

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

**ГОСТ**  
**32249—**  
**2013**

---

## **ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ**

### **Определение этилового спирта ферментативным методом**

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2015

## Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии открытого акционерного общества «Вимм-Биль-Данн» (ОАО «Вимм-Биль-Данн»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 августа 2013 г. № 58-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1746-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32249—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

5 В настоящем стандарте учтены основные положения метода IFU-Analyses Nr. 52 (2005) Determination of Alcohol. Enzymatic (ИФУ 52:2005 Метод ферментативного определения этанола, разработанного Международной федерацией производителей фруктовых соков IFU «International Federation of Fruit Juice Produces»

### 6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет*

© Стандартиформ, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

**Содержание**

1 Область применения . . . . .	1
2 Нормативные ссылки . . . . .	1
3 Термин и определение, сокращения . . . . .	2
4 Сущность метода . . . . .	2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы . . . . .	2
6 Отбор и подготовка проб . . . . .	3
7 Подготовка к проведению измерения . . . . .	3
8 Проведение измерений ферментативным методом . . . . .	5
9 Обработка результатов спектрофотометрических измерений. . . . .	6
10 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости . . . . .	8
11 Требования безопасности. . . . .	9

**ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ****Определение этилового спирта ферментативным методом**

Juice products. Determination of ethanol by enzymatic method

Дата введения — 2015—07—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на фруктовые и овощные соки, нектары, сокосодержащие напитки, фруктовые и овощные концентрированные соки, пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, в т. ч. обогащенные и для детского питания (далее — соковая продукция) и устанавливает метод ферментативного определения массовой концентрации или массовой доли этилового спирта.

Диапазон измерения массовой концентрации (массовой доли) этилового спирта от 50 до 50000 мг/дм<sup>3</sup> (млн<sup>-1</sup>) включительно.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26313—84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671—84 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Термин и определение, сокращения

3.1 В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1.1 Е — стандартная единица, определяющая количество (активность) ферментов, которые служат катализаторами при температуре 25 °С для превращения 1 мкмоль вещества в минуту.

#### 3.2 Сокращения

НАД (NAD) — никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма.

НАДН (NADH) — никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма.

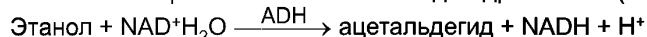
АДГ (ADH) — алкогольдегидрогеназа.

АЛДГ (Al-DH) — альдегиддегидрогеназа.

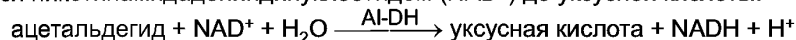
### 4 Сущность метода

Метод определения этилового спирта в соковой продукции основан на проведении нижеприведенных ферментативных реакций:

Этиловый спирт окисляется алкогольдегидрогеназой (ADH) до ацетальдегида:



Образующийся ацетальдегид в присутствии альдегиддегидрогеназы (Al-DH) количественно окисляется никотинамидадениндинуклеотидом (NAD<sup>+</sup>) до уксусной кислоты:



Массовая концентрация (массовая доля) этилового спирта эквивалентна количеству образовавшегося НАДН, что определяется по изменению оптической плотности, измеренной при длинах волн: 334, 340 или 365 нм.

### 5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

5.1 Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности при длинах волн 334, 340 и 365 нм с допустимой абсолютной погрешностью измерения коэффициента пропускания ±1 %, и пределами допускаемой воспроизводимости измерений по шкале длин волн ±0,3 нм.

5.2 Иономер или рН-метр с погрешностью измерения не более ±0,05 ед. рН.

5.3 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ±0,001 г.

5.4 Термометр ТЛ-2 с диапазоном измерения от 0 °С до +150 °С с погрешностью ±1 °С.

5.5 Секундомер или секундомер-часы с ценой деления 0,2 с.

5.6 Кюветы кварцевые или полимерные для спектрофотометрии с длиной оптического пути от 5 до 20 мм и вместимостью от 2 до 10 см<sup>3</sup>.

