

УДК 54.062+543.544(33+7.087.9)+543.613.3

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕТУЧИХ КОМПОНЕНТОВ В АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭТАНОЛА В КАЧЕСТВЕ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА: РЕЗУЛЬТАТЫ МЕЖЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ

С. В. ЧЕРЕПИЦА¹⁾, С. Н. СЫТОВА¹⁾, А. Л. КОРБАН¹⁾, Л. Н. СОБОЛЕНКО¹⁾, В. В. ЕГОРОВ²⁾,
С. М. ЛЕЩЕВ²⁾, Р. ЧАБАЛА³⁾, М. ЙИЛМАЗТЕКИН⁴⁾, Т. ЧАБАРОГЛУ⁵⁾

¹⁾Институт ядерных проблем БГУ,

ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

³⁾Карлов университет, Овоспý trh, 5, 116 36, Прага 1, г. Прага, Чехия

⁴⁾Университет им. Инёню, 44000, г. Малатья, Турция

⁵⁾Университет Чукурова, Балкали Махалези, 01330, Сарычам/Адана, Турция

Представлены результаты межлабораторных испытаний с международным участием метода прямого количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции, основанного на использовании этанола в качестве внутреннего стандарта. При проведении эксперимента 9 лабораториям из 4 стран – Беларуси, Чехии,

Образец цитирования:

Черепица СВ, Сытова СН, Корбан АЛ, Соболенко ЛН, Егоров ВВ, Лещев СМ, Чабала Р, Йилмазтекин М, Чабароглу Т. Метод определения содержания летучих компонентов в алкогольной продукции с использованием этанола в качестве внутреннего стандарта: результаты межлабораторных испытаний. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия.* 2020;1:74–87.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2020-1-74-87>

For citation:

Charapitsa SV, Sytova SN, Korban AL, Sobolenko LN, Egorov VV, Leschev SM, Cabala R, Yilmaztekin M, Cabaroglu T. Interlaboratory study of the method for direct determination of volatile compounds in alcoholic products using ethanol as internal standard. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry.* 2020;1:74–87. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2020-1-74-87>

Авторы:

Сергей Вячеславович Черепица – кандидат физико-математических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории аналитических исследований.

Светлана Николаевна Сытова – кандидат физико-математических наук; заведующий лабораторией аналитических исследований.

Антон Леонидович Корбан – младший научный сотрудник лаборатории аналитических исследований.

Лидия Николаевна Соболенко – младший научный сотрудник лаборатории аналитических исследований.

Владимир Владимирович Егоров – доктор химических наук, профессор; профессор кафедры аналитической химии химического факультета.

Сергей Михайлович Лещев – доктор химических наук, профессор; профессор кафедры аналитической химии химического факультета.

Радомир Чабала – кандидат химических наук; доцент кафедры аналитической химии фармакологического факультета.

Мурат Йилмазтекин – кандидат химических наук; доцент кафедры пищевой инженерии инженерного факультета.

Тургут Чабароглу – кандидат химических наук; профессор кафедры инженерных вопросов пищевой промышленности.

Authors:

Siarhei V. Charapitsa, PhD (physics and mathematics); leading researcher of the laboratory of analytical research.

svcharapitsa@tut.by

Svetlana N. Sytova, PhD (physics and mathematics); head of the laboratory of analytical research.

s_sytova@mail.ru

Anton L. Korban, junior researcher at the laboratory of analytical research.

karbonat7@gmail.com

Lidia N. Sobolenko, junior researcher at the laboratory of analytical research.

lidia.sobolenko@gmail.com

Vladimir V. Egorov, doctor of science (chemistry), full professor; professor at the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.

egorvv@bsu.by

Siarhei M. Leschev, doctor of science (chemistry), full professor; professor at the department of analytical chemistry, faculty of chemistry.

les_l@tut.by

Radomir Cabala, PhD (chemistry); associate professor at the department of analytical chemistry, faculty of pharmacy.

radomir.cabala@natur.cuni.cz

Murat Yilmaztekin, PhD (chemistry); associate professor at the department of food engineering, faculty of engineering.

murat.yilmaztekin@inonu.edu.tr

Turgut Cabaroglu, PhD (chemistry); professor at the department of food engineering.

tcabar@cu.edu.tr

Турции, России – были предоставлены гравиметрически приготовленные стандартные образцы для газохроматографических измерений: 5 стандартных водно-этанольных образцов с объемным содержанием этанола 40 %, включающих исследуемые компоненты в концентрациях от 10 до 400 мг/л абсолютного алкоголя. Экспериментальные результаты обработаны в соответствии с серией стандартов ИСО 5725 и руководством «ЕвроХим». Выполнены оценки прецизионности, правильности и неопределенности предложенного метода. У всех исследуемых компонентов величины пределов повторяемости варьировались между 0,4 и 7,5 %, а прецизионность метода входила в интервал, предсказанный по Горвицу. Воспроизводимость изменялась в диапазоне 0,5–10,0 %. Впервые были получены экспериментальные оценки правильности. Анализ значений достоверности показал, что смещение метода является незначимым при уровне значимости 5 %. Результаты межлабораторных испытаний подтвердили, что способ «этанол в качестве внутреннего стандарта» по своим метрологическим характеристикам не уступает традиционному методу внутреннего стандарта. Кроме того, он является более простым, менее затратным и исключает источники погрешностей, связанные с процедурами приготовления и ручного введения внутреннего стандарта, что обуславливает перспективность его использования в качестве референтного на международном уровне. При этом предложенный метод может быть валидирован в любой лаборатории без дополнительных экспериментальных исследований по результатам, полученным при валидации традиционного способа.

Ключевые слова: внутренний стандарт; референтный метод; летучие компоненты; спиртосодержащая продукция; межлабораторные испытания.

Благодарность. Авторы признательны доктору физико-математических наук, профессору С. С. Щербакову и доктору физико-математических наук, профессору В. Г. Сафонову за помощь в организации межлабораторных испытаний, а всем участникам проекта – за предоставление исходных экспериментальных данных и многочисленные конструктивные предложения по его реализации.

