

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
54946—  
2012

---

МЕД

**Метод определения этанола**

DIN 10762:2004-06  
(NEQ)

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2013

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Центр исследований и сертификации «Федерал» (ООО «Центр «Федерал»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 432 «Пчеловодство»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 июля 2012 г. № 208-ст

4 Настоящий стандарт разработан с учетом основных нормативных положений национального стандарта DIN 10762:2004-06 «Исследование меда. Определение содержания этанола. Энзиматический метод» (DIN 10762:2004-06 «Analysis of honey — Determination of ethanol content — Enzymatic method») (auténtичный перевод рег. № 4709/DIN от 31.05.2010 г.)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаеваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаеваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаеваемом 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*

© Стандартинформ, 2013

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 Термины и определения . . . . .	2
4 Требования безопасности проведения работ . . . . .	2
5 Условия измерений . . . . .	2
6 Отбор и подготовка пробы . . . . .	2
7 Сущность метода . . . . .	2
8 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы . . . . .	3
9 Подготовка к испытаниям . . . . .	4
10 Проведение испытаний . . . . .	4
11 Обработка и представление результатов испытаний . . . . .	5
12 Характеристика погрешности испытаний . . . . .	6

МЕД

Метод определения этанола

Honey. Method for determination of ethanol content

Дата введения — 2013—07—01

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мед и устанавливает энзиматический метод определения массовой доли этанола в диапазоне измерений от 4,00 до 155,00 мг/кг.

Требования к контролируемому показателю установлены в ГОСТ Р 52451, ГОСТ Р 54644.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 51568—99 (ИСО 3310-1—90) Сита лабораторные из металлической проволочной сетки. Технические условия

ГОСТ Р 52001—2002 Пчеловодство. Термины и определения

ГОСТ Р 52451—2005 Меды монофлорные. Технические условия

ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 54644—2011 Мед натуральный. Технические условия

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

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

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

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 342—77 Реактивы. Натрий дифосфат 10-водный. Технические условия

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

ГОСТ 3118—77 (СТ СЭВ 4276—83) Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3769—78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4207—75 Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

# **ГОСТ Р 54946—2012**

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

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

**П р и м е ч а н и е** — 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 по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. 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 Термины и определения**

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52001, ГОСТ Р ИСО 5725-1.

## **4 Требования безопасности проведения работ**

При проведении измерений необходимо соблюдать требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, требования безопасности при работе с химическими реагентами по ГОСТ 12.1.007, иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

## **5 Условия измерений**

Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с веществами 1-го и 2-го классов опасности, органическими растворителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционной системой согласно ГОСТ 12.4.021.

При выполнении измерений следует соблюдать следующие условия:

температура окружающей среды . . . . . от 15 °C до 25 °C;

относительная влажность воздуха при температуре 25 °C . . . . . не более 80 %;

атмосферное давление . . . . . от 97 до 101 кПа  
(730—760 мм рт. ст.).

## **6 Отбор и подготовка пробы**

Пробу меда массой не менее 200 г отбирают по ГОСТ Р 54644.

Закристаллизованный мед размягчают в термостате или на терmostатируемой водяной бане по 8.3 при температуре не выше 40 °C. Пробу охлаждают до комнатной температуры.

Мед с примесями процеживают при комнатной температуре через сито по 8.6. Закристаллизованный мед продавливают через сито шпателем по 8.7. Крупные механические частицы удаляют вручную.

Сотовый мед (без перговых ячеек) отделяют от сот при помощи сита без нагревания.

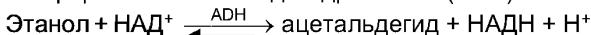
Пробу интенсивно и тщательно перемешивают не менее 3 мин. При гомогенизации следует обратить внимание на то, чтобы в мед попало меньше воздуха.

## **7 Сущность метода**

Метод основан на растворении меда в воде, осаждении белковых веществ, фотометрическом определении количества никотинамид-аденин-динуклеотида восстановленной формы (НАДН), образовавшегося в процессе ферментативной реакции с этанолом меда и последующем вычислении массовой доли этанола.