5.7 Фильтры мембранные с размером диаметра пор 0,20 или 0,45 мкм и диаметром 47 мм для фильтрования проб.

5.8 Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) не менее 1000.

5.9 Мешалка магнитная угловой скоростью вращения от 400 до 1200 мин<sup>-1</sup>.

5.10 Ванна ультразвуковая.

5.11 Посуда мерная лабораторная стеклянная:

- цилиндры мерные 2-50-2 и 2-1000-2 по ГОСТ 1770;

- колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2 по ГОСТ 1770;
- пипетки градуированные 1-2-1-1, 1-2-1-5, 1-2-1-25 по ГОСТ 29227;
- пробирки мерные П-2-20-14/23 по ГОСТ 1770.

5.12 Микродозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 100 до 1000 мм<sup>3</sup> с относительной погрешностью дозирования ±1 % с соответствующими наконечниками по ГОСТ 28311.

5.13 Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

- воронки лабораторные;
- стаканы высокие или низкие вместимостью 100, 400 и 1000 см<sup>3</sup>;
- пробирки типа П-2-15-160.

5.14 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

5.15 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 свежеприготовленная.

5.16 Шпатели пластиковые или палочки стеклянные оплавленные длиной от 2 до 5 см для перемешивания содержимого кюветы при проведении фотометрических измерений.

5.17 Калия пиррофосфат K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ч.

5.18 Кислота соляная, х. ч. по ГОСТ 3118, раствор молярной концентрации 1 моль/дм<sup>3</sup>.

5.19 Натриевая соль никотинамидадениндинуклеотида, НАДН-Na<sub>2</sub>, с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

5.20 Альдегиддегидрогеназа (АЛДГ), лиофилизированная, активностью не менее 75 Е.

5.21 Алкогольдегидрогеназа (АДГ), суспензия, активностью не менее 300 Е.

5.22 Спирт этиловый по ГОСТ 18300 с объемной долей не менее 96,2 %.

5.23 Комплект реагентов для ферментативного определения этилового спирта<sup>1)</sup>, включающий:

- реагент 1—100 см<sup>3</sup> пиррофосфатного буфера с рН 9,0;
- реагент 2—30 таблеток сухого препарата, каждая таблетка должна содержать по 4,0 мг НАД и альдегиддегидрогеназу с активностью 0,8 Е;
- реагент 3—1,6 см<sup>3</sup> суспензии АДГ (АДН) активностью 7000 Е;
- реагент 4 — контрольный раствор этилового спирта (массовой концентрации 50—60 мг/дм<sup>3</sup>. Точное значение указано на упаковке).

5.24 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

5.25 Поливинилпирролидон (Е1202) с массовой долей основного вещества не менее 95 %.

5.26 Фильтр обеззоленный «белая лента».

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования и реактивов, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

## 6 Отбор и подготовка проб

6.1 Отбор проб — по ГОСТ 26313, подготовка проб — по ГОСТ 26671.

## 7 Подготовка к проведению измерения

### 7.1 Предварительная подготовка растворов реактивов из набора реагентов

#### 7.1.1 Подготовка реактива 1 (пиррофосфатный буфер)

Реагент 1 (см. 5.23) применяют как реактив, без разбавления. Перед проведением определения реагент 1 доводят до температуры от 20 °С до 25 °С любым доступным способом.

Срок хранения реактива 1 при температуре 4 °С — не более одного года.

#### 7.1.2 Подготовка реактива 2 (НАД)

Для приготовления реактива 2 растворяют одну таблетку реагента 2 (см. 5.23) в 3 см<sup>3</sup> реактива 1 в колбе с притертой пробкой или в стеклянной пробирке (см. 5.11) на каждое измерение, в зависимости от количества измерений.

Срок хранения реактива 2 при температуре 4 °С — не более семи дней.

#### 7.1.3 Подготовка реактива 3 (АДГ)

Реагент 3 (см. 5.23) применяют без разбавления.

Срок хранения реактива 3 при температуре 4 °С — не более одного года.