INTERLABORATORY STUDY OF THE METHOD FOR DIRECT DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN ALCOHOLIC PRODUCTS USING ETHANOL AS INTERNAL STANDARD

S. V. CHARAPITSA^a, S. N. SYTOVA^a, A. L. KORBAN^a, L. N. SOBOLENKO^a, V. V. EGOROV^b,
S. M. LESCHEV^b, R. CABALA^c, M. YILMAZTEKIN^d, T. CABAROGLU^e

^aInstitute for Nuclear Problems, Belarusian State University, 11 Babrujskaja Street, Minsk 220006, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^cCharles University, Ovocný trh, 5, Prague 1, Prague 116 36, Czech Republic

^dInonu University, Malatya 44000, Turkey

^eCukurova University, Balcali Mahallesi, Saricam/Adana 01330, Turkey

Corresponding author: S. V. Charapitsa (svcharapitsa@tut.by)

A collaborative interlaboratory study of the method of direct determination of volatile compounds in spirit drinks and alcoholic products was performed. The proposed method employs ethanol, the major volatile component of an alcoholic product, as an internal standard. For the experiment realization, 9 laboratories from 4 countries – Belarus, Czech Republic, Turkey, Russia – were supplied with standard solutions for gas chromatographic measurements. Five aqueous ethanol 40 % (v/v) standard solutions containing target compounds in concentrations ranging from 10 to 400 mg/L of absolute alcohol were gravimetrically prepared and delivered to the participants. The interlaboratory study was evaluated according to the ISO 5725 standards and the «EuroChem» guide. The repeatability limits (within-laboratory precision) varied between 0.4 and 7.5 % for all samples and compounds, showing a sufficiently high repeatability of the method. The reproducibility limits (between-laboratory precision) were found to vary within a satisfactory range of 0.5–10.0 %. Precision of the method was well within the range predicted by the Horwitz equation for all analytes. In the study experimental estimation of trueness was performed for the first time. Analysis of the obtained results showed that the bias of the method is insignificant at the significance level 5 %. The experimentally determined concentrations of the analytes compared well to the gravimetrical values, thus showing very satisfactory accuracy of the method. The results of the interlaboratory study confirmed that the method «ethanol as internal standard» is robust and reliable and can be used as a standard method for the determination of volatile compounds in water-ethanol samples. Moreover, this method can be validated in any one laboratory without performing additional experimental studies based on the results obtained by validation of the traditional method.

Keywords: internal standard; reference method; volatile compounds; spirit products; interlaboratory study.

Acknowledgements. The authors are grateful to doctor of science (physics and mathematics), professor S. S. Sherbakov and doctor of science (physics and mathematics), professor V. G. Safonov for help in organizing interlaboratory study, and to all study participants for providing initial experimental data and numerous constructive proposals for the implementation of the project.

Введение

Алкогольная продукция относится к продуктам питания, что обуславливает обязательный строгий контроль их безопасности со стороны государства. Одним из важных факторов, отвечающих за такую безопасность, является содержание летучих токсичных компонентов, количественное определение которого выполняют с помощью газовой хроматографии методом внутреннего стандарта. В соответствии с рекомендациями Международной организации виноградарства и виноделия (*International Organization of Vine and Wine, OIV*) в качестве вещества внутреннего стандарта предписано использовать изомеры амилового спирта – пентанол-2 или пентанол-3 [1]. Величины концентраций контролируемых летучих компонентов должны быть представлены в размерности «миллиграмм на литр абсолютного этанола» (*absolute alcohol, AA*) [1–6]. Ранее в работах [7–9] был предложен инновационный подход: как внутренний стандарт использовать непосредственно этиловый спирт, который заведомо присутствует в алкогольной продукции. Данный подход позволяет избавиться от обязательной ручной процедуры ввода вещества внутреннего стандарта в исследуемый образец. Вследствие этого процесс испытаний упрощается, отпадают затраты на приобретение особо чистых веществ, необходимых в случае применения метода традиционного внутреннего стандарта, величины измеряемых концентраций летучих компонентов получаются непосредственно в требуемой размерности (мг/л AA) [1–6].

Для определения показателей точности и эффективности метода выполнены межлабораторные испытания (МЛИ) с международным участием профильных лабораторий (9 лабораторий из 4 стран). Эксперименты проведены по аналогии с [10], их результаты легли в основу действующих регламентов OIV, в частности ЕС и США [1; 2].

Материалы и методы исследования

Все индивидуальные летучие компоненты были приобретены у компании *Sigma-Aldrich* (Германия) и имели чистоту не менее 99,5 %. Спирт этиловый ректификованный 96 об. % предоставлен Дятловским ликеро-водочным заводом «Алгонь» (Беларусь). Деионизованная вода приобретена в ОАО «Интеграл» (Беларусь). Все стандартные образцы были приготовлены гравиметрически, согласно рекомендациям [11], путем добавления каждого индивидуального компонента в исходную водно-этанольную смесь (с объемным содержанием этанола 40 %), образованную смешением спирта этилового с водой. В итоге получено 5 стандартных образцов РВЭ (раствор водно-этанольный): РВЭ-2, РВЭ-1, РВЭ-*D*, РВЭ-*C*, РВЭ-*B* (табл. 1). Неопределенности приписанных значений концентраций стандартных образцов не превышали 3 %.

Таблица 1

Концентрации и неопределенности концентраций летучих компонентов
в приготовленных стандартных образцах, мг/л AA

Table 1

Mass concentrations and uncertainties of concentrations
of volatile compounds in the prepared standard solutions, mg/L AA

Компонент	Образец				
	РВЭ-2	РВЭ-1	РВЭ- <i>D</i>	РВЭ- <i>C</i>	РВЭ- <i>B</i>
Ацетальдегид	10,7 ± 0,2	47,8 ± 1,0	183 ± 4	227 ± 5	414 ± 6
Метилацетат	8,7 ± 0,2	45,4 ± 0,9	182 ± 4	230 ± 5	427 ± 6
Этилацетат	9,4 ± 0,2	47,8 ± 1,0	189 ± 4	232 ± 5	423 ± 6
Метанол	22,6 ± 0,5	59,8 ± 1,2	198 ± 4	241 ± 5	424 ± 6
2-Пропанол	10,1 ± 0,2	46,3 ± 0,9	180 ± 4	225 ± 4	405 ± 6
1-Пропанол	9,7 ± 0,2	47,8 ± 1,0	186 ± 4	231 ± 5	418 ± 6
Изобутанол	9,7 ± 0,2	48,8 ± 1,0	190 ± 4	238 ± 5	431 ± 6
1-Бутанол	9,2 ± 0,2	47,2 ± 0,9	185 ± 4	231 ± 5	417 ± 6
Изоамилол	9,3 ± 0,2	46,9 ± 1,4	183 ± 4	228 ± 5	414 ± 6

Примечание. Концентрация этанола в любом исследуемом образце является постоянной величиной и равна его плотности, а именно 789 300 мг/л.

Образцы были помещены в стандартные микровиалы объемом 1,5 мл с обжимными крышками и доставлены участникам эксперимента в упаковках, защищающих от воздействия солнечного света и механических повреждений. Данные образцы можно было устанавливать в автоматические дозаторы жидкостных проб без какой-либо предварительной подготовки работниками лабораторий. Анализ проводился на газовых хроматографах, оснащенных пламенно-ионизационным детектором. Лаборатории по своему усмотрению задавали методические параметры работы газохроматографических комплексов, обеспечивающие идентификацию и приемлемое разделение всех компонентов ($R_s \geq 1,3$) в соответствии с п. 6.3 и 6.4 регламента OIV [1]. Каждый образец измерялся трижды в условиях повторяемости (рис. 1). Итоговым результатом считалось среднее арифметическое.

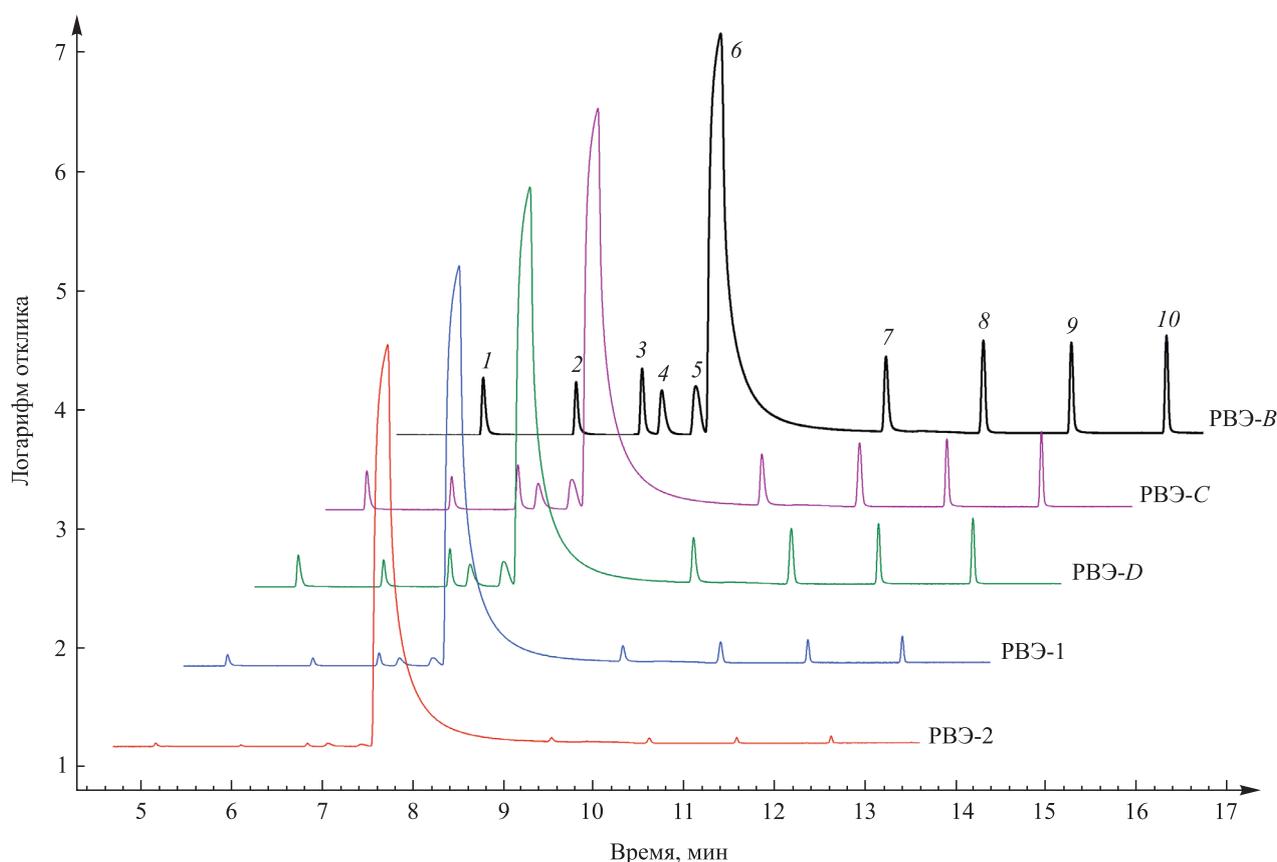


Рис. 1. Хроматограммы приготовленных стандартных образцов РВЭ:
1 – ацетальдегид; 2 – метилацетат; 3 – этилацетат; 4 – метанол; 5 – 2-пропанол; 6 – этанол;
7 – 1-пропанол; 8 – изобутиловый спирт (изобутанол); 9 – 1-бутанол; 10 – 3-метил-1-бутанол (изоамилол)

Fig. 1. Chromatograms of the prepared standard solutions RVE:
1 – acetaldehyde; 2 – methyl acetate; 3 – ethyl acetate; 4 – methanol; 5 – 2-propanol; 6 – ethanol;
7 – 1-propanol; 8 – isobutyl alcohol; 9 – 1-butanol; 10 – 3-methyl-1-butanol

Калибровочные характеристики, выражающие зависимость отношений площадей пиков i -го вещества и этанола от отношений концентраций (мг/л АА) i -го вещества и этанола, устанавливались по смеси РВЭ-С и рассчитывались с помощью формулы

$$RRF_{il}^{\text{Eth}} = \frac{C_i^{\text{st}}}{C_{\text{Eth}}^{\text{st}}} \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M \left(\frac{A_{\text{Eth},nl}^{\text{st}}}{A_{i,nl}^{\text{st}}} \right),$$

где RRF_{il}^{Eth} – относительный фактор отклика (калибровочная характеристика) i -го компонента на этанол, полученный в l -й лаборатории; C_i^{st} и $C_{\text{Eth}}^{\text{st}}$ – концентрации i -го компонента и этанола в измеряемом стандартном образце РВЭ-С соответственно, мг/л АА; $A_{i,nl}^{\text{st}}$ и $A_{\text{Eth},nl}^{\text{st}}$ – величины отклика детектора на i -й компонент и этанол соответственно при n -м измерении испытуемого стандартного образца РВЭ-С в l -й лаборатории (произвольные единицы); M – количество измерений стандартного образца ($M \geq 3$).

Концентрации i -го компонента в j -м образце для n -го измерения в l -й лаборатории рассчитывались как

$$C_{ijnl} = RRF_{il}^{\text{Eth}} \frac{A_{ijnl}}{A_{\text{Eth}, jnl}} \rho_{\text{Eth}}, \quad (1)$$

где A_{ijnl} и $A_{\text{Eth}, jnl}$ – величины отклика детектора на i -й компонент и этанол соответственно при n -м измерении в j -м стандартном образце l -й лаборатории (произвольные единицы); ρ_{Eth} – плотность этанола (789 300 мг/л). Концентрация выбранного внутреннего стандарта, представленная в виде отношения массы этилового спирта к его объему, в любом исследуемом образце является постоянной величиной и равна плотности этанола.

Статистическая обработка результатов

Экспериментальные данные, полученные от участников МЛИ, были предварительно проверены на наличие статистических выбросов в соответствии с критериями Кохрена и Граббса [12]. Техническая компетентность лабораторий оценивалась с помощью z -критерия, который рассчитывался по формуле [13]

$$z_{ijl} = \frac{\bar{C}_{ijl} - \mu_{ij}}{s_{ijl}},$$

где $\bar{C}_{ijl} = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M C_{ijnl}$; μ_{ij} – принятое эталонное значение (известное значение концентрации экспериментального образца), мг/л АА;

$$s_{ijl} = \frac{1}{M-1} \sum_{n=1}^M (\bar{C}_{ijl} - \bar{C}_{ij})^2,$$

$$\bar{C}_{ij} = \frac{1}{P} \sum_{l=1}^P \bar{C}_{ijl},$$

здесь P – количество лабораторий, принявших участие в межлабораторных испытаниях метода ($P = 9$).

