

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра аналитической химии

КОРБАН Антон Леонидович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА СЛОЖНЫХ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ**

Магистерская диссертация

специальность 1-31 80 06 «Химия»

Научный руководитель Черепица Сергей
Вячеславович
кандидат физико-математических наук

Допущена к защите
« ___ » _____ 2019 г.
Зав. кафедрой аналитической химии
_____ М. Ф. Заяц
кандидат химических наук

Минск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Параметры качества алкогольной продукции	8
1.2 Традиционные методы определения летучих примесей	9
1.2.1 Внешнего стандарта.....	9
1.2.2 Внутреннего стандарта.....	11
1.2.3 Другие методы.....	12
1.3 Существующие проблемы	12
1.3.1 Видимая крепость.....	12
1.3.2 Импортные ГСО.....	15
1.3.2.1 Монополист на белорусском рынке.....	16
1.3.2.2 Нюансы практического использования.....	16
1.3.2.3 Необоснованность аттестованных характеристик.....	17
1.4 Метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта»	18
1.4.1 Валидация метода на основании ранее полученных данных.....	19
1.4.1.1 Калибровка.....	20
1.4.1.2 Анализ испытуемого образца.....	21
1.4.1.3 Определение метрологических параметров.....	21
1.4.2 Использование метода в рутинной практике.....	22
1.5 Возможность применения метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» в ГХ-МС	22
1.5.1 Распространение технологии.....	22
1.5.2 Регистрация этанола.....	23
1.5.3 Режимы регистрации ионов.....	24
1.5.4 Использование иона с m/z 47.....	28
ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА	29
2.1 Валидация метода в одной лаборатории на ГХ-ПИД	29
2.1.1 Приготовление стандартных образцов.....	29

2.1.2	Параметры оборудования.....	31
2.1.3	Определяемые метрологические характеристики	31
2.2	Исследование метода на ГХ-МС	32
2.2.1	Приготовление стандартных образцов	32
2.2.2	Параметры оборудования.....	33
2.3	Установление неопределенностей измерений	33
ГЛАВА 3.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	35
3.1	Валидация метода в одной лаборатории	35
3.2	Валидация метода на основании ранее полученных данных	38
3.3	Исследование метода на ГХ-МС	44
3.3.1	Описание SIM метода. Примеры получаемых хроматограмм	44
3.3.2	Калибровка прибора	46
3.3.3	Оценка метрологических характеристик.....	47
3.3.4	Линейность	50
3.3.4.1	Варьируемое содержание примесей при фиксированном содержании этанола	50
3.3.4.2	Варьируемое содержание этанола и примесей	51
3.3.4.3	Варьируемое содержание этанола.....	52
3.3.5	Измерение реальных образцов алкогольной продукции	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	59

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНИИПБТ – Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии

ВЭС – водно-этанольная смесь

ГСО – государственный стандартный образец

ГХ-МС – газовая хроматография, сопряженная в масс-спектрометрическим детектированием

Крепость – объемное содержание этанола

НИИ ЯП БГУ – Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета

ОСКО – Относительное среднеквадратическое отклонение

МИ – методика измерений

МСО – межгосударственный стандартный образец

РВЭ – раствор водно-этанольный

СО – стандартный образец

АА – в пересчете на безводный этанол (absolute alcohol)

Ethanol или Eth – этанол

IS – внутренний стандарт (Internal Standard)

m/z – масс-зарядное отношение

LOQ – Limit of Quantification

RF – коэффициент отклика (Response Factor)

RRF – относительный коэффициент отклика (Relative Response Factor)

SIM – Selected Ion Monitoring

TIC – Total Ion Current

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Перечень ключевых слов: АЛКОГОЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ, ЛЕТУЧИЕ КОМПОНЕНТЫ, КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ, РЕФЕРЕНТНЫЙ МЕТОД.

Цель работы – валидация референтного метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта», проверка его работоспособности на ГХ-МС.

Высокая актуальность работы обусловлена объемами производства алкогольной продукции в мире, включающей в себя не только напитки, но также дистилляты для их производства и абсолютный этиловый спирт, используемый в медицинской и фармацевтической деятельности.

Объект исследования – этанолсодержащая продукция, определение летучих примесей в которой осуществляется газовой хроматографии.

Предмет исследования – метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» для прямого количественного определения летучих компонентов.

Представлены результаты валидации метода в одной лаборатории и результаты валидации на основании измерений, выполненных ранее при валидации традиционного метода внутреннего стандарта. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный метод по своим характеристикам не уступает традиционно используемому методу внутреннего стандарта. В то же время метод является менее время-, материало- и трудозатратным среди всех известных методов количественного определения летучих примесей в алкогольной продукции.

Впервые представлены результаты успешного использования основного компонента в качестве вещества внутреннего стандарта на ГХ-МС системах.

В главе 1 представлен аналитический обзор литературы по количественному определению летучих примесей в алкогольной продукции и обсуждены ограничения существующих методов анализа. Представлен инновационный метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта». Обсуждена возможность применения метода на ГХ-МС системах. В главе 2 описаны методики приготовления стандартных образцов для установления метрологических характеристик метода и методики проведения исследований. Глава 3 посвящена описанию и обсуждению результатов, полученных в ходе валидации метода, а также его апробации на ГХ-МС приборе.