<sup>1)</sup> Комплекты реагентов для определения этилового спирта фирм R-Biopharm GmbH, Roche Diagnostics и Megazyme обеспечивают требуемую эффективность метода. Данная информация не является рекламой указанных реагентов и не исключает возможность применения комплектов реагентов других фирм.

#### 7.1.4 Подготовка реактива 4 (раствор этилового спирта)

Реагент 4 (см. 5.23) используют без разбавления. Точное значение концентрации этилового спирта указано на упаковке.

Срок годности указан на упаковке. Раствор используют в качестве контрольной пробы, показывающей работоспособность метода, реактивов и оборудования.

### 7.2 Подготовка растворов реактивов в лабораторных условиях

#### 7.2.1 Приготовление буферного раствора пирофосфата калия молярной концентрации 0,30 моль/дм<sup>3</sup>, 9,0 ед. рН

Растворяют 5,0 г пирофосфата калия в 40 см<sup>3</sup> воды в химическом стакане (мензурке). Полученный раствор доводят до (9,0 ± 0,1) ед. рН с помощью раствора соляной кислоты (см. 5.18). Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> и доводят его объем до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 2 мес.

#### 7.2.2 Приготовление раствора никотинамидадениндинуклеотида (НАД) молярной концентрации 49 ммоль/дм<sup>3</sup>

В химическом стакане растворяют 103 мг препарата НАДН-Na<sub>2</sub> (см. 5.19) в 3 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Срок хранения раствора в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 28 дней.

#### 7.2.3 Приготовление альдегиддегидрогеназы (АЛДГ)

Растворяют необходимое количество лиофилизата АЛДГ (см. 5.20) в 0,5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды для получения раствора с активностью фермента 75 Е в 1 см<sup>3</sup>.

Срок хранения суспензии в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 8 ч, при температуре 20 °С — не более двух дней.

#### 7.2.4 Приготовление суспензии алкогольдегидрогеназы (АДГ)

Используют 0,5 см<sup>3</sup> суспензии АДГ (см. 5.21) без разбавления или растворяют 25 мг суспензии АДГ в 0,5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Срок хранения суспензии в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С — не более 6 мес, водного раствора при температуре 4 °С не более одной недели.

#### 7.2.5 Подготовка контрольного раствора этилового спирта

Мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup> помещают на аналитические весы (см. 5.4) и взвешивают в ней 500 мг этилового спирта (см. 5.22). Точную массу этилового спирта рассчитывают по разности результатов взвешивания полной и пустой колбы.

Приливают небольшое количество дистиллированной воды, перемешивают. Раствор доводят дистиллированной водой до метки.

В мерную колбу на 100°см<sup>3</sup> отбирают 10 см<sup>3</sup> полученного раствора и доводят до метки дистиллированной водой.

Раствор используют в качестве контрольной пробы, показывающего работоспособность метода, реактивов, оборудования.

Срок хранения раствора при температуре 6 °С в герметичной упаковке — не более 3 сут.

### 7.3 Подготовка проб для измерений

7.3.1 Определение массовой концентрации этилового спирта в осветленных соках и сокосодержащих напитках, не содержащих нерастворимые в воде вещества, проводят без разбавления пробы дистиллированной водой.

7.3.2 Определение массовой концентрации этилового спирта в осветленных соках и сокосодержащих напитках, содержащих нерастворимые в дистиллированной воде вещества, проводят после фильтрации пробы через обеззоленный фильтр «белая лента» или ее центрифугированием с фактором разделения не менее 990g в течение 15 мин.

7.3.3 Пробы соков и сокосодержащих напитков, содержащие углекислый газ, дегазируют фильтрацией или, для уменьшения возможной потери этанола, добавлением гидроксида натрия.

7.3.4 Пробы соков и сокосодержащих напитков с высокой кислотностью доводят до 8—9 ед. рН добавлением раствора гидроксида натрия и выдерживают 15 мин.