При оценке прецизионности для каждого уровня концентраций вычисляли дисперсию повторяемости s_r^2 , межлабораторную дисперсию s_L^2 и дисперсию воспроизводимости s_R^2 согласно формулам [12]

$$s_{r_{ij}}^2 = \frac{\sum_{l=1}^P (n_{ijl} - 1) s_{ijl}^2}{\sum_{l=1}^P (n_{ijl} - 1)},$$

где n_{ijl} – количество измерений i -го компонента в j -м образце в l -й лаборатории,

$$s_{L_{ij}}^2 = \frac{s_{d_{ij}}^2 - s_{r_{ij}}^2}{\bar{n}_{ij}},$$

здесь

$$s_{d_{ij}}^2 = \frac{1}{P-1} \left(\sum_{l=1}^P n_{ijl} \bar{C}_{ijl}^2 - \bar{C}_{ij}^2 \sum_{l=1}^P n_{ijl} \right); \quad \bar{n}_{ij} = \frac{1}{P-1} \left(\sum_{l=1}^P n_{ijl} - \frac{\sum_{l=1}^P n_{ijl}^2}{\sum_{l=1}^P n_{ijl}} \right),$$

$$s_{R_{ij}}^2 = s_{r_{ij}}^2 + s_{L_{ij}}^2.$$

Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r и прецизионности RSD_R находили (в процентах) как

$$RSD_{r_{ij}} = \frac{s_{r_{ij}}}{\bar{C}_{ij}} \cdot 100,$$

$$RSD_{R_{ij}} = \frac{s_{R_{ij}}}{\bar{C}_{ij}} \cdot 100,$$

пределы повторяемости r и прецизионности R – как

$$r_{ij} = f(n) RSD_{r_{ij}},$$

$$R_{ij} = f(n)RSD_{R_{ij}},$$

где $f(n)$ – коэффициент критического диапазона, зависящий от доверительного уровня вероятности и закона распределения случайной величины, значения которого приведены в ИСО 5725-6 [12, табл. 1].

Линейность отклика проверяли путем измерения всех стандартных образцов, кроме калибровочного образца РВЭ-С. Коэффициент аппроксимации для каждого анализируемого компонента определяли методом наименьших квадратов при помощи программы *Origin Pro 9.5*. Сравнение экспериментальных и прогнозируемых значений повторяемости и воспроизводимости метода проводили с использованием индексов Горвица. Для этого рассчитывали прогнозные относительные стандартные отклонения воспроизводимости $RSD_{R(H)}$ и повторяемости $RSD_{r(H)}$ по Горвицу [14]:

$$RSD_{R(H)_{ij}} = 2^{1-0,5\ln\bar{C}_{ij}},$$

$$RSD_{r(H)_{ij}} = 0,66RSD_{R(H)_{ij}},$$

где \bar{C}_{ij} – измеренная концентрация i -го компонента в j -м стандартном образце, выраженная безразмерной величиной (например, 1 г/100 г = 0,01).

Индексы $Horrat_r$ и $Horrat_R$ вычисляли по формулам [14]

$$Horrat_{r_{ij}} = \frac{RSD_{r_{ij}}}{RSD_{r(H)_{ij}}},$$

$$Horrat_{R_{ij}} = \frac{RSD_{R_{ij}}}{RSD_{R(H)_{ij}}}.$$

Если величина $Horrat_r$ или $Horrat_R$ превышала 2, результат считался неприемлемым.

Оценка правильности метода была выполнена на основании абсолютного $\hat{\delta}$ и относительного δ (в процентах) смещений метода и вариации оценки смещения $s_{\hat{\delta}}^2$ [12]:

$$\hat{\delta}_{ij} = \bar{C}_{ij} - \mu_{ij},$$

$$\delta_{ij} = \frac{\hat{\delta}_{ij}}{\mu_{ij}} \cdot 100,$$

$$s_{\hat{\delta}_{ij}}^2 = \frac{1}{P} \left(s_{R_{ij}}^2 - \left(1 - \frac{1}{n_{ij}} \right) s_{r_{ij}}^2 \right).$$

Оценка стандартной u и расширенной U неопределенностей выполнялась по формулам [13]

$$u_{ij} = \sqrt{s_{R_{ij}}^2 + s_{\hat{\delta}_{ij}}^2 + u_{ref_{ij}}^2 + \delta_{ij}^2},$$

$$U_{ij} = k u_{ij},$$

где $u_{ref_{ij}}$ – неопределенность массовой концентрации стандартного образца; k – коэффициент охвата ($k = 2$).

Результаты и их обсуждение

В табл. 2 представлены основные метрологические характеристики метода, рассчитанные по результатам испытаний в 9 лабораториях стандартных образцов РВЭ-В, РВЭ-Д, РВЭ-1 и РВЭ-2.

Анализ на выбросы выявил: 3 выброса по одностороннему критерию Граббса для метилацетата, этилацетата и изоамилола в образце РВЭ-2; 1 выброс по одностороннему критерию Граббса для этилацетата и 1 разброс по критерию Кохрена для метилацетата в образце РВЭ-1; 2 выброса по одностороннему критерию Граббса для метанола и 1-пропанола и 1 разброс по критерию Кохрена для изоамилола в образце РВЭ-Д и 4 статистических выброса по одностороннему критерию Граббса для метанола, 1-пропанола, 1-бутанола и изоамилола в образце РВЭ-В. Аналогичный анализ по двустороннему критерию Граббса не выявил разбросов или статистических выбросов.