Объем магистерской диссертации составляет X страниц. В работе содержится X рисунков на X страницах, X таблиц, занимающих X страницы. В ходе написания магистерской диссертации было использовано X литературных источников. Результаты исследований, проведенных в рамках написания магистерской диссертации, опубликованы в X работах.

ВВЕДЕНИЕ

Абсолютное большинство химических и физико-химических анализов связано с исследованием многокомпонентных смесей. Установление качественного и количественного состава смеси играет ведущую роль в оценке качества продукции, используемой в различных областях науки и производства.

Данная диссертационная работа посвящена конкретной области – анализу качества и безопасности алкогольной продукции, употребление которой – повсеместное и широко встречаемое явление во всем мире. Любая единица алкогольной продукции, будь то алкогольный напиток, дистиллят для его производства или этиловый спирт для медицинских целей содержит в своем составе некоторые количества летучих компонентов (токсичных микропримесей), которые чаще всего представляют собой спирты, альдегиды и эфиры. Содержание токсичных микропримесей строго нормировано, и даже незначительного превышения их концентраций достаточно, чтобы в той или иной степени повлиять на органолептические показатели напитка. Кроме влияния на вкусоароматические качества, летучие примеси также представляют угрозу человеческому организму, поскольку многие из них токсичны. Наиболее печально известными примерами являются метанол и ацетальдегид.

Определение содержания летучих компонентов в алкогольной продукции выполняют методом газовой хроматографии. В соответствии с нормативными национальными и международными документами количественное определение проводится методами внутреннего, либо внешнего стандартов.

На сегодняшний день все используемые методы количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции имеют нерешенные ограничения. В соответствии с требованиями нормативно-правовых документов по учету и контролю алкогольной продукции, концентрации исследуемых летучих компонентов должны быть выражены в единицах измерения мг/л в пересчете на безводный спирт. Для этого необходимо провести дополнительные процедуры определения плотности и объемного содержания этанола в испытуемом образце, которые являются время- и трудозатратными, а также не позволяют проводить корректный анализ в случае высокого суммарного содержания летучих компонентов. Кроме этого, методы внешнего стандарта, использующиеся в странах СНГ, не унифицированы, а единственно доступные импортные стандартные образцы, применяемые для калибровки, обладают рядом существенных недостатков.

С целью решения указанных проблем был предложен инновационный метод прямого определения летучих компонентов в алкогольной продукции, основанный на использовании этанола в качестве внутреннего стандарта.

Поскольку этанол априори содержится в любом образце алкогольной продукции, данный метод исключает необходимость добавления вещества внутреннего стандарта в испытуемые образцы, а также исключает измерение крепости образца и свободен от погрешности дозирования.

Основные результаты выполненных теоретических и экспериментальных исследований были неоднократно опубликованы в рецензируемых научных изданиях, а также выносились на обсуждение перед профильной аудиторией на международных конференциях. В данной диссертационной работе представлены результаты валидации предложенного метода в одной лаборатории, а также приведены возможности его валидации на основании ранее полученных данных. Представленные экспериментальные результаты были обработаны в полном соответствии с требованиями международных стандартов, например, серии стандартов ИСО 5725.

Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрическим детектированием – чрезвычайно распространенная сегодня технология исследования многокомпонентных смесей. Такие системы обладают более высокой чувствительностью и селективностью. В связи с этим, с целью возможного расширения области применения предложенного метода, были выполнены и представлены результаты соответствующих испытаний.

Таким образом, главным направлением исследования настоящей работы является метод прямого определения количественного состава многокомпонентных систем на примере этанолсодержащей продукции. Приводимые результаты экспериментальных работ включают валидацию метода на газовых хроматографах, сопряженных с пламенно-ионизационным детектированием, а также эксперименты по использованию основного компонента смеси в качестве внутреннего стандарта при анализе образца методом ГХ-МС, проведенные впервые.

Высокая практическая значимость проводимого исследования обусловлена колоссальными объемами производства и потребления алкогольной продукции не только в Республике Беларусь, но и во всем мире. Разработанный метод анализа претендует на звание референтного, он может использоваться в любой профильной лаборатории без приобретения новых реактивов или оборудования и без проведения дополнительных процедур. Создание единого межгосударственного стандарта на основе предложенного метода и отказ от использования зарубежных стандартных образцов приведут к значительному уменьшению затрат, связанных, в том числе, с поддержкой и разработкой нормативной документации в данной отрасли, к унификации методов контроля качества алкогольной продукции.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Параметры качества алкогольной продукции.

Не представляется возможным установить точное количество видов алкогольных напитков, встречающихся сегодня во всем мире. Причиной этому является широкое разнообразие сырья для получения напитков, технологий производства, добавок и т.д.

В нормативных документах [1, 2] алкогольная продукция подразделяется на виды в зависимости от исходного сырья, крепости, т.е. объемного содержания этанола, массовой концентрации общего экстракта и сахара.