7.3.5 Определение массовой концентрации этилового спирта в соках и сокосодержащих напитках с объемной долей мякоти до 10 % включительно или содержащих нерастворимые в воде вещества, проводят после тщательного перемешивания пробы стеклянной палочкой, а затем ее центрифугирования с фактором разделения не менее 990g в течение 15 мин.

7.3.6 Соки и сокодержущие напитки с объемной долей мякоти свыше 10 % и более предварительно разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1 : 5 для осветления раствора. Для этого в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> мерным цилиндром отбирают 10 см<sup>3</sup> пробы и доводят дистиллированной водой до метки. После этого пробу гомогенизируют, тщательно перемешивая содержимое стеклянной палочкой, и центрифугируют с фактором разделения не менее 990g в течение 15 мин. В случае неполного осаждения нерастворимых в дистиллированной воде частиц пробу вновь фильтруют через обеззоленный фильтр «белая лента» или центрифугируют с фактором разделения не менее 990g в течение 15 мин.

7.3.7 Определение массовой доли этилового спирта в концентрированных соках и пюре проводят после предварительного разбавления пробы дистиллированной водой весовым методом в соотношении 1 : 5.

Для этого на весах (см. 5.3) в стакане вместимостью 50 см<sup>3</sup> взвешивают 5—7 г концентрированного сока с записью результата до третьего десятичного знака, прибавляют дистиллированную воду до получения общей массы пробы 25—35 г с записью результата до третьего десятичного знака. Делением общей массы пробы на массу концентрированного сока до разбавления водой, вычисляют величину разбавления (разведения), которую учитывают при обработке результатов. В случае, если концентрированная соковая продукция представляет собой пюре, при разбавлении которого образуются нерастворимые в дистиллированной воде вещества, пробу дополнительно центрифугируют в соответствии с аналогичными требованиями 7.3.2. Необходимо учитывать предварительное разведение пробы по 7.3.6 при расчете фактора разбавления  $F$  в соответствии с таблицей 1.

7.3.8 Для обесцвечивания окрашенной соковой продукции к 5 см<sup>3</sup> пробы добавляют примерно 0,1 г поливинилпилирролидона, перемешивают в течение 2 мин и затем фильтруют.

#### 7.4 Приготовление рабочего раствора пробы

Для обеспечения достоверности результатов определения этилового спирта в кювете спектрофотометра с анализируемой пробой должно находиться от 1,0 до 6,0 мкг (измерение при 365, 340 и 334 нм) соответственно.

Для достижения этого условия пробу разбавляют дистиллированной водой с помощью мерных колб и пипеток подходящих вместимостей в соответствии с таблицей 1.

Т а б л и ц а 1 — Разбавления пробы перед проведением измерений

Ожидаемое количество этилового спирта в анализируемой пробе, г/дм <sup>3</sup>		Разбавление дистиллированной водой	Фактор разбавления ( $F$ )
Измерения при длине волны 334 или 340 нм	Измерения при длине волны 365 нм		
< 0,06	< 0,12	Не разбавляется	1
0,06—0,6	0,12—1,2	1 + 9	10
0,67—6,0	1,2—12	1 + 99	100
6,0—60	12—120	1 + 999	1000
> 60	> 120	1 + 9999	10000

## 8 Проведение измерений ферментативным методом

### 8.1 Условия проведения измерений

Измерения проводят в следующих лабораторных условиях:

- температура окружающего воздуха . . . . . (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление . . . . . (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность . . . . . (65 ± 15) %.

### 8.2 Анализ проб

В кювету спектрофотометра (см. 5.6) с длиной оптического пути 1 см приливают реактив 1 и реактив 2, дистиллированную воду и анализируемую пробу в порядке и количествах, указанных в таблице 2.

Для определения используют только свежеприготовленную дистиллированную воду.



Т а б л и ц а 2 — Порядок проведения анализа

Наименование растворов, дозируемых в кювету, и последовательность их дозирования	Кюветы	
	Раствор сравнения	Анализируемая проба
Реактив 1 по 7.1.1 или раствор по 7.2.1	1,00 см <sup>3</sup>	1,00 см <sup>3</sup>
Реактив 2 по 7.1.2 или раствор по 7.2.2	0,10 см <sup>3</sup>	0,10 см <sup>3</sup>
Проба	—	0,10 см <sup>3</sup>
Вода дистиллированная	2,00 см <sup>3</sup>	1,90 см <sup>3</sup>
Шпателем перемешивают помещенные в кюветы растворы, через 2 мин проводят измерения оптических плотностей растворов ( $A_2$ ) относительно оптической плотности воздуха		
Реактив 3 по 7.1.3 или раствор по 7.2.3	0,05 см <sup>3</sup>	0,05 см <sup>3</sup>
<p>Осторожно перемешивают помещенные в кюветы растворы, после завершения реакции (6—8 мин) проводят измерения оптических плотностей растворов (<math>A_2</math>) относительно оптической плотности воздуха.</p> <p>Если ферментативная реакция не закончилась через 30 мин и значения оптической плотности растворов увеличиваются с течением времени, то значения (<math>A_2</math>) определяют методом экстраполяции на момент внесения реактива 3 по 7.1.3.</p> <p>Для контроля точности результатов определений параллельно проводят измерение контрольного раствора по 7.2.5.</p> <p>Пробы анализируют два раза в условиях повторяемости</p>		

## 9 Обработка результатов спектрофотометрических измерений

Измеряемой величиной является разность в оптической плотности растворов до и после обработки ферментом при длинах волн 334, 340 или 365 нм, которая пропорциональна массовой концентрации (массовой доле) этилового спирта в анализируемой пробе.

Разность значений оптических плотностей  $\Delta A_{\text{спирт}}$  вычисляют по формуле

$$\Delta A_{\text{спирт}} = (A_2 - A_1)_{\text{проба}} - (A_2 - A_1)_{\text{контроль}}, \quad (1)$$

где  $(A_2 - A_1)_{\text{проба}}$  — разность оптических плотностей раствора анализируемой пробы;

$(A_2 - A_1)_{\text{контроль}}$  — разность оптических плотностей раствора сравнения.

Разность оптических плотностей  $\Delta A_{\text{спирт}}$  должна находиться в интервале от 0,1 до 0,5 единиц оптической плотности (измерения при длине волны 365 нм) или от 0,1 до 0,8 единиц оптической плотности (измерения при длинах волн 334 и 340 нм). При превышении указанных значений разности оптических плотностей раствор анализируемой пробы дополнительно разбавляют дистиллированной водой. При меньшей разности оптических плотностей (менее 0,1) объем анализируемой пробы, дозируемый в кювету, увеличивают, а количество дистиллированной воды, соответственно, уменьшают так, чтобы объем анализируемой пробы в кювете оставался постоянным в соответствии с таблицей 2.

Массовую концентрацию  $C_{\text{спирт}}$  этилового спирта в пробе, мг/дм<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$C_{\text{спирт}} = \frac{V \cdot M \cdot F \cdot \Delta A_{\text{спирт}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 2}, \quad (2)$$

где  $V$  — окончательный объем растворов в кювете по таблице 2, см<sup>3</sup>;

$M$  — молярная масса этанола,  $M = 46,07$  г/моль;

$F$  — фактор разбавления в соответствии с таблицей 1;

$\Delta A_{\text{спирт}}$  — разность оптических плотностей;

$\varepsilon$  — молярный коэффициент поглощения НАДН, дм<sup>3</sup> · ммоль<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>:

- при длине волны 340 нм  $\varepsilon = 6,3$ ,
- при длине волны 365 нм  $\varepsilon = 3,4$  (ртутная лампа),
- при длине волны 334 нм  $\varepsilon = 6,18$  (ртутная лампа);
- $d$  — толщина поглощающего слоя в кювете, см;
- $v$  — объем анализируемой пробы (см. таблицу 2), см<sup>3</sup>.

