichung (S_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_r) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Wiederholgrenze (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Vergleichstandardabweichung (S_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
Relative Vergleichstandardabweichung (RSD_R) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Vergleichgrenze (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Art der Proben:

- A Pastis, Blindduplikate
- B Pastis, Splitwerte (*)
- C Pastis, Blindduplikate
- D Pastis, Blindduplikate
- E Pastis, Blindduplikate

VII. CHALKONE. HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE ZUM NACHWEIS VON CHALKONEN IN PASTIS

1. Geltungsbereich

Mit dieser Methode kann untersucht werden, ob Spirituosen mit Anis Chalkone enthalten oder nicht. Chalkone sind natürliche Farbstoffe aus der Familie der im Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*) vorkommenden Flavonoide.

Spirituosen mit Anis dürfen nur dann als „Pastis“ bezeichnet werden, wenn sie Chalkone enthalten. (Verordnung (EWG) Nr. 1576/89).

2. Normen

ISO 3696: 1987 Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren.

3. Prinzip

Eine Referenzsüßholzextraktlösung wird hergestellt. Durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit UV-Detektor wird untersucht, ob Chalkone enthalten sind oder nicht.

4. Reagenzien und Material

Bei der Analyse sind ausschließlich Reagenzien von HPLC-Qualität, Ethanol 96 % vol. und Wasser Grad 3 gemäß ISO 3696 zu verwenden.

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

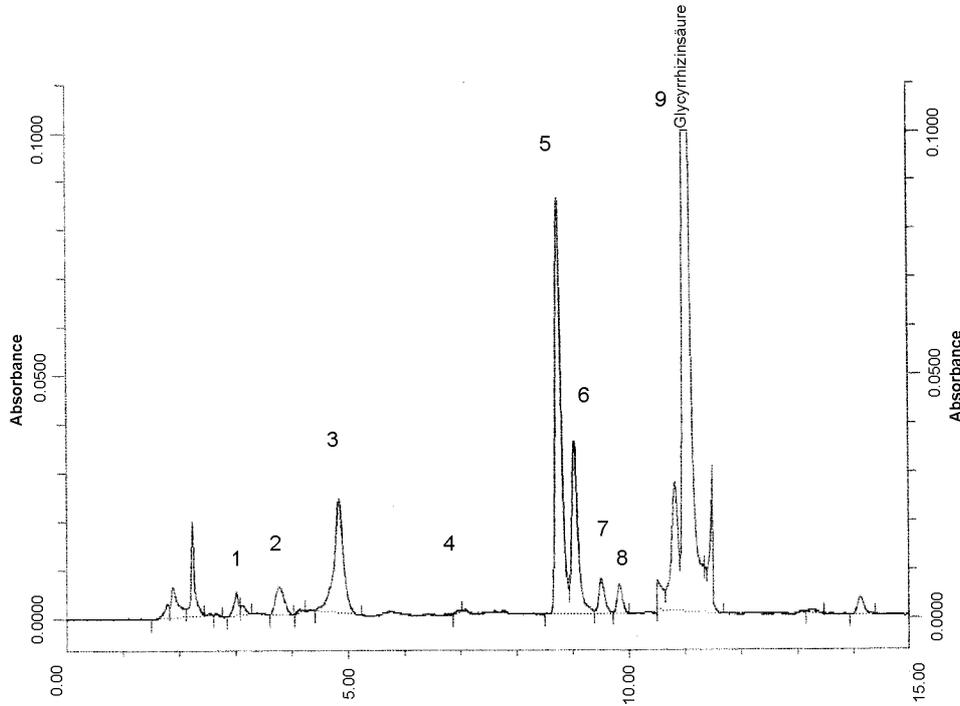
- 4.3. Referenzsubstanz: Glycyrrhiza glabra: Lakritze, „Süßholz“.
Grob zermahlenes Süßholz (Glycyrrhiza glabra). Durchschnittliche Größe der stäbchenförmigen Teilchen: Länge: 10-15 mm; Dicke: 1-3 mm
- 4.4. Natriumacetat, CH₃COONa, (CAS 127-09-3)
- 4.5. Eisessig, CH₃COOH, (CAS 64-19-7)
- 4.6. Zubereitung der Lösungen
 - 4.6.1. Ethanol 50 % vol.
Zur Herstellung von 1 000 ml bei 20 °C:
— 96 % vol. Ethanol (4.1): 521 ml
— Wasser (2.0): 511 ml
 - 4.6.2. Lösungsmittel A: Acetonitril
Acetonitril (4.2) HPLC-Qualität.
Entgasen.
 - 4.6.3. Lösungsmittel B: 0,1 M Natriumacetatpufferlösung, pH-Wert 4,66
8,203 g Natriumacetat (4.4) werden in einen Messkolben eingewogen, es werden 6,005 g Eisessig (4.5) zugegeben und mit Wasser (2) auf 1 000 ml aufgefüllt.
5. **Herstellung des Referenzextrakts von Glycyrrhiza glabra (4.3)**
 - 5.1. 10 g zerkleinertes Süßholz (Glycyrrhiza glabra) (4.3) werden abgewogen und in einen Destillierkolben gegeben.
— 100 ml Ethanol 50 % vol. (4.6.1) werden zugesetzt.
— Es wird eine Stunde lang unter Rücklauf destilliert.
— Filtrieren.
— Das Filtrat aufbewahren.
 - 5.2. Den Süßholzextrakt aus dem Filter nehmen.
— In einen Destillierkolben geben.
— 100 ml Ethanol, 50 % vol. (4.6.1) werden zugesetzt.
— Es wird eine Stunde lang unter Rücklauf destilliert.
— Filtrieren. Das Filtrat aufbewahren.
 - 5.3. Die Extraktion des Süßholzes ist dreimal hintereinander durchzuführen.
 - 5.4. Die drei Filtrate werden zusammengeführt.
 - 5.5. Die Lösungsmittelphase (von 5.4) auf einem Rotationsverdampfer verdampfen.
 - 5.6. Den gewonnenen Extrakt (von 5.5) mit Hilfe von 100 ml Ethanol, 50 % vol., (4.6.1) aufnehmen.
6. **Geräte und Ausrüstung**
 - 6.1. Trennsystem
 - 6.1.1. Hochleistungsflüssigchromatograph
 - 6.1.2. Pumpsystem zur Erzielung und Aufrechterhaltung einer konstanten oder programmierten Durchflussmenge bei hohem Druck
 - 6.1.3. Detektorsystem durch Spektralphotometrie im UV-/sichtbaren Bereich, einstellbar auf 254 nm und 370 nm
 - 6.1.4. Lösungsmittelentgaser
 - 6.1.5. Säulenofen, auf eine Temperatur von 40 °C ± 0,1 °C einstellbar
 - 6.2. Computergestützter Integrator oder Schreiber, dessen Leistungsfähigkeit mit den übrigen Geräten kompatibel ist.

- 6.3. Säule
- Werkstoff: rostfreier Stahl oder Glas
- Innendurchmesser: 4-5 mm
- Stationäre Phase: octadecylmodifiziertes (C 18) Kieselgel mit einer max. Korngröße von 5 µm (modifizierte Phase).
- 6.4. Übliche Laborgeräte, insbesondere:
- 6.4.1. Analysenwaage (Genauigkeit: ± 0,1 mg)
- 6.4.2. Destillationsapparatur unter Rücklauf, beispielsweise bestehend aus:
- einem 250-ml-Rundkolben mit Normschliff,
 - einem Rückflusskühler (30 cm Länge) und
 - einer Wärmevorrichtung (jede pyrogene Reaktion der extraktiven Stoffe ist durch eine geeignete Vorrichtung zu vermeiden).
- 6.4.3. Rotationsverdampfer
- 6.4.4. Filtriervorrichtung (z. B. Büchner-Trichter)
- 6.5. Chromatographiebedingungen (Beispiel)
- 6.5.1. Elutionsmerkmale der Lösungsmittel A (4.6.2) und B (4.6.3):
- Gradient 20/80 (v/v) auf 50/50 (v/v) in 15 Minuten,
 - Gradient 50/50 (v/v) auf 75/25 (v/v) in 5 Minuten,
 - isokratisch bei 75/25 (v/v), Dauer 5 Minuten,
 - Stabilisierung der Säule zwischen zwei Einspritzungen,
 - isokratisch bei 20/80 (v/v), Dauer 5 Minuten.
- 6.5.2. Förderrate: 1 ml/min.
- 6.5.3. UV-Detektoreinstellungen:
- Für den Nachweis von Chalkonen ist der Detektor auf 370 nm einzustellen, dann für den Nachweis von Glycyrrhizinsäure auf 254 nm.
- Hinweis:* Die Änderung der Wellenlänge (von 370 nm zu 254 nm) muss 30 Sekunden vor Beginn des Elutionspeaks von Glycyrrhizinsäure vorgenommen werden.
7. **Verfahren**
- 7.1. Herstellen der Versuchsprobe
- Erforderlichenfalls durch ein Filter für organische Lösungsmittel filtrieren (Porengröße: 0,45 µm).
- 7.2. Zubereitung des restlichen Süßholzextraktes (5.6)
- Vor der Analyse ist eine 1:10-Verdünnung mit Ethanol 50 % (4.6.1) herzustellen.
- 7.3. Bestimmung
- 7.3.1. 20 µl des zubereiteten Süßholzextraktes (7.2) einspritzen. Die Analyse ist gemäß den unter Nummer 6.5 beschriebenen Chromatographiebedingungen durchzuführen.
- 7.3.2. 20 µl der Probe (7.1) einspritzen (Spirituosenprobe mit Anis). Die Analyse ist gemäß den unter Nummer 6.5 beschriebenen Chromatographiebedingungen durchzuführen.
- 7.3.3. Die beiden Chromatogramme werden verglichen. Die beiden Chromatogramme müssen im Ausgangsbereich der Chalkone sehr ähnlich sein (während des Nachweises bei 370 nm unter den beschriebenen Analysebedingungen). (s. Abbildung 1).

8. **Charakteristisches Chromatogramm von Pastis**

Abbildung 1:

Durch die beschriebene Methode erhaltenes Chromatogramm, das zeigt, dass ein „Pastis“ Chalkone enthält. Die Peaks 1-8 sind Chalkone, Peak 9 ist Glycyrrhizinsäure.



9. **Leistungsmerkmale der Methode (Präzision)**

Ergebnisse des Ringversuchs:

In der nachstehenden Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchung auf Chalkone in Pastis oder Spirituosen aufgeführt.

Bei einem internationalen Ringversuch ergaben sich nach einem international abgestimmten Verfahren folgende Daten:

Jahr der gemeinsamen Tests	1998
Anzahl Laboratorien	14
Anzahl Proben	11
Analyten	Chalkone

Proben	A	B	C	D	E	F
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	14	14	14	14	14	13
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	—	—	—	—	—	1 (*)
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	28	14	14	28	28	26
Zahl der Ergebnisse: Chalkone enthalten	28	14	14	0	28	0
Zahl der Ergebnisse: keine Chalkone enthalten	0	0	0	28	0	26
Prozentsatz richtiger Ergebnisse (%)	100	100	100	100	100	100

(*) widersprüchliche Ergebnisse bei zwei Duplikaten wegen Fehler bei der Probenahme

Proben	G	H	I	J	K
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	14	14	14	14	14
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	—	—	—	—	—
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	28	14	14	28	28
Zahl der Ergebnisse: Chalkone enthalten	0	0	0	0	0
Zahl der Ergebnisse: keine Chalkone enthalten	28	14	14	28	28
Prozentsatz richtiger Ergebnisse (%)	100	100	100	100	100

Art der Proben:

- A Pastis, Blindduplikate
- B Pastis, Einzelprobe
- C Pastis, Einzelprobe
- D „Pastis“ (ohne Chalkone), Blindduplikate
- E „Pastis“ (ohne Chalkone), Blindduplikate
- F Likör mit Anis (ohne Chalkone), Blindduplikate
- G Likör mit Anis (ohne Chalkone), Blindduplikate
- H Ouzo (ohne Chalkone), Einzelprobe
- I Ouzo (ohne Chalkone), Einzelprobe
- J Anis (ohne Chalkone), Blindduplikate
- K „Pastis“ (ohne Chalkone), Blindduplikate

IX. EIGELB. BESTIMMUNG DER EIGELBKONZENTRATION IN SPIRITUOSEN — PHOTOMETRISCHE METHODE

1. Geltungsbereich

Die Methode ist geeignet für die Bestimmung von Eigelbkonzentrationen zwischen 40 und 250 g/l in Eierlikör und Likör mit Eizusatz.

2. Normen

ISO 3696: 1897 Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren.

3. Prinzip

Die ethanollöslichen Phosphorverbindungen im Eigelb werden extrahiert und als Phosphormolybdatkomplex photometrisch bestimmt.

4. Reagenzien und Material

- 4.1. Bidestilliertes Wasser
- 4.2. Kieselgur
- 4.3. Ethanol 96 % vol. (CAS 64-17-5)
- 4.4. 15%ige Lösung von Magnesiumacetat (CAS 16674-78-5)
- 4.5. 10%ige Schwefelsäure (CAS 7664-93-9)

- 4.6. 1-N-Schwefelsäure.
- 4.7. Lösung von Kaliumdihydrogenphosphat (CAS 778-77-0), KH_2PO_4 , 0,16 g/l.
- 4.8. Reagenz für die Phosphatbestimmung:
20 g Ammoniummolybdat (CAS 12054-85-2), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ werden in 400 ml Wasser bei 50 °C gelöst.
In einem anderen Gefäß löst man 1 g Ammoniumvanadat (CAS 7803-55-6), NH_4VO_3 , in 300 ml heißem Wasser und fügt nach Abkühlung 140 ml konzentrierte Salpetersäure (CAS 7697-37-2) hinzu. Die kalten Lösungen werden in einem 1 000-ml-Messkolben vereinigt und bis zur Marke aufgefüllt.

5. Geräte und Ausrüstung

- 5.1. 100-ml-Erlenmeyerkolben
- 5.2. Ultraschallbad (oder Magnetrührer)
- 5.3. 100-ml-Messkolben
- 5.4. Wasserbad 20 °C
- 5.5. Filter (Whatman Nr. 4 oder gleichwertig)
- 5.6. Tiegel aus Porzellan (oder Platin)
- 5.7. Kochendes Wasserbad
- 5.8. Heizplatte
- 5.9. Muffelofen
- 5.10. 50-ml-Messkolben
- 5.11. 20-ml-Messkolben
- 5.12. Spektralphotometer, 420 nm.
- 5.13. Küvette, 1 cm.

6. Proben

Die Proben werden vor der Analyse bei Zimmertemperatur gelagert.

7. Verfahren

- 7.1. Vorbereitung der Probe
- 7.1.1. 10 g der Probe werden in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben (5.1) eingewogen.
- 7.1.2. In kleinen Anteilen unter Rühren nach und nach 70 ml Ethanol (4.3) zusetzen, 15 Minuten in ein Ultraschallbad (5.2) geben (oder die Mischung bei Zimmertemperatur 10 Minuten mit einem Magnetrührer (5.2) rühren).
- 7.1.3. Den Inhalt des Kolbens mit Ethanol-Spülung (4.3) in einen 100-ml-Messkolben (5.3) überführen. Bis zur Eichmarke mit Ethanol (4.3) auffüllen und die Kolben in ein Wasserbad von 20 °C (5.4) setzen. Bei 20 °C auf die Eichmarke einstellen.
- 7.1.4. Etwas Kieselgur (4.2) zugeben und filtrieren (5.5); die ersten 20 ml sind zu verwerfen.
- 7.1.5. 25 ml des Filtrats werden in einen Tiegel aus Porzellan (oder Platin) (5.6) überführt. Das Filtrat muss dann durch vorsichtiges Verdampfen im kochenden Wasserbad (5.7) unter Zusatz von 5 ml 15%iger Magnesiumacetatlösung (4.4) konzentriert werden.
- 7.1.6. Die Tiegel werden auf einer Heizplatte (5.8) erhitzt, bis sie gerade trocken sind.
- 7.1.7. Der Rückstand wird verascht und bei 600 °C in einem Muffelofen (5.9) geglüht, bis die Asche weiß ist (mindestens 1,5 Stunden oder auch über Nacht).
- 7.1.8. Die Asche wird mit 10 ml 10%iger Schwefelsäure (4.5) aufgenommen und mit Spülung von destilliertem Wasser (4.1) in einen 50-ml-Messkolben (5.10) überführt, der bei Zimmertemperatur bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt wird (4.1). Ein aliquoter Teil (5 ml) dieser Lösung wird verwendet, um die Probenlösung für die photometrische Phosphatbestimmung zuzubereiten.
- 7.2. Photometrische Phosphatbestimmung
- 7.2.1. Vergleichslösung
- 7.2.1.1. 10 ml der 10%igen Schwefelsäure (4.5) werden in einen 50-ml-Messkolben (5.10) gegeben und bis zur Marke mit destilliertem Wasser (4.1) aufgefüllt.

- 7.2.1.2. Zu einem aliquoten Teil von 5 ml dieser Lösung (7.2.1.1) in einem 20-ml-Messkolben (5.11) werden 1 ml 1-N-Schwefelsäure (4.6) und 2 ml Phosphatreagenz (4.8) zugesetzt; mit destillierten Wasser (4.1) wird auf 20 ml aufgefüllt.
- 7.2.1.3. Mit einem locker eingesetzten Stopfen verschließen, schütteln und in einem kochenden Wasserbad (5.7) 10 Minuten erhitzen, dann in einem Wasserbad von 20 °C (5.4) 20 Minuten abkühlen.
- 7.2.1.4. Eine 1-cm-Küvette (5.13) mit dieser Vergleichslösung füllen.
- 7.2.2. Probenlösung
- 7.2.2.1. Zu einem aliquoten Teil von 5 ml der Aschelösung (7.1.8) in einem 20-ml-Messkolben (5.11) werden 1 ml 1-N-Schwefelsäure (4.6) und 2 ml Phosphatreagenz (4.8) zugesetzt; mit destillierten Wasser (4.1) wird auf 20 ml aufgefüllt.
- 7.2.2.2. Mit einem locker eingesetzten Stopfen verschließen, schütteln und in einem kochenden Wasserbad (5.7) 10 Minuten erhitzen, dann in einem Wasserbad von 20 °C (5.4) 20 Minuten abkühlen.
- 7.2.2.3. Die entstehende gelbe Lösung wird unverzüglich spektroskopisch (5.12) in einer 1-cm-Küvette (5.13) bei 420 nm gegenüber der Vergleichslösung (7.2.1.4) analysiert.
- 7.2.3. Eichkurve
- 7.2.3.1. Zur Erstellung der Eichkurve werden aliquote Mengen (2 ml) des Phosphatreagenz (4.8) in 20-ml-Messkolben (5.11) gegeben, die jeweils 1 ml 1-N-Schwefelsäure (4.6) und 0, 2, 4, 6, 8 bzw. 10 ml Kaliumdihydrogenphosphatlösung (4.7) enthalten, und mit destilliertem Wasser (4.1) bis zur Marke aufgefüllt.
- 7.2.3.2. Mit einem locker eingesetzten Stopfen verschließen, schütteln und in einem kochenden Wasserbad (5.7) 10 Minuten erhitzen, dann in einem Wasserbad von 20 °C (5.4) 20 Minuten abkühlen und in einer 1-cm-Küvette (5.13) bei 420 nm spektroskopisch (5.12) gegenüber der Vergleichslösung (7.2.1.4) analysieren.
- 7.2.3.3. Erstellung der Eichkurve:

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

8. Berechnung der Ergebnisse

Der Eigelbgehalt in g/l wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{g/L Eigelb} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{Dichte}}{E/40}$$

Dabei ist:

110	Umrechnungsfaktor für Gesamtgehalt an P ₂ O ₅ in g in 100 g Eigelb,
mg P ₂ O ₅	anhand der Eichkurve festgestellter Wert,
Dichte	Masse je Volumeneinheit (g/ml) des Eierlikörs bei 20 °C,
E	Gewicht des Eierlikörs in g,
40	Verdünnungsfaktor für einen aliquoten Teil von 5 ml der Aschelösung.

9. Leistungsmerkmale der Methode (Präzision)

Statistische Ergebnisse des Ringversuchs:

In der nachstehenden Tabelle sind die Werte für Eigelb zusammengefasst.

Bei einem internationalen Ringversuch ergaben sich nach einem international abgestimmten Verfahren folgende Daten:

Jahr des Ringversuchs:	1998
Anzahl Laboratorien:	24
Anzahl Proben:	5
Analyt:	Eigelb

Proben	A	B	C	D	E
Anzahl der nach Beseitigung der Ausreißer berücksichtigten Laboratorien	19	20	22	20	22
Anzahl Ausreißer (Laboratorien)	3	4	2	4	2
Anzahl berücksichtigter Ergebnisse	38	40	44	40	44
Mittelwert	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Wiederholstandardabweichung (S_p) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Relative Wiederholstandardabweichung (RSD_p) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Wiederholgrenze (r) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Vergleichstandardabweichung (S_R) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Relative Vergleichstandardabweichung (RSD_R) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Vergleichgrenze (R) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Art der Proben:

- A Advocaat, Blindduplikate
- B Advocaat, Blindduplikate
- C Advocaat, Blindduplikate
- D Advocaat (verdünnt), Splitwerte (*)
- E Advocaat, Blindduplikate