К показателям правильности маркировки и упаковки относятся наполнение бутылок, целостность этикетки и др. К органолептическим показателям относят внешний вид (цвет, прозрачность), аромат или букет, вкус. Физико-химических показателей намного больше, самые распространенные из них это крепость, массовые концентрации летучих примесей, массовые концентрации летучих кислот и фурфурола, содержание радионуклидов. Реже устанавливаются требования к оптической плотности [3], содержанию железа и меди [4], содержанию токсичных элементов, таких как свинец, мышьяк, кадмий и ртуть [5], общему диоксиду серы, щелочности [6], окисляемости [5], массовым концентрациям сахаров [7], дубильным веществам [3] и др.

Летучие компоненты или токсичные микропримеси в алкогольной продукции чаще всего являются спиртами, альдегидами и сложными эфирами. Они образуются в процессе производства, например, при брожении, и являются неотъемлемой частью любого напитка. Даже такой «примитивный» алкогольный продукт как водка на практике представляет собой не бинарную водно-этанольную смесь, он зачастую содержит в своем составе примесь ацетальдегида, метанола и изопропилового спирта. Такие алкогольные продукты как коньяк, виски, ром, фракции при перегонке этилового спирта и дистилляты для приготовления спиртных напитков, как правило, содержат большое количество летучих примесей в высоких концентрациях.

Необходимость количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции обусловлена их токсичными либо канцерогенными свойствами. Наиболее опасными для здоровья человека примесями являются ацетальдегид, метанол и изопропиловый спирт. Наличие некоторых компонентов, например, изопропанола и бутанола-2, позволяет идентифицировать контрафактную алкогольную продукцию [8]. Кроме этого, многие летучие компоненты имеют ярко выраженные органолептические свойства, поэтому их избыточное количество может повлиять на вкусовые

качества исходного продукта. Напитки, произведенные из сырья определенного географического происхождения и по особенной рецептуре, имеют приблизительно постоянный и, самое важное, уникальный количественный состав летучих компонентов. В таких элитных напитках, количественный профиль летучих примесей играет роль «отпечатка пальцев» [9-11]. Зачастую на практике в образцах элитных вин, коньяков и других напитков количественное содержание примесей важно в первую очередь для подтверждения истории происхождения напитка.

Немаловажно отметить, что согласно статьям белорусской, европейской и российской фармакопей [12-14], газохроматографическое определение летучих примесей – это обязательное испытание этилового спирта. Этиловый спирт, прошедший испытания, указанные в соответствующих фармакопейных статьях, используется для изготовления:

- настоек и экстрактов из растительного сырья, употребляемых внутрь (боярышник, валериана, календула, зверобой и др.);
- растворов йода, камфоры, муравьиного спирта, бриллиантового зеленого, ментолового спирта и др.;
- мазей наружного применения (окопника, перметрина, диметилсульфоксида и др.).

Таким образом, очевидна высокая значимость анализа количественного определения летучих компонентов в этанолсодержащей продукции как основополагающего фактора ее качества и безопасности. Данный анализ используется не только при проверке качества пищевой продукции, он также установлен в качестве обязательного испытания этилового спирта – одного из важнейших видов сырья в фармацевтической и медицинской промышленности.

1.2 Традиционные методы определения летучих примесей

На сегодняшний день количественное определение летучих компонентов в алкогольной продукции проводят методом газовой хроматографии – современным методом качественного и количественного анализа, сочетающим экспрессность и простоту анализа, надежность получаемых результатов. Методы, отличные от газохроматографических, являются устаревшими: они намного более трудоемки, менее точны и прецизионны; они приведены в разделе 1.2.3 в ознакомительных целях.

1.2.1 Внешнего стандарта

В Беларуси, России и других странах СНГ количественное определение содержания летучих компонентов выполняется методом абсолютной градуировки или внешнего стандарта. Данным методом в Республике Беларусь анализируют:

- водки, спирт этиловый, отгоны [15-17];
- спирт-сырец [18];
- коньяки, дистилляты коньячные и бренди [19];
- винодельческую продукцию, в которую входят вина, спиртные напитки из винного (в том числе коньячного), виноградного, фруктового (плодового) и кальвадосного дистиллятов, винного, виноградного и фруктового (плодового) спиртов [20];
- аперитивы, коктейли, бальзамы, джины, пунши, наливки, настойки (горькие, полусладкие, сладкие), десертные напитки, спиртные газированные и негазированные напитки, ликеры (крепкие, десертные, эмульсионные), кремы, ром, виски, текилу, спиртные зерновые дистиллированные напитки [21].

Градуировка прибора по методу внешнего стандарта предусматривает построение линейных зависимостей отклика детектора от количества вещества по нескольким уровням концентраций для каждого исследуемого компонента. Для этого проводят измерения серии стандартных растворов с аттестованными значениями концентраций определяемых летучих компонентов. Градуировочную прямую строят программным обеспечением методом наименьших квадратов. Угол наклона прямой является фактором отклика RF (Response Factor) и определяется следующей формулой:

$$RF_i = C_i^{st} / A_i^{st}, \quad (1)$$

где C_i^{st} – концентрация i -ого исследуемого компонента в градуировочном растворе, мг/л; A_i^{st} – отклик детектора на i -ый компонент в градуировочном растворе, произвольные единицы.

Концентрацию исследуемого летучего компонента в испытуемом образце в размерности мг/л определяют по следующей формуле:

$$C_i = RF_i \cdot A_i, \quad (2)$$

где A_i – отклик детектора на i -ый исследуемый компонент в испытуемом образце, произвольные единицы.