При проведении анализа по 8.2, толщине поглощающего слоя в кювете 1 см и объеме анализируемой пробы 0,100 см<sup>3</sup> формула для расчета массовой концентрации этилового спирта  $C_{\text{спирт}}^{\text{э}}$ , мг/дм<sup>3</sup>, преобразуется следующим образом

$$C_{\text{спирт}}^{\text{э}} = \frac{3,150 \cdot 46,07 \cdot \Delta A_{\text{спирт}}}{\varepsilon \cdot 100 \cdot 0,100 \cdot 2} = \frac{725,6 \cdot \Delta A_{\text{спирт}}}{\varepsilon} \quad (3)$$

Если проба предварительно была разбавлена по 7.4, результат необходимо умножить на фактор разбавления  $F$  (см. таблицу 1):

$$C_{\text{спирт}}^{\text{э}} = \frac{3,150 \cdot 46,07 \cdot \Delta A_{\text{спирт}}}{\varepsilon \cdot 100 \cdot 0,100 \cdot 2} \cdot F = \frac{725,6 \cdot \Delta A_{\text{спирт}}}{\varepsilon} \cdot F \quad (4)$$

Массовую долю этилового спирта в пробе, подготовленной по 7.3.7,  $X_{\text{спирт}}$ , млн<sup>-1</sup>, вычисляют по формуле

$$X_{\text{спирт}} = \frac{V_{\text{к}} \cdot C_{\text{спирт}}}{m_{\text{к}}} \quad (5)$$

где  $V_{\text{к}}$  — объем мерной колбы, использовавшейся при подготовке пробы, см<sup>3</sup>;

$C_{\text{спирт}}$  — массовая концентрация этилового спирта в растворе, полученного в результате подготовки пробы и определяемая по формуле (2), мг/дм<sup>3</sup>;

$m_{\text{к}}$  — масса концентрированного продукта, взятого для проведения анализа и подготовленного по 7.3.7, г;

Дополнительно для контроля качества реактивов и работы спектрофотометра вместе с каждой серией анализируемых проб проводят определение содержания этилового спирта в контрольном растворе по 7.2.5.

Вычисляют массовую концентрацию этилового спирта в контрольном растворе по формуле (2).

Относительное отклонение измеренной величины содержания этилового спирта в стандартном растворе не должно превышать 5 % от номинального значения массовой концентрации этилового спирта в стандартном растворе, в противном случае результаты измерения всей серии образцов признаются неудовлетворительными.

Расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости)  $r$ , приведенного в таблице 3, при доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

Границы относительной погрешности определения массовой доли (концентрации) этилового спирта  $\pm \delta$ , %, при соблюдении условий, регламентированных настоящим стандартом, при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , не должны превышать значений, приведенных в таблице 3.

Т а б л и ц а 3 — Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли этилового спирта

Диапазон измерений этилового спирта в соковой продукции		Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm \delta$ , % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости $r$ , % при $n = 2$ , $P = 0,95$
Массовой концентрации, мг/дм <sup>3</sup>	Массовой доли, млн <sup>-1</sup>				
От 50 до 1000 включ.	От 50 до 1000 включ.	20	5	10	14
Св. 1000 до 50000 включ.	Св. 1000 до 50000 включ.	10	3	5	7

Пределы обнаружения метода приведены в таблице 4.

Т а б л и ц а 4 — Пределы обнаружения метода

Виды соковой продукции	Пределы обнаружения метода
Прозрачные неокрашенные соки, нектары, сокосодержащие напитки, мг/дм <sup>3</sup>	50
Соки, нектары, сокосодержащие напитки с мякотью, мг/дм <sup>3</sup>	100
Соки, нектары, сокосодержащие напитки, окрашенные в красные тона, мг/дм <sup>3</sup>	200
Концентрированные соки и пюре, млн <sup>-1</sup>	100

За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |C(X)_1 - C(X)_2| \cdot 100}{C(X)_1 + C(X)_2} \leq r, \quad (6)$$

где  $C(X)$  — результаты параллельных определений содержания этилового спирта, мг/дм<sup>3</sup> (млн<sup>-1</sup>);

$r$  — значение предела повторяемости, % (таблица 3).