Расчитанные метрологические характеристики метода

Table 2

Calculated metrological properties of the method

Статистический параметр	Ацетальдегид	Метилацетат	Этилацетат	Метанол	2-Пропанол	1-Пропанол	Изобутанол	1-Бутанол	Изоамилол
Образец РВЭ-В									
Среднее, мг/л АА	412	429	421	424	406	418	430	417	412
Предел межлабораторной повторяемости r , %	3,4	3,4	3,7	1,6	0,8	0,7	0,9	0,4	1,4
Предел межлабораторной воспроизводимости R , %	4,5	4,5	4,9	2,2	1,1	1,0	1,3	0,5	1,9
Относительное смещение δ , %	-2,0	2,4	-2,1	0,5	0,1	-0,2	-0,9	-0,1	-0,7
Относительная расширенная неопределенность U , % ($P = 0,95, k = 2$)	6,9	6,9	7,0	6,2	6,1	6,0	6,1	6,0	6,2
Образец РВЭ-Д									
Среднее, мг/л АА	182	182	189	198	180	186	191	185	183
Предел межлабораторной повторяемости r , %	6,0	6,7	6,0	0,9	2,0	0,7	3,8	4,9	1,9
Предел межлабораторной воспроизводимости R , %	8,0	9,0	8,1	1,2	2,7	0,9	5,1	6,6	2,6
Относительное смещение δ , %	-0,3	-0,2	0,2	0,1	0,1	-0,1	0,1	0,0	0,2
Относительная расширенная неопределенность U , % ($P = 0,95, k = 2$)	8,5	9,0	8,5	6,1	6,3	6,0	7,1	7,7	6,3
Образец РВЭ-1									
Среднее, мг/л АА	47,7	45,1	48,1	59,7	46,5	47,6	48,9	47,1	46,9
Предел межлабораторной повторяемости r , %	4,6	2,8	5,6	5,7	3,9	2,8	3,2	4,5	3,5
Предел межлабораторной воспроизводимости R , %	6,2	3,8	7,8	7,6	5,2	3,9	4,2	6,0	4,6
Относительное смещение δ , %	-0,1	-0,7	0,5	-0,2	0,4	-0,5	0,1	-0,2	-0,1
Относительная расширенная неопределенность U , % ($P = 0,95, k = 2$)	7,6	6,6	8,4	8,2	7,2	6,7	6,8	7,5	6,9
Образец РВЭ-2									
Среднее, мг/л АА	10,5	8,6	9,3	22,7	10,1	9,7	9,6	9,2	9,2
Предел межлабораторной повторяемости r , %	7,5	4,6	4,6	6,7	4,8	6,5	4,4	4,8	6,1
Предел межлабораторной воспроизводимости R , %	10,0	6,3	6,3	8,9	6,4	8,5	5,9	6,3	8,3
Относительное смещение δ , %	-1,8	-0,6	-1,2	0,3	-0,3	0,4	-0,5	-0,3	-0,5
Относительная расширенная неопределенность U , % ($P = 0,95, k = 2$)	9,5	7,6	7,6	9,0	7,7	8,8	7,4	7,6	8,6

Таблица 3

Коэффициенты аппроксимации, полученные
при проверке линейности метода

Table 3

Determination coefficients established
during testing of method linearity

Компонент	Участник								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ацетальдегид	0,9999	0,9992	0,9999	0,9999	0,9962	0,9988	0,9999	0,9993	0,9999
Метилацетат	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9968	0,9989	0,9999	0,9993	0,9999
Этилацетат	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9963	0,9988	0,9999	0,9992	0,9999
Метанол	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9956	0,9988	0,9999	0,9991	0,9999
2-Пропанол	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9963	0,9988	0,9999	0,9993	–
1-Пропанол	0,9999	0,9993	0,9999	0,9999	0,9962	0,9989	0,9999	0,9993	0,9999
Изобутанол	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9962	0,9988	0,9999	0,9993	0,9999
1-Бутанол	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9961	0,9989	0,9999	0,9993	0,9999
Изоамилол	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9961	0,9989	0,9999	0,9993	0,9999

Проверка линейности метода в диапазоне 10–400 мг/л АА показала, что значения коэффициентов аппроксимации не ниже 0,995 (табл. 3), и это полностью отвечает требованиям регламента OIV [1] и Еврокомиссии ЕС 2870/2000 [2].

Качество полученных лабораториями результатов, оцененное по z -критерию, является удовлетворительным (z -критерии принимали значения в интервале $[-2; 2]$), за исключением случаев, ранее удаленных как выбросы по критериям Кохрена и Граббса.

Сравнение итогов испытаний и прогнозируемых величин относительных стандартных отклонений концентраций по уравнению Горвица свидетельствует о том, что ни одно из значений критериев $Horrat$, и $Horrat_r$ не превысило 2: это указывает на хорошую межлабораторную прецизионность метода.

В выполненном межлабораторном эксперименте впервые была получена оценка правильности метода определения летучих компонентов в алкогольной продукции. Смещение предложенного метода является незначимым при уровне значимости 5 %. Расширенная относительная неопределенность метода не превысила 10 %.

В соответствии с требованиями ГОСТ ISO/IEC 17025-2017 необходимое условие применения метода в рутинной лабораторной практике – его валидация. Важно обратить внимание на то, что предложенный способ может быть валидирован в одной лаборатории на основании результатов валидации традиционного метода внутреннего стандарта. При этом не требуется никаких дополнительных данных или измерений.

В качестве примера приведем алгоритм валидации предложенного метода в одной лаборатории с применением исходных данных, полученных при валидации традиционного метода внутреннего стандарта [15].

Стандартные растворы «0,05», «0,1», «0,5», «1,0» и «2,0» были приготовлены (и соответствующим образом обозначены) согласно п. 5.14.6 регламента OIV [1]. Для расчета калибровочных коэффициентов по традиционному методу внутреннего стандарта и предложенному методу использовались результаты измерений для раствора «1,0», полученные путем валидации традиционного метода внутреннего стандарта [15].

Калибровочные коэффициенты по предложенному методу вычисляли согласно формуле

$$RRF_i^{\text{Eth}} = \frac{C_i^{\langle 1,0 \rangle} A_{\text{Eth}}^{\langle 1,0 \rangle}}{C_{\text{Eth}}^{\langle 1,0 \rangle} A_i^{\langle 1,0 \rangle}},$$

где RRF_i^{Eth} – относительный фактор отклика i -го компонента на этанол; $C_i^{\langle 1,0 \rangle}$ и $C_{\text{Eth}}^{\langle 1,0 \rangle}$ – концентрации i -го компонента и этанола в измеряемом стандартном растворе «1,0» соответственно, мг/л АА; $A_i^{\langle 1,0 \rangle}$ и $A_{\text{Eth}}^{\langle 1,0 \rangle}$ – найденные в результате трехкратных измерений стандартного раствора «1,0» средние значения откликов детектора на i -й компонент и этанол соответственно (произвольные единицы).

Калибровочные коэффициенты по методу традиционного стандарта определяли как

$$RRF_i^{\text{Trad}} = \frac{C_i^{*«1,0»}}{C_{3\text{-pentanol}}^{*«1,0»}} \frac{A_{3\text{-pentanol}}^{«1,0»}}{A_i^{«1,0»}},$$

где RRF_i^{Trad} – относительный фактор отклика i -го компонента на 3-пентанол; $C_i^{*«1,0»}$ и $C_{3\text{-pentanol}}^{*«1,0»}$ – концентрации i -го компонента и 3-пентанола в измеряемом стандартном растворе «1,0» соответственно, мг/л; $A_{3\text{-pentanol}}^{«1,0»}$ – среднее значение отклика детектора на 3-пентанол, вычисленное по результатам трехкратных измерений стандартного раствора «1,0» (произвольные единицы).

Полученные значения калибровочных коэффициентов для обоих методов приведены в табл. 4.

Таблица 4

**Результаты определения калибровочных коэффициентов
для двух методов внутреннего стандарта**

Table 4

**Calibration coefficients determination results
for two methods of internal standard**

Компонент	Концентрация калибровочного раствора «1,0»		Среднее значение отклика, отн. ед.	RRF^{Eth}	RRF^{Trad}
	мг/л	мг/л АА			
Ацетальдегид	200	501	9,489	1,319	2,011
Метилацетат	261	652	9,406	1,733	2,642
Этилацетат	264	660	12,940	1,275	1,945
Метанол	231	577	10,122	1,427	2,175
Этанол	315 720	789 300	19,744	1,000	1,525
2-Бутанол	237	593	19,097	0,777	1,184
1-Пропанол	231	576	18,108	0,796	1,214
Изобутанол	238	595	22,031	0,676	1,030
3-Пентанол	233	583	22,234	0,656	1,000
1-Бутанол	240	600	21,042	0,713	1,087
2-Метил-1-бутанол	234	585	22,322	0,656	1,000
Изоамилол	232	581	22,590	0,643	0,980

Концентрации летучих компонентов (в процентах) в стандартных растворах «0,05», «0,1», «0,5» и «2,0» в случае предложенного метода были рассчитаны по формуле (1), а для традиционного метода внутреннего стандарта – по формуле

$$C_i^{\text{sample}}(\text{Trad}) = RRF_i^{\text{Trad}} \frac{A_i^{\text{sample}}}{A_{3\text{-pentanol}}^{\text{sample}}} \frac{C_{3\text{-pentanol}}^{\text{sample}}}{H} \cdot 100,$$

где A_i^{sample} и $A_{3\text{-pentanol}}^{\text{sample}}$ – отклики детектора на i -й компонент и 3-пентанол в хроматограмме испытуемого образца (произвольные единицы); $C_{3\text{-pentanol}}^{\text{sample}}$ – концентрация 3-пентанола в испытуемом образце, мг/л; H – объемное содержание этанола в испытуемом образце, %.

Проверка линейности отклика детектора выполнялась с использованием стандартных растворов «0,05», «0,1», «0,5» и «2,0». Коэффициенты аппроксимации для всех исследуемых компонентов в случаях традиционного и предложенного методов были не ниже 0,998 1 и 0,999 9 соответственно. Полученные значения относительных стандартных отклонений повторяемости для обоих методов приведены в табл. 5. Анализ экспериментальных результатов показывает, что прецизионность метода с использованием этанола в качестве внутреннего стандарта по крайней мере не хуже традиционного метода внутреннего стандарта, поскольку соответствующие величины относительного стандартного отклонения оказались, как правило, ниже.

Таблица 5

Относительные стандартные отклонения повторяемости нового (I) и традиционного (II) методов для образцов «0,05», «0,1», «0,5» и «2,0» согласно п. 5.14.6 регламента OIV [1], %

Table 5

Relative standard deviations of repeatability calculated for the novel (I) and traditional (II) methods in «0.05», «0.1», «0.5» and «2.0» samples in accordance with item 5.14.6 of the OIV legislation [1], %

Компонент	«0,05»		«0,1»		«0,5»		«2,0»	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ацетальдегид	4,3	4,1	1,8	2,0	0,4	0,2	0,9	1,0
Метилацетат	2,6	2,9	2,1	2,2	0,3	0,2	1,4	1,5
Этилацетат	3,5	3,8	0,9	1,1	0,5	0,6	1,2	1,3
Метанол	2,8	3,0	2,9	3,2	0,4	0,2	0,1	0,2
2-Бутанол	2,6	2,4	0,6	0,8	0,6	0,9	0,1	0,3
1-Пропанол	3,9	3,8	1,7	2,0	0,2	0,3	0,2	0,3
Изобутанол	5,6	5,8	1,8	2,1	0,4	0,3	0,1	0,2
1-Бутанол	0,4	0,7	0,3	0,5	0,4	0,3	0,1	0,2
2-Метил-1-бутанол	3,9	4,2	0,4	0,7	0,3	0,5	0,3	0,3
Изоамилол	4,8	5,0	0,7	0,9	0,6	0,8	0,3	0,2

Как видно из рис. 2, абсолютное значение относительного смещения метода «этанол в качестве внутреннего стандарта» не превысило 10 % для всех исследуемых летучих компонентов, в случае традиционного метода внутреннего стандарта – 12 %.

Работоспособность предложенного метода была продемонстрирована на примере анализа образцов реальных алкогольных напитков: вина, бренди, ракии и виски. Для этого экспериментальные данные, полученные в [15], были обработаны как по традиционному методу внутреннего стандарта в соответствии с [1], так и по предложенному методу [7–9]. На рис. 3 приведены хроматограммы алкоголей.

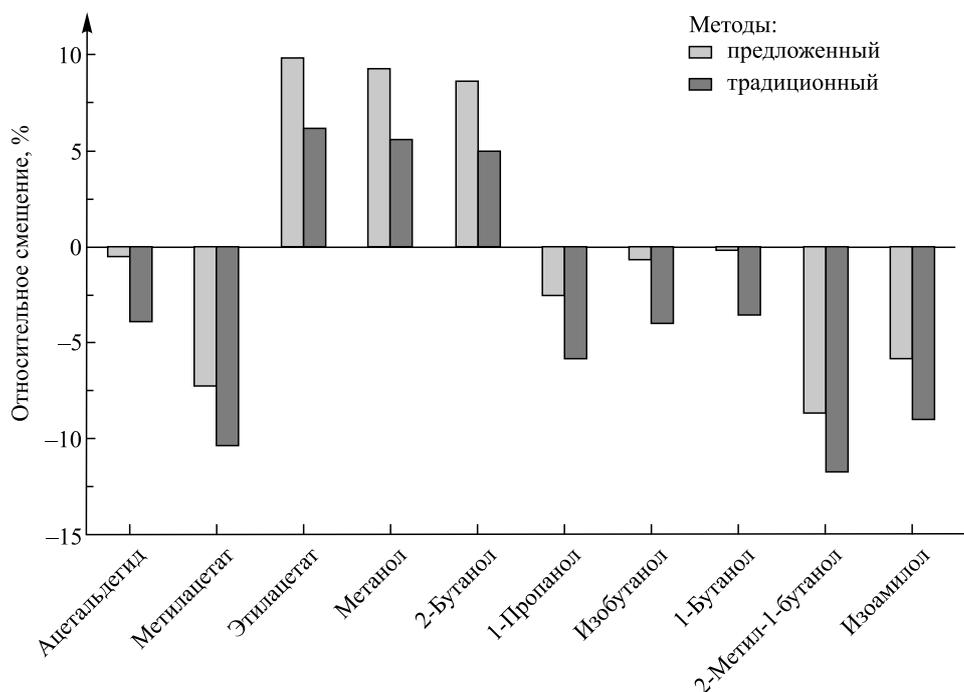


Рис. 2. Диаграмма сравнения относительных смещений двух методов внутреннего стандарта на примере раствора «0,05»

Fig. 2. The comparative histogram of relative biases (%) of two methods of internal standard through the example of «0.05» sample

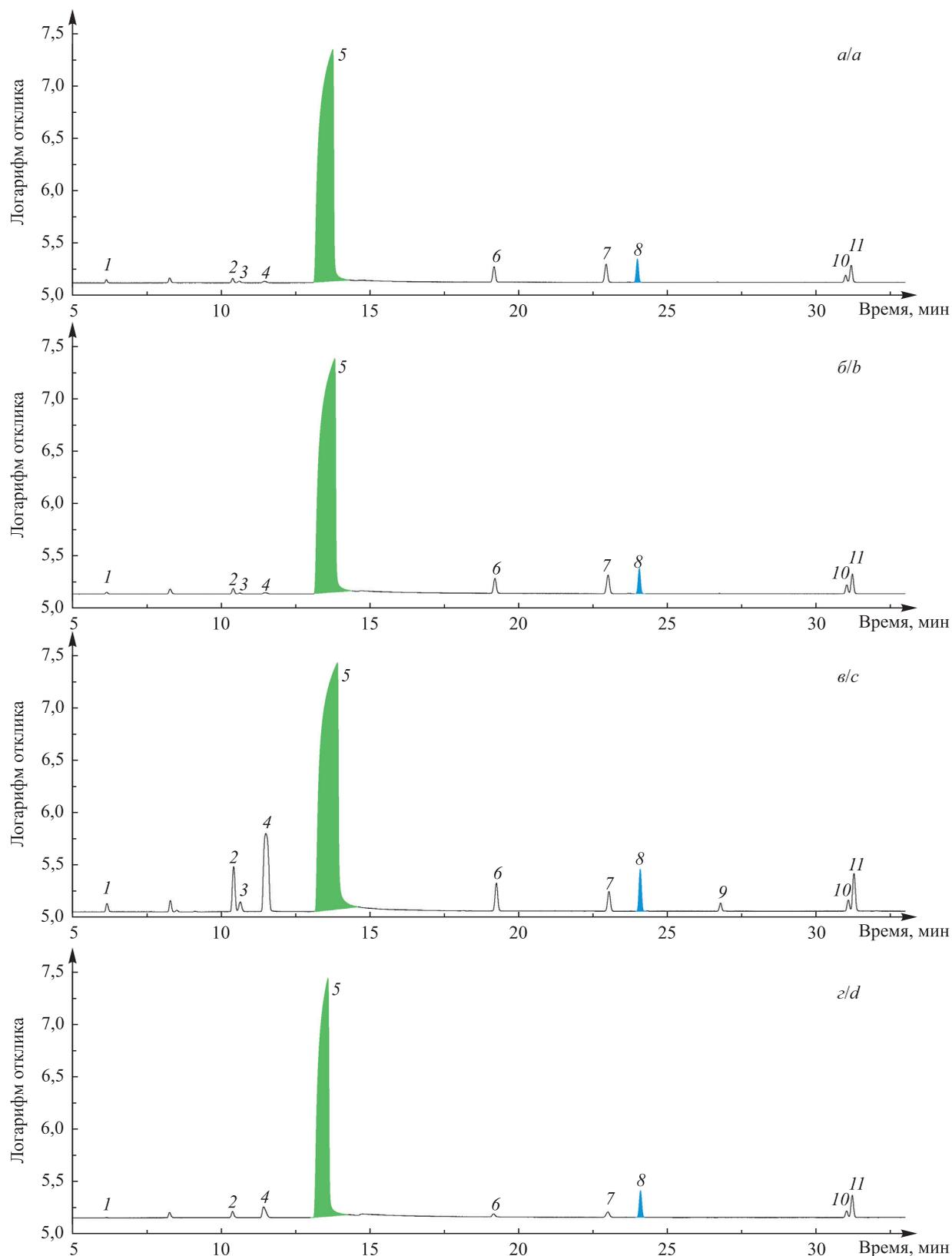


Рис. 3. Хроматограммы образцов бренди (а), виски (б), ракии (в) и вина (г):
1 – ацетальдегид; 2 – этилацетат; 3 – ацеталь; 4 – метанол; 5 – этанол; 6 – 1-пропанол; 7 – изобутанол;
8 – 3-пентанол; 9 – 1-бутанол; 10 – 2-метил-1-бутанол; 11 – 3-метил-1-бутанол

Fig. 3. Chromatograms of samples of brandy (a), whiskey (b), rakia (c) and wine (d):
1 – acetaldehyde; 2 – ethyl acetate; 3 – acetal; 4 – methanol; 5 – ethanol; 6 – 1-propanol; 7 – isobutyl alcohol;
8 – 3-pentanol; 9 – 1-butanol; 10 – 2-methyl-1-butanol; 11 – 3-methyl-1-butanol

Таблица 6

**Концентрации летучих компонентов в напитках,
измеренные новым (I) и традиционным (II) методами
внутреннего стандарта, мг/л АА**

Table 6

**Mass concentration values of volatile compounds established
with the novel (I) and traditional (II) internal standard methods
for the purchased spirits, mg/L AA**

Компонент	Вино		Бренди		Ракия		Виски	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ацетальдегид	40,9	42,3	99,1	102,4	134,7	137,2	55,9	58,3
Этилацетат	430,7	444,7	145,8	150,6	1103,5	1128,6	170,9	178,3
Ацеталь	–	–	46,9	48,4	118,4	121,3	23,8	24,8
Метанол	1213,2	1252,5	88,3	91,3	6202,4	6274,3	71,1	74,2
1-Пропанол	149,0	153,8	412,6	426,4	351,4	360,0	352,3	367,6
Изобутанол	250,9	259,1	419,4	433,5	196,9	202,6	406,4	424,1
2-Метил-1-бутанол	207,7	214,4	108,8	112,4	75,9	77,4	146,5	152,9
Изоамилол	850,2	877,8	329,4	340,4	423,2	434,7	369,4	385,6

Рассчитанные по двум методам концентрации летучих компонентов приведены в табл. 6. На основании *t*-критерия Стьюдента было установлено, что разность между средними результатами двух полученных выборок для всех четырех образцов алкогольной продукции статистически незначима при доверительной вероятности 0,95.

Выводы

Из анализа результатов межлабораторных испытаний метода прямого количественного определения летучих компонентов в алкогольной и этанолсодержащей продукции, основанного на применении этанола в качестве внутреннего стандарта, следует, что данный способ отличается высокой прецизионностью, правильностью и по своим метрологическим характеристикам как минимум не уступает традиционному методу, в котором внутренним стандартом служит 3-пентанол. Кроме того, предложенный метод является более простым, менее затратным и исключает источники погрешностей, связанные с процедурами приготовления и ручного введения внутреннего стандарта в анализируемые образцы и стандартные растворы, что обуславливает перспективность его практического использования, в том числе в качестве референтного на международном уровне. Теоретические основы метода, результаты его испытаний, компьютерные программы и иные относящиеся к нему вспомогательные материалы представлены в свободном доступе в сети Интернет [16].

Продемонстрированные достоинства метода являются основанием для инициирования международных испытаний под патронажем OIV в целях последующей рекомендации регулирующим органам предложенного способа в качестве референтного.

Библиографические ссылки

1. Determination of the principal volatile substances of spirit drinks of viti-vinicultural origin. Method: OIV-MA-BS-14: R2009. In: *Compendium of international methods of spirituous beverages of vitivinicultural origin*. Paris: International Organisation of Vine and Wine; 2019.
2. Community reference methods for the analysis of spirits drinks: EC 2870/2000. Brussels: The commission of the European Communities; 2002. 47 p.
3. ГОСТ 30536-2013. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей. Межгосударственный стандарт. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации; 2013. 21 с.

4. ГОСТ 31684-2012. Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения содержания летучих органических примесей. Межгосударственный стандарт. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации; 2012. 16 с.
5. ГОСТ 33834-2016. Продукция винодельческая и сырье для ее производства. Газохроматографический метод определения массовой концентрации летучих компонентов. Межгосударственный стандарт. Минск: Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации; 2016. 15 с.
6. ГОСТ 33408-2015. Коньяки, дистилляты коньячные, бренди. Определение содержания альдегидов, эфиров и спиртов методом газовой хроматографии. Минск: Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации; 2015. 18 с.
7. Charapitsa SV, Sytova SN, Korban AL, Sobolenko LN. Single-Laboratory Validation of a Gas Chromatographic Method of Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks: Need for an Improved Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 2019;102(2):669–672. DOI: 10.5740/jaoacint.18-0258.
8. Charapitsa S, Sytova S, Korban A, Boyarin N, Shestakovich I, Čabal R. The Establishment of Metrological Characteristics of the Method «Ethanol as Internal Standard» for the Direct Determination of Volatile Compounds in Alcoholic Products. *Journal of Chemical Metrology*. 2018;12(1):59–69. DOI: 10.25135/jcm.14.18.02.063.
9. Charapitsa SV, Kavalenka AN, Kulevich NV, Makoed NM, Mazanik AL, Sytova SN, et al. Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(12):2950–2956. DOI: 10.1021/jf3044956.
10. Kelly J, Chapman S, Brereton P, Bertrand A, Guillou C, Wittkowski R. Gas Chromatographic Determination of Volatile Congeners in Spirit Drinks: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 1999;82(6):1375–1388.
11. ASTM D4307-99. Standard practice for preparation of liquid blends for use as analytical standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1999.
12. ИСО 5725-1994. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Части 1–6. Минск: Госстандарт Республики Беларусь; 2002.
13. EUROLAB Technical Report 1/2007. Measurement uncertainty revisited: alternative approaches to uncertainty evaluation. Paris: EUROLAB; 2007.
14. AOAC Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. Geneva: AOAC; 2002.
15. Yilmaztekin M, Cabaroglu T. Confirmatory Method for the Determination of Volatile Congeners and Methanol in Turkish Raki According to European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC International*. 2011;94(2):611–617.
16. Метод «Этанол – внутренний стандарт» [Интернет]. 2019 [процитировано 13 сентября 2019 г.]. Доступно по: <http://www.inp.bsu.by/ethanol/en/index.html>.

References

1. Determination of the principal volatile substances of spirit drinks of viti-vinicultural origin. Method: OIV-MA-BS-14: R2009. In: *Compendium of international methods of spirituous beverages of vitivinicultural origin*. Paris: International Organisation of Vine and Wine; 2019.
2. Community reference methods for the analysis of spirits drinks: EC 2870/2000. Brussels: The Commission of the European Communities; 2002. 47 p.
3. GOST 30536-2013. Interstate Standard 30536-2013. Vodka and ethyl alcohol from food raw materials. Gas chromatographic express method for determining the content of toxic microimpurities. Moscow: Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification; 2013. 21 p. Russian.
4. ГОСТ 31684-2012. State Standard 31684-2012. Raw ethyl alcohol from food raw materials. Gas chromatographic method for determining the content of volatile organic impurities. Moscow: Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification; 2012. 16 p. Russian.
5. GOST 33834-2016. Interstate Standard 33834-2016. Wine production and raw materials for its production. Gas chromatographic method for determining the mass concentration of volatile components. Minsk: Eurasian Council for Standardization, Metrology and Certification; 2016. 15 p. Russian.
6. GOST 33408-2015. State Standard 33408-2015. Cognac, cognac distillates, brandy. Determination of aldehydes, esters and alcohols by gas chromatography. Minsk: Eurasian Council for Standardization, Metrology and Certification; 2015. 18 p. Russian.
7. Charapitsa SV, Sytova SN, Korban AL, Sobolenko LN. Single-Laboratory Validation of a Gas Chromatographic Method of Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks: Need for an Improved Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 2019;102(2):669–672. DOI: 10.5740/jaoacint.18-0258.
8. Charapitsa S, Sytova S, Korban A, Boyarin N, Shestakovich I, Čabal R. The Establishment of Metrological Characteristics of the Method «Ethanol as Internal Standard» for the Direct Determination of Volatile Compounds in Alcoholic Products. *Journal of Chemical Metrology*. 2018;12(1):59–69. DOI: 10.25135/jcm.14.18.02.063.
9. Charapitsa SV, Kavalenka AN, Kulevich NV, Makoed NM, Mazanik AL, Sytova SN, et al. Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(12):2950–2956. DOI: 10.1021/jf3044956.
10. Kelly J, Chapman S, Brereton P, Bertrand A, Guillou C, Wittkowski R. Gas Chromatographic Determination of Volatile Congeners in Spirit Drinks: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. 1999;82(6):1375–1388.
11. ASTM D4307-99. Standard practice for preparation of liquid blends for use as analytical standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1999.
12. ISO 5725-1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Parts 1–6. Minsk: The State Committee for Standardization of the Republic of Belarus; 2002. Russian.

13. EUROLAB Technical Report 1/2007. Measurement uncertainty revisited: alternative approaches to uncertainty evaluation. Paris: EUROLAB; 2007.

14. AOAC Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. Geneva: AOAC; 2002.

15. Yilmaztekin M, Cabaroglu T. Confirmatory Method for the Determination of Volatile Congeners and Methanol in Turkish Raki According to European Union Regulation (EEC) No. 2000R2870: Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC International*. 2011; 94(2):611–617.

16. Method «Ethanol as Internal Standard» [Internet]. 2019 [cited 2019 September 13]. Available from: <http://www.inp.bsu.by/ethanol/en/index.html>.

*Статья поступила в редколлегию 28.10.2019.
Received by editorial board 28.10.2019.*