

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
54946—  
2012

---

МЕД

Метод определения этанола

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2019

## Предисловие

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 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», NEQ) (auténtичный перевод reg. № 4709/DIN от 31.05.2010 г.)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 ([www.gost.ru](http://www.gost.ru))

© Стандартинформ, оформление, 2013, 2019

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 .....	.3
8 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы .....	.3
9 Подготовка к испытаниям .....	.4
10 Проведение испытаний .....	.5
11 Обработка и представление результатов испытаний .....	.5
12 Характеристика погрешности испытаний .....	.6

## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

## 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 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

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

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

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

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

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

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

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

ГОСТ 3769 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

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

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

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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

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

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

ГОСТ Р 52001 Пчеловодство. Термины и определения<sup>1)</sup>

ГОСТ Р 52451 Меды монофлорные. Технические условия<sup>2)</sup>

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

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

ГОСТ Р 54644 Мед натуральный. Технические условия<sup>3)</sup>

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

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

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 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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять 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 реактивами 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 °С до 25 °С;

относительная влажность воздуха при температуре 25 °С ..... 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 термостатируемой водяной бане по 8.3 при температуре не выше 40 °С. Пробу охлаждают до комнатной температуры.

<sup>1)</sup> Действует ГОСТ 25629—2014.

<sup>2)</sup> Действует ГОСТ 31766—2012.

<sup>3)</sup> Действует ГОСТ 19792—2017.

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.

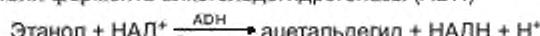
Пробу интенсивно и тщательно перемешивают не менее 3 мин. При гомогенизации следует обратить внимание на то, чтобы в мед попало меньше воздуха.

## 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 этианолом меда, и последующем вычислении массовой доли этианола.

Описание химических процессов

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



Равновесие этой реакции смещено в сторону этианола и НАД<sup>+</sup>. В щелочной среде и при увлажнении 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 этианола в меде.

## 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 pH (pH)  $\pm 0,02$  ед. pH (pH).

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 реактивов по качеству и чистоте не ниже указанных.

## 9 Подготовка к испытаниям

### 9.1 Приготовление раствора Кэррэза 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 Кэррэза 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 рН раствора ( $9,0 \pm 0,1$ ) ед. рН. 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

$\beta$ -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

Калкогольдегидрогеназе 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 Кэррэза I, приготовленного по 9.1, и раствора Кэррэза 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.

**Примечание** — 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.

**Примечание** — 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

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

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 глицерина, г;

$\epsilon = 6,3$  — коэффициент экстинкции 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 глицерина 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 расхож-

дение 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  $(X_{2,\text{макс}} - X_{2,\text{мин}})$  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 эталона $X_2$ , 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 эталона 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

ОКС 67.180.10

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

---

Редактор *Н.Е. Рагузина*  
Технический редактор *И.Е. Черепкова*  
Корректор *О.В. Лазарева*  
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 01.11.2019. Подписано в печать 16.11.2019. Формат 80×84%. Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,95.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

---

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»  
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,  
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)