Если условие (6) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений.

Результат анализа при  $P = 0,95$  представляют в виде

$$\bar{C}(\bar{X}) \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{C}(\bar{X}), \quad (7)$$

где  $\bar{C}(\bar{X})$  — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, признанных приемлемыми по условию (6), мг/дм<sup>3</sup> (млн<sup>-1</sup>);

$\pm \delta$  — границы относительной погрешности измерений, % (таблица 3).

В случае, если содержание этилового спирта ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, проводят следующую запись в журнале: «содержание этилового спирта менее 50 мг/дм<sup>3</sup> (млн<sup>-1</sup>) (более 50000 мг/дм<sup>3</sup> (млн<sup>-1</sup>))».

## 10 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

10.1 Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

- при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;
- при проверке совместимости результатов измерений, полученных при сравнительных испытаниях.

Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует пробы, оставленные на хранение.

Приемлемость результатов измерений, полученных в двух лабораториях, оценивают сравнением разности этих результатов с критической разностью  $CD_{0,95}$  по формуле

$$|\bar{C}(\bar{X})_1 - \bar{C}(\bar{X})_2| \leq CD_{0,95}, \quad (8)$$

где  $\bar{C}(\bar{X})$  — средние значения содержания этилового спирта в соковой продукции, полученные в первой и второй лабораториях, мг/дм<sup>3</sup>; (млн<sup>-1</sup>);

$CD_{0,95}$  — значение критической разности для содержания этилового спирта в соковой продукции, мг/дм<sup>3</sup>; (млн<sup>-1</sup>), вычисляемое по формуле

$$CD_{0,95} = 2,77 \cdot 0,01 \cdot \bar{C}(\bar{X}) \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}, \quad (9)$$

где 2,77 — коэффициент критического диапазона для двух параллельных определений по ГОСТ ИСО 5725-6;

0,01 — множитель для перехода от процентов к абсолютным значениям;

$\bar{C}(\bar{X})$  — среднееарифметическое значение результатов содержания этилового спирта, мг/дм<sup>3</sup>; (млн<sup>-1</sup>), полученных в первой и второй лабораториях;

$\sigma_R$  — показатель воспроизводимости (таблица 3), %;

$\sigma_r$  — показатель повторяемости (таблица 3), %.

$n_1 = n_2 = 2$  — количество параллельных определений в условиях повторяемости в каждой лаборатории в соответствии с методикой.

Если критическая разность не превышена, то приемлемы оба результата измерений, проводимых двумя лабораториями, и в качестве окончательного результата используют их среднееарифметическое значение. Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.4).

10.2 Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3), используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

## 11 Требования безопасности

### 11.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении измерений массовой концентрации (массовой доли) этилового спирта соблюдают следующие требования.

11.1.1 Требования электробезопасности при работе с приборами по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

11.1.2 При работе с чистыми веществами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007. Контроль за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005.

11.1.3 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и должно быть оборудовано средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

11.1.4 Организация обучения работающих — по ГОСТ 12.0.004.

### 11.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений, обработке и оформлению результатов допускаются инженер-химик, техник или лаборант, имеющие высшее или среднее специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучившие инструкцию по эксплуатации спектрофотометра. Первое применение метода в лаборатории следует проводить под руководством специалиста, владеющего теорией и имеющего практические навыки в этой области.

УДК 664.863.001.4:006.354

МКС 67.050  
67.080

H59

Ключевые слова: соковая продукция, термины и определения, ферментативный метод, массовая концентрация, массовая доля, проведение измерения, обработка и оформление результатов измерений, контроль точности результатов определения, требования безопасности

---

Редактор *М.Е. Никулина*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *Ю.М. Прокофьева*  
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 09.04.2015. Подписано в печать 14.05.2015. Формат 60×84<sup>1/8</sup>. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,86.  
Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 58 экз. Зак. 1894.

---

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)