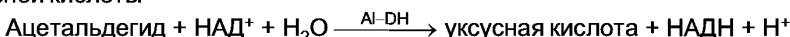
**Описание химических процессов**

7.1 Этанол мела окисляется до ацетальдегида никотинамид-аденин-динуклеотидом (НАД) в присутствии фермента алкогольдегидрогеназы (АДХ)



Равновесие этой реакции смещено в сторону этанола и НАД<sup>+</sup>. В щелочной среде и при улавливании образовавшегося ацетальдегида равновесие может быть смещено в сторону выхода продуктов реакции.

7.2 Ацетальдегид в присутствии альдегиддегидрогеназы (Ал-ДН) количественно окисляется до уксусной кислоты



7.3 Количество образовавшегося НАДН эквивалентно содержанию этанола в меле.

## **8 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реагенты**

8.1 Спектрофотометр, снабженный светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 340 нм и кюветами с четырьмя прозрачными стенками и длиной оптического пути 10 мм.

8.2 Весы по ГОСТ Р 53228 высокого класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более  $\pm 0,01$  мг.

8.3 Термостат, водяная баня или другое устройство, позволяющее производить равномерный нагрев до температуры 40 °С.

8.4 pH-метр/иономер с пределами допускаемой основной абсолютной погрешности прибора при преобразовании измеренного значения ЭДС в рХ (рН)  $\pm 0,02$  ед. рХ (рН).

8.5 Секундомер механический СОСпр-26-2-000.

8.6 Сито из нержавеющей стали, диаметр отверстий 0,5 мм по ГОСТ Р 51568.

8.7 Шпатель лабораторный ШЛ.

8.8 Термометр ртутный стеклянный лабораторный с диапазоном значений от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

8.9 Колбы мерные 1(2)-100-2(ПМ) по ГОСТ 1770.

8.10 Колбы конические Кн-1(2,3)-25(250)-14/23(29/32) ТС по ГОСТ 25336.

8.11 Пипетки 1-2-1-1(5, 10) по ГОСТ 29227.

8.12 Пипетка одноканальная переменного объема с диапазоном дозирования (5—50) мкл.

8.13 Цилиндры 3-100-2 по ГОСТ 1770.

8.14 Стаканы В-1-100 ТС по ГОСТ 25336.

8.15 Воронка лабораторная В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

8.16 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026, марки Ф или ФС или фильтры обеззоленные (синяя лента).

8.17 Палочки стеклянные лабораторные оплавленные длиной от 15 до 20 см.

8.18 Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х. ч.

8.19 Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174, х. ч.

8.20 Натрий дифосфат 10-водный по ГОСТ 342, ч. д. а.

8.21 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч., раствор молярной концентрацией 1,0 моль/дм<sup>3</sup>.

8.22 Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, х. ч., раствор молярной концентрацией 3,2 моль/дм<sup>3</sup>.

8.23  $\beta$ -Никотинамид-аденин-динуклеотид 4-водный окисленной формы с содержанием основного вещества не менее 98,0 %.

8.24 Альдегиддегидрогеназа из дрожжей, с удельной ферментативной активностью не менее 15 Е/мг протеина.

8.25 Алкогольдегидрогеназа из дрожжей, с удельной ферментативной активностью не менее 300 Е/мг протеина.

8.26 Вода для лабораторного анализа по ГОСТ Р 52501, степень чистоты 2.

Допускается использование других средств измерений и вспомогательного оборудования по метрологическим, техническим характеристикам не хуже указанных в настоящем стандарте.

Допускается использование других реагентов по качеству и чистоте не ниже указанных.

## 9 Подготовка к испытаниям

### 9.1 Приготовление раствора Карреза I

Железистосинеродистый калий по ГОСТ 4207 массой ( $3,60 \pm 0,01$ ) г растворяют в воде по 8.26 в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Объем раствора в колбе доводят до метки водой, перемешивают.

Раствор при необходимости хранят при температуре 4 °С в течение 1 мес.

### 9.2 Приготовление раствора Карреза II

Сернокислый цинк по ГОСТ 4174 массой ( $7,20 \pm 0,01$ ) г растворяют в воде по 8.26 в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Объем раствора в колбе доводят до метки водой, перемешивают.

Раствор хранят в темном месте при комнатной температуре в течение 6 мес.

### 9.3 Приготовление буферного раствора

Натрий дифосфат по ГОСТ 342 массой ( $4,50 \pm 0,01$ ) г растворяют в 60 см<sup>3</sup> воды по 8.26 в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Добавляют раствор соляной кислоты молярной концентрацией 1,0 моль/дм<sup>3</sup> по 8.21 в объеме, достаточном для установления по рН-метру по 8.4 значения pH раствора ( $9,0 \pm 0,1$ ) ед. pH. Объем раствора в колбе доводят до метки водой, перемешивают.

Раствор при необходимости хранят при температуре 4 °С в течение 2 мес.

### 9.4 Приготовление реакционной смеси

β-Никотинамид-аденин-динуклеотид 4-водный окисленной формы по 8.23 массой ( $0,1140 \pm 0,0001$ ) г и альдегиддегидрогеназу по 8.24 массой ( $0,0033 \pm 0,0001$ ) г растворяют в буферном растворе, приготовленном по 9.3, в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Объем раствора в колбе доводят до метки буферным раствором, перемешивают.

Раствор хранят при температуре 4 °С в течение одного дня.

### 9.5 Приготовление суспензии алкогольдегидрогеназы

К алкогольдегидрогеназе по 8.25 массой ( $0,7500 \pm 0,0001$ ) г добавляют раствор сернокислого аммония молярной концентрацией 3,2 моль/дм<sup>3</sup> по 8.22 в мерной колбе вместимостью 25 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Объем раствора в колбе доводят до метки раствором сернокислого аммония, перемешивают.

Раствор при необходимости хранят при температуре 4 °С в течение 4 мес.

### 9.6 Приготовление раствора пробы

В стакан вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336 взвешивают пробу меда массой ( $20,000 \pm 0,001$ ) г, подготовленного по разделу 6. К пробе приливают 10—20 см<sup>3</sup> воды по 8.26, мед тщательно растирают стеклянной палочкой и переносят жидкость в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770. Обработку пробы повторяют два-три раза до полного растворения меда, затем стакан несколько раз обмывают небольшими порциями воды по 8.26, которые также сливают в мерную колбу, при этом объем жидкости не должен превышать 2/3 объема колбы. Добавляют по 1 см<sup>3</sup> раствора Карреза I, приготовленного по 9.1, и раствора Карреза II, приготовленного по 9.2, перемешивают. Объем раствора в колбе доводят до метки водой по 8.26, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 24 ч.

На следующий день содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336.

**П р и м е ч а н и е** — При фильтровании растворов фильтрат должен стекать по стенке сосуда. Раствор не должен капать в колбу.

## 10 Проведение испытаний

10.1 В две конические колбы вместимостью 25 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336 вносят по 3 см<sup>3</sup> реакционной смеси, приготовленной по 9.4. В первую колбу добавляют 0,50 см<sup>3</sup> раствора пробы, приготовленного по 9.6, во вторую колбу — 0,50 см<sup>3</sup> воды по 8.26. Колбы закрывают пробками или лабораторной пленкой, хорошо встряхивают.

**П р и м е ч а н и е** — Пипетку или наконечник пипетки перед дозированием раствора пробы ополаскивают не менее двух раз испытуемым раствором.

10.2 Через 3 мин выдерживания при комнатной температуре измеряют оптические плотности ( $D_1$ ) испытуемого и холостого растворов (см. 10.1) по отношению к воде на спектрофотометре по 8.1 при длине волны  $\lambda = 340$  нм.

10.3 В каждую из колб добавляют по 0,05 см<sup>3</sup> суспензии алкогольдегидрогеназы, приготовленной по 9.5, закрывают пробками или лабораторной пленкой, хорошо встряхивают.

Через 5—10 мин выдерживания измеряют оптическую плотность ( $D_2$ ) каждого раствора, полученного по 10.3, по отношению к воде на спектрофотометре по 8.1 при длине волны  $\lambda = 340$  нм.

10.4 При анализе каждой пробы выполняют два параллельных определения.

## 11 Обработка и представление результатов испытаний

11.1 Значение разности оптической плотности  $\Delta D$ , вычисляют по формуле

$$\Delta D = (D_2 - D_1)_{\text{испытуемого раствора}} - (D_2 - D_1)_{\text{холостого раствора}} \quad (1)$$

11.2 Если найденное по формуле (1) значение  $\Delta D$  менее 0,100, то раствор пробы, приготовленный по 9.6, разбавляют и проведение испытания начинают снова по разделу 10. Отмечают фактор разбавления раствора меди ( $F$ ).

11.3 Значение массовой концентрации этанола  $X_1$ , мг/дм<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$X_1 = F \cdot \Delta D \cdot V_T \cdot M \cdot 10^3 \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1} \cdot V_p^{-1} \cdot 10^{-3}, \quad (2)$$

где  $F$  — фактор разбавления раствора пробы;

$\Delta D$  — значение разности оптической плотности по формуле 1;

$V_T = 3,55$  — испытуемый объем раствора пробы, см<sup>3</sup>;

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

$\varepsilon = 6,3$  — коэффициент экстинции НАДН, см<sup>3</sup> · ммоль<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>;

$d = 1,00$  — длина оптического пути, см;

$V_p = 0,50$  — объем раствора пробы, см<sup>3</sup>.

11.4 Значение массовой доли этанола  $X_2$ , мг/кг, вычисляют по формуле

$$X_2 = X_1 \cdot m^{-1} \cdot 10^3, \quad (3)$$

где  $X_1$  — значение массовой концентрации этанола по формуле 2, мг/дм<sup>3</sup>;

$m$  — анализируемая пробы в 1 дм<sup>3</sup> раствора пробы, г/дм<sup>3</sup>.

11.5 За результаты испытаний принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений массовой доли этанола, полученных в условиях повторяемости, если абсолютное расхождение между параллельными определениями не превышает предела повторяемости  $r$  по ГОСТ Р ИСО 5725-6. Значение предела повторяемости  $r$  приведено в таблице 1.

При превышении предела повторяемости  $r$  целесообразно провести дополнительное определение значения массовой доли этанола и получить еще один результат. Если при этом абсолютное расхождение ( $X_{2,\max} - X_{2,\min}$ ) результатов трех определений не превышает значения критического диапазона  $CR_{0,95}(3)$ , то в качестве окончательного результата принимают среднеарифметическое значение результатов трех определений массовой доли этанола. Значение критического диапазона  $CR_{0,95}(3)$  приведено в таблице 1.

При невыполнении этого условия проводят повторные испытания.

11.6 Абсолютное расхождение между результатами испытаний, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости  $R$  по ГОСТ Р ИСО 5725-6. При выполнении этого условия приемлемы оба результата испытания и в качестве окончательного результата может быть использовано их среднеарифметическое значение. Значение предела воспроизводимости  $R$  приведено в таблице 1.

Таблица 1

Диапазон измерений массовой доли этанола $X_2$ , мг/кг	Предел повторяемости при $P = 0,95 r$ , мг/кг	Критический диапазон при трех измерениях, $CR_{0,95}(3)$ , мг/кг	Предел воспроизводимости при $P = 0,95 R$ , мг/кг	Границы абсолютной погрешности при $P = 0,95 \pm \Delta$ , мг/кг
От 4,00 до 155,00 включ.	0,20 $\bar{X}_2$	0,30 $\bar{X}_2$	0,40 $\bar{X}_2$	0,30 $\bar{X}_2$

11.7 Результат испытаний, округленный до второго десятичного знака, в документах, предусматривающих их использование, представляют в виде:

$$(\bar{X}_2 \pm \Delta), \text{ мг/кг, при } P = 0,95,$$

где  $\bar{X}_2$  — среднеарифметическое значение результатов определений массовой доли этанола по 11.5, мг/кг;

$\pm \Delta$  — границы абсолютной погрешности результатов определений по разделу 12, мг/кг.

## **12 Характеристика погрешности испытаний**

Границы абсолютной погрешности результатов испытаний, получаемых согласно данному методу,  $\pm \Delta$ , при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , приведены в таблице 1.

УДК 638.16:006.354

C52

ОКС 67.180.10

Ключевые слова: мед, этанол, энзиматический метод, оптическая плотность, метрологические характеристики

---

Редактор *Л.В. Коретникова*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *В.И. Варенцова*  
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 09.07.2013. Подписано в печать 17.07.2013. Формат 60 × 84 ½. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,80. Тираж 163 экз. Зак. 777.

---

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

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.