Все существующие нормативные документы, регулирующие определение летучих компонентов в алкогольной продукции, предусматривают итоговое представление концентраций летучих компонентов в единицах измерения вида масса/объем в пересчете на безводный спирт (мг/л АА, г/л АА и т.д.). Перевод концентраций из мг/л в мг/л АА осуществляют следующим образом:

$$C_i(\text{мг/л АА}) = \frac{C_i(\text{мг/л}) \cdot 100\%}{\text{крепость}(\%)}, \quad (3)$$

где *крепость* – объемное содержание этанола в образце, выраженное в процентах. Крепость образца определяют денситометрическим способом [22-24], например, ареометром (схожие приборы: гидрометр, денситометр, спиртометр). Крепость образца, являющаяся функцией зависимости от плотности и температуры, устанавливают по справочным водно-этанольным таблицам, полученным эмпирически [25-26].

1.2.2 Внутреннего стандарта

В странах ЕС, США, Китая, Индии и др. количественный состав анализируемого образца устанавливается методом внутреннего стандарта [27-33]. К веществу, способному выступать в качестве внутреннего стандарта, предъявляются определенные требования, такие как:

- невозможность появления этого химического соединения в спиртовой продукции в процессе производства (процессы брожения и пр.);
- возможность его идентификации на хроматограмме испытуемого образца, отсутствие перекрывания с сигналами других компонентов.

Чаще всего веществом внутреннего стандарта выбирают изомеры амилового спирта: пентанол-1, пентанол-2 или пентанол-3, однако встречается использование и других веществ.

Калибровку прибора проводят путем расчета значений факторов относительного отклика *RRF* (Relative Response Factor) для каждого исследуемого летучего компонента относительно вещества внутреннего стандарта. Величина *RRF* является безразмерной и представляется как отношение факторов отклика RF_i *i*-го компонента и вещества внутреннего стандарта RF_{IS} (Internal Standard):

$$RRF_i^{IS} = \frac{RF_i}{RF_{IS}} = \frac{C_i^{st}}{A_i^{st}} \cdot \frac{A_{IS}^{st}}{C_{IS}^{st}}, \quad (4)$$

где C_i^{st} и C_{IS}^{st} – массовые концентрации *i*-ого компонента и внутреннего стандарта в стандартном образце, мг/кг; A_i^{st} и A_{IS}^{st} – величины отклика детектора хроматографа на *i*-ый компонент и внутренний стандарт, соответственно, произвольные единицы. Калибровка является *одноточечной*, т.е. выполняется по одному уровню концентраций, по результатам измерения одного стандартного образца.

Для проведения количественного анализа к некоторому объему анализируемого образца добавляют приготовленный раствор внутреннего стандарта с известной концентрацией. Расчет массовой концентрации определяемого летучего компонента ведется по следующей формуле:

$$C_i = RRF_i^{IS} \cdot \frac{A_i}{A_{IS}} \cdot C_{IS}, \quad (5)$$

где C_{IS} – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом образце, мг/кг.

Следует отметить, что при использовании данного метода, размерности концентраций определяемых компонентов и вещества внутреннего стандарта при калибровке и анализе должны совпадать. Чаще всего в формулах (4) и (5) концентрации представляют в размерности мг/кг.

Перевод единиц измерения из мг/кг в требуемые единицы мг/л АА также осуществляется денситометрическим образом:

$$C_i(\text{мг/л АА}) = \frac{C_i(\text{мг/кг}) \cdot \rho_{test} \cdot 100\%}{\text{крепость (\%)}} \quad (6)$$

где ρ_{test} – плотность испытуемого образца, мг/л.

1.2.3 Другие методы

Несмотря на то, что газохроматографические методы определения летучих примесей являются на сегодняшний день самыми распространенными, точными и экспрессными, обзор литературных источников будет неполным без упоминания иных методов анализа.

Ряд стандартов устанавливает колориметрический метод определения летучих компонентов в водке [17, 23], спирте этиловом [34, 35], коньяках и коньячных спиртах [36]. Этот метод основан на спектрофотометрическом анализе образовавшихся окрашенных соединений определяемых летучих компонентов, например:

- альдегидов – с фуксинсернистым реактивом I;
- сивушного масла – с салициловым альдегидом;
- сложных эфиров – с гидроксиламином в щелочной среде;
- метанола – с фуксинсернистым реактивом II.

Сложные эфиры могут быть количественно определены титриметрией с использованием реакции омыления [23]. Известно также титриметрическое определение альдегидов [37].

1.3 Существующие проблемы

На сегодняшний день в сфере количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции, являющейся, в том числе продуктом питания, имеется ряд нерешенных проблем.

1.3.1 Видимая крепость

В обоих методах внешнего (п. 1.2.1) и внутреннего (п. 1.2.2) стандартов необходимой процедурой является установление крепости анализируемого образца с целью пересчета концентраций примесей из мг/л или мг/кг образца в

мг/л АА. Это обстоятельство делает невозможным анализ образца небольшого объема, поскольку для определения крепости его объем должен превышать 200 мл [22]. Несмотря на то, что на сегодняшний день существует аналитическое оборудование, позволяющее определять плотность образца объемом в несколько миллилитров, оно не получило широкого распространения ввиду своей дороговизны.

Более значимой является проблема невозможности корректного установления крепости образца денситометрическим способом в том случае, когда образец содержит летучие компоненты в относительно высоких концентрациях. Это связано с тем, что денситометрический способ не чувствителен исключительно к целевому веществу (этанолу), он лишь позволяет установить крепость образца, связав плотность анализируемого раствора с его крепостью на основании справочных данных, разработанных для бинарных водно-этанольных таблиц [25, 26]. Следует отметить, что плотность большинства определяемых токсичных примесей близка к плотности этанола (см. Таблицу 1), а это значит, что их большое содержание приводит к завышенным показателям объемного содержания этанола в образце.

Таблица 1.1 – Плотности наиболее распространенных летучих компонентов. Данные взяты из онлайн-справочника *ChemSpider* (<http://www.chemspider.com>)

Компонент	Плотность, мг/л
ацетальдегид	779000
метилацетат	932000
этилацетат	902000
метанол	791000
изопропанол	785000
этанол	789300
1-пропанол	804000
изобутанол	802000
1-бутанол	810000
изоамилол	809000

При суммарном содержании летучих компонентов в 500 мг/л АА, не представляется возможным определить крепость образца с максимально возможной точностью 0,06 % при помощи контрольных ареометров АСП-1 и АСП-2 по [22].

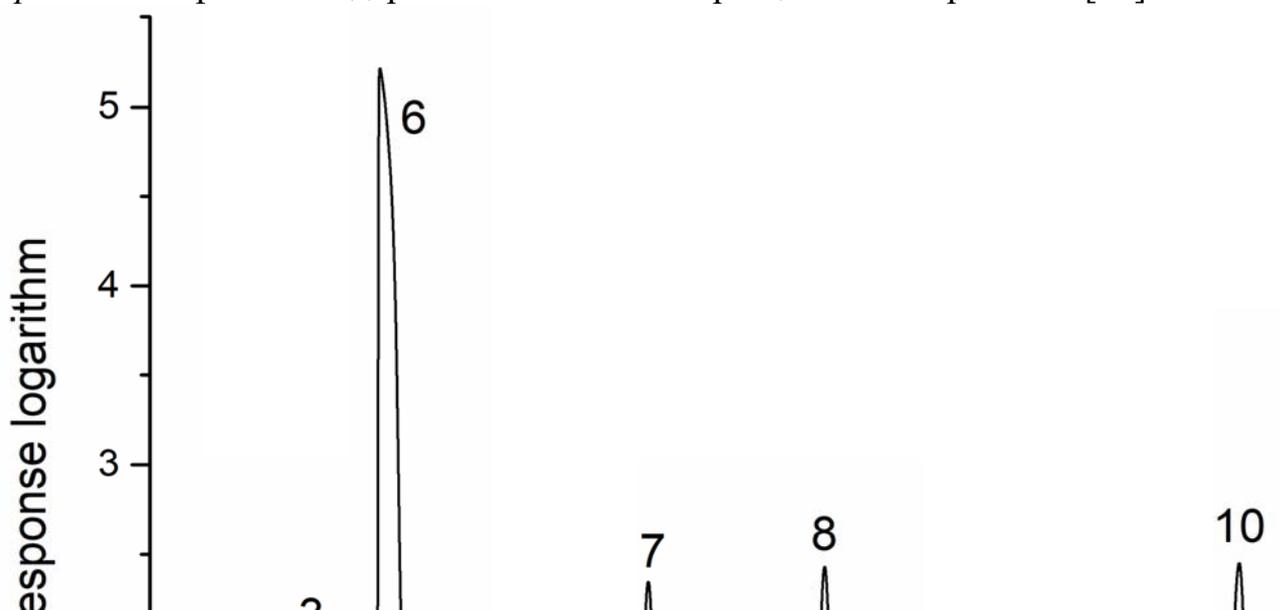
Нерешенная проблема:
как **правильно** определить крепость образца алкогольной продукции?



Рисунок 1.1 – Проблема правильного определения крепости

В качестве примера, на рисунке 1 схематично приведен денситометрический анализ двух образцов алкогольных напитков. В том случае, когда напиток не содержит или содержит в небольших количествах летучие примеси и, по сути, представляет собой бинарную водно-этанольную смесь, определение крепости денситометрическим способом оправдано и позволяет получать корректные результаты. Однако большинство алкогольных напитков содержат заметно большие количества примесей. На рисунке 2 приведена хроматограмма образца виски, суммарное содержание примесей в котором составляет порядка 3000 мг/л АА или 0,4 % от общего содержания этанола. Это значит, что корректно определить крепость этого образца с заявленной в ГОСТ 3639 [22] точностью в 0,1 % невозможно.

В то же время, в некоторых образцах, например, в винных дистиллятах крепостью порядка 90%, суммарное содержание летучих компонентов может превышать 10.000 мг/л АА. При попытке определения крепости такого образца с помощью ареометра погрешность определения составит более 1 %. В связи с этим разделяют понятия истинная крепость и видимая крепость. *Видимая крепость* определяется денситометрически, в то время как термин *реальная крепость* отражает содержание этанола в образце после перегонки [38].



1 – ацетальдегид, 2 – метилацетат, 3 – этилацетат, 4 – метанол, 5 – изопропанол, 6 – этанол, 7 – 1-пропанол, 8 – изобутанол, 9 – 1-бутанол, 10 – изоамилол.

Рисунок 1.2 – Хроматограмма образца виски в логарифмическом масштабе

Не следует также забывать, что во многих образцах алкогольной продукции присутствуют сахара, дубильные вещества, колеры и другие вещества, не относящиеся к летучим компонентам и изменяющие плотность исследуемого раствора. Отчасти эта проблема решается перегонкой [22-24]. Однако примитивным перегонным аппаратом, схема которого приведена в указанных документах, невозможно добиться полного разделения этанола от содержащихся в образце летучих компонентов, в особенности, это касается высоколетучих ацетальдегида, сложных эфиров, метанола. Перегонка способна нивелировать влияние высокомолекулярных веществ, например, сахаров, которые не могут быть перегнаны. Однако многие определяемые летучие примеси имеют невысокие температуры кипения и охотно испаряются вместе с этанолом, что вкупе с дополнительными операциями по перегонке (иногда многократной), не позволяет провести корректный анализ крепости испытуемого образца а также делают эту процедуру трудоемкой, время- и материалозатратной.

1.3.2 Импортные ГСО

В Республике Беларусь все анализы количественного определения летучих примесей в алкогольной продукции выполняют методом внешнего стандарта или абсолютной градуировки. Данный метод подразумевает градуировку прибора по набору градуировочных смесей. На сегодняшний день,

согласно действующей на территории РБ нормативной документации, количественный анализ водок и спирта этилового ректифицированного [15, 16, 35], особых водок [17], коньяков, дистиллятов коньячных и бренди [19], продукции винодельческой и сырья для ее производства [20] и других разнообразных алкогольных напитков [21] невозможен без использования аттестованных градуировочных государственных стандартных образцов (ГСО) импортного производства (ВНИИПБТ, г. Москва). Данные ГСО представляют собой набор, состоящий из трех градуировочных смесей с внесенными добавками исследуемых летучих компонентов в водно-этанольный раствор.

1.3.2.1 Монополист на белорусском рынке

Одна из проблем импортных ГСО заключается в их незаменимости, т.е. в отсутствии возможности использования каких-либо других стандартных образцов при градуировке измерительного оборудования. Следует отметить, что некоторые стандарты имеют прописанный алгоритм самостоятельного приготовления градуировочных смесей в лаборатории [18-20]. Однако с целью учета наличия примесей в исходном этиловом спирте, необходимом для приготовления этих смесей, его измеряют по стандартам, в которых, в свою очередь, использование градуировочных смесей, отличных от импортных недопустимо. Таким образом, на сегодняшний день каждая белорусская испытательная лаборатория, выполняющая количественное определение содержания летучих примесей в алкогольной продукции вынуждена приобретать градуировочные смеси у единственного производителя.

1.3.2.2 Нюансы практического использования

Алгоритм практического использования ГСО выглядит следующим образом: флакон с материалом ГСО вскрывают, отбирают 1 мл в стандартную стеклянную микровиалу объемом 1,5 мл, затем закрывают и заливают парафином. Согласно описанию типа ГСО, после вскрытия образцы хранят не больше 6 месяцев. Поскольку данные образцы предназначены для многократного использования, процедура открытия-закрытия флакона с материалом ГСО повторяется многократно. При этом какие-либо указания касаются минимально допустимого объема остающегося материала ГСО во флаконе отсутствуют. Как следствие, возможна ситуация, когда во флаконе объемом 15 мл остается 1-2 мл раствора аттестованной градуировочной смеси, содержащей высоколетучие химические соединения. Большой объем газовой фазы по отношению к объему материала ГСО, большое количество актов открытия-закрытия флаконов и высоколетучий характер содержащихся веществ вызывают закономерные опасения в сохранности аттестованных значений по мере использования ГСО. Кроме этого, сами процедуры открытия-закрытия

флакона связаны с дополнительными ручными процедурами, которые делают анализ более трудо- и времязатратным.

1.3.2.3 Необоснованность аттестованных характеристик

Заявленные значения относительных погрешностей концентраций летучих компонентов в аттестованных импортных ГСО в ряде случаев нельзя считать научно обоснованными. В соответствии с метрологическими требованиями, погрешность аттестованных значений СО не должна превышать одной трети допускаемых границ погрешности характеристик, контролируемых с помощью соответствующей методики измерений (МИ).

Согласно принятому в странах Таможенного союза ГОСТ 30536-2013 [39] и СТБ ГОСТ Р 51698-2001 [16], границы погрешности измерений значений концентраций летучих компонентов в этиловом спирте в диапазоне от 0,5 мг/л до 10,0 мг/л составляют 15 %. Следовательно, погрешность значений концентрации СО в этом диапазоне концентраций не должна превышать 5%. Однако используемые методы аттестации СО не могут гарантировать их соответствие указанным выше требованиям в силу следующих причин.

Аттестация образцов может быть выполнена по процедуре приготовления или на основе межлабораторных испытаний. Совершенно очевидно, что использование МИ, обеспечивающей 15 %-ную погрешность результатов измерений, в принципе не может обеспечить 5 %-ную погрешность аттестованных значений концентраций летучих компонентов в СО по данным межлабораторных испытаний. Процедура гравиметрического приготовления СО (обычно добавлением навесок контролируемых веществ в 40 % раствор этилового спирта в воде, поскольку такой состав наиболее полно моделирует состав алкогольной продукции, подвергающейся контрольным испытаниям) также не позволяет достичь необходимой точности приготовления СО в указанном диапазоне концентраций (от 0,5 мг/л до 10,0 мг/л) в связи с наличием в исходном этиловом спирте летучих компонентов, содержание которых определяется с 15 %-ной погрешностью.

Например, поскольку минимальное значение определяемой концентрации летучих компонентов в анализируемом образце, согласно [39], составляет 0,5 мг/л, то минимальная погрешность значений концентрации в приготовленном СО этилового спирта, с заявленной концентрацией летучего компонента 0,5 мг/л, не может быть меньше 15 %. При приготовлении стандартного образца с концентрацией примесей в этиловом спирте в 1,0 мг/л (например, образец РВ-3 из набора МСО 8405-2003) минимальная неопределенность значений концентрации летучих компонентов будет составлять 7,5 %. В то же время, в описании типа стандартных образцов, занесенного в государственный реестр средств измерений, а также в их паспорте указана аттестованная величина

погрешности концентрации летучих компонентов в 3-5 %. Отсутствие научного обоснования заявляемых содержаний токсичных микропримесей в импортируемых стандартных образцах не позволяет получать достоверные данные о безопасности алкогольной продукции, относящейся к продуктам питания.

1.4 Метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта»

С целью решения проблем, указанных в п. 1.3, был предложен инновационный метод прямого количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции, основанный на использовании этанола в качестве внутреннего стандарта [40]. Его целью является упрощение и повышение правильности проведения анализа.

В традиционной интерпретации метода внутреннего стандарта (п. 1.2.2) концентрацию вещества внутреннего стандарта делают близкой к концентрациям анализируемых примесей. В данном случае наблюдается обратная ситуация – содержание этанола в алкогольной продукции на 3-5 порядков выше содержания летучих компонентов. Часто задаваемым является вопрос касемо рациональности и обоснованности использования в качестве внутреннего стандарта вещества, которое настолько сильно превосходит остальные по количеству. Тем не менее, современные газовые хроматографы характеризуются высокой линейностью отклика детектора в диапазоне концентраций более 7 десятичных порядков.

Калибровка прибора предложенным методом устанавливает расчет относительных коэффициентов отклика аналогично традиционному методу внутреннего стандарта. Коэффициенты RRF_i^{Eth} рассчитывают для каждого i -ого определяемого компонента относительно этанола по формуле, аналогичной формуле (4):

$$RRF_i^{Eth} = \frac{C_i^{st}}{\rho_{Eth}} \cdot \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M (A_{i,n}^{st} / A_{Eth,n}^{st}), \quad (7)$$

где C_i^{st} – концентрация i -ого компонента в стандартном образце, мг/л АА; ρ_{Eth} – плотность этанола, 789300 мг/л; $A_{i,n}$ и $A_{Eth,n}$ – отклики детектора (площадь пика) на i -ый компонент и этанол, соответственно, в стандартном образце при n из m параллельных измерений, $m \geq 3$.

Ключевым моментом метода является то, что концентрация выбранного внутреннего стандарта в размерности мг/л АА постоянна и равна плотности этилового спирта. Таким образом, концентрация внутреннего стандарта в калибровочном и испытуемом образцах всегда известна с нулевой неопределенностью.

Расчет концентраций i -го определяемого летучего компонента в испытуемом образце осуществляют по следующей формуле:

$$C_i = RRF_i^{Eth} \cdot \frac{A_i}{A_{Eth}} \cdot 789300, \quad (8)$$

где A_i и A_{Eth} – отклики детектора (площадь пика) на i -ый компонент и этанол, соответственно, в испытуемом образце.

Рациональность использования этанола в качестве вещества внутреннего стандарта при определении летучих примесей в алкогольной продукции обусловлена тем, что в соответствии с международными регулируемыми документами [27-31] итоговые концентрации летучих соединений должны быть выражены в единицах измерения масса/объем абсолютного этанола (мг/л АА, г/л АА и др.). В отличие от любого другого существующего метода количественного определения примесей, предложенный метод позволяет напрямую получать концентрации примесей в размерностях масса/объем абсолютного этанола без необходимости определения плотности и объемного содержания этанола в образце, что является большим преимуществом при проведении рутинного анализа.

Таким образом, при использовании метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» анализ любого образца спиртсодержащей продукции становится возможным без добавления материала внутреннего стандарта, так как этанол априори содержится в любом образце и его концентрация известна с нулевой неопределенностью. Использование современных приборов позволяет получать достоверные результаты, несмотря на большое различие в концентрациях определяемого компонента и внутреннего стандарта. В связи с этим использование этанола в качестве внутреннего стандарта является логичным шагом на пути к усовершенствованию всей процедуры анализа качества и безопасности алкогольной продукции.

Теоретические основы метода и результаты его экспериментальных испытаний, а также сравнительный анализ характеристик предложенного метода и традиционно используемых методов представлены в [41-44]. Основные результаты выполненных теоретических и экспериментальных исследований неоднократно выносились на обсуждение перед профильной аудиторией на международных конференциях [45-50].

1.4.1 Валидация метода на основании ранее полученных данных

Важной особенностью предложенного метода является то, что он может пройти процедуру валидации на основании данных, полученных ранее при валидации других методов. Это связано с тем, что, как было указано в п. 1.4,

данный метод в своем применении не требует дополнительных процедур/измерений и т.д., кроме тех, что уже были сделаны.

Согласно ГОСТ 17025-2009 [51] новые методики измерений обязаны пройти процедуру оценки пригодности (валидации) перед применением. Оценка пригодности – это подтверждение путем исследования и предоставление объективных доказательств того, что конкретные требования к специфическому целевому использованию выполняются.

Эффективность нового метода может быть определена одним из следующих способов или их сочетанием [51]:

- калибровкой с использованием исходных эталонов и стандартных образцов;
- сравнением результатов, полученных с помощью других методов;
- межлабораторными сравнительными испытаниями;
- систематическим оцениванием факторов, оказывающих влияние на результат;
- оцениванием неопределенности результатов на основе научного осмысления теоретических принципов метода и практического опыта.

Предложенный алгоритм валидации метода на основании ранее полученных данных изложен ниже. Примечательно то, что он может быть использован как для результатов, полученных методом внешнего стандарта, так и для результатов, полученных методом внутреннего стандарта.

1.4.1.1 Калибровка

Калибровка прибора устанавливается путем расчета относительных факторов отклика RRF_i^{Eth} , как это было указано в п. 1.4. Для этого необходимо знать концентрации исследуемых примесей в калибровочных образцах в размерности мг/л АА. Стандартные образцы для калибровки готовят путем внесения навесок исследуемых летучих компонентов в водно-этанольную матрицу с объемным содержанием этанола 40 или 50 % об. Ввиду того, что при приготовлении образцов количества всех внесенных исследуемых примесей и этанола известны, становится возможным пересчет единиц концентраций в размерность мг/л АА. Перевод концентраций примесей из мг/кг или мг/л в мг/л АА может быть выполнен аналогично формулам (3) и (6).

Как указывалось выше, концентрация выбранного внутреннего стандарта в единицах измерения мг/л АА является постоянной величиной, равной плотности этанола. Ее устанавливать не надо.

После перевода единиц концентраций всех исследуемых летучих компонентов необходимо установить площадь сигнала этанола в полученных хроматограммах стандартного образца. Эта процедура может быть проведена

автоматически программным обеспечением, аналогично установлению площадей пиков исследуемых компонентов.

Имея значения концентраций летучих примесей в калибровочном растворе в мг/л АА и величины отклика детектора на исследуемые примеси и этанол, становится возможным выполнение калибровки хроматографа по предложенному методу в соответствии с формулой (7).

Как было указано в п. 1.3.2, в странах СНГ для определения летучих примесей в алкогольной продукции используют государственные стандартные образцы состава импортного производства. Комплект ГСО состоит из трех растворов РВ/РС с индексами от 1 до 3, градуировка осуществляется по трем уровням концентраций примесей. Калибровка прибора по предложенному методу может быть осуществлена на основании результатов измерения одного стандартного образца, например, РВ-1 или РС-1. Данные образцы содержат самые высокие концентрации примесей среди остальных образцов в наборе, поэтому, с целью минимизации возможных ошибок, вызванных отсутствием процедуры учета производителем наличия примесей в исходном спирте этиловом, их использование для одноточечной калибровки предпочтительнее.

1.4.1.2 Анализ испытуемого образца

Метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» является прямым, т.е. в отличие от любого другого существующего метода количественного определения летучих примесей, позволяет получать концентрации в размерности мг/л АА без измерения плотности и крепости образца. По формуле (8) необходимо знать калибровочные коэффициенты RRF_i^{Eth} , алгоритм расчета которых был изложен в 1.4.1.1, и площади пиков i -го исследуемого летучего компонента и этанола в испытуемом образце.

Оператору необходимо лишь установить площадь пика этанола в хроматограмме испытуемого образца для получения концентраций примесей в требуемой размерности по предложенному методу. Данные о плотности и крепости образца не требуются.

1.4.1.3 Определение метрологических параметров

Подтверждение пригодности метода или его валидация невозможны без определения важнейших метрологических параметров, включающих в себя прецизионность, линейность, предел определения, правильность и т.д. После получения концентраций примесей в испытуемом образце, полученные величины можно обрабатывать в соответствии с требованиями международных стандартов, например, серии стандартов ИСО 5725 [52]. Ввиду того, что предложенный метод не требует дополнительных процедур и может быть использован на основании ранее полученных измерений, метрологические

характеристики также могут быть получены из ранее проведенных экспериментов. Если процесс валидации любого другого метода количественного определения летучих примесей был ранее выполнен в лаборатории в соответствии с требованиями тематических стандартов [52-54], то причины невозможности валидации метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» в этой лаборатории на основании полученных результатов отсутствуют.

1.4.2 Использование метода в рутинной практике

Ввиду очевидных преимуществ предложенного метода, видится рациональным его внедрение в рутинную практику испытательных лабораторий, аккредитованных в области количественного определения летучих примесей в алкогольной продукции.

Согласно проведенному исследованию, на сегодняшний день в испытательных лабораториях в качестве основных программ, в которых выполняются измерения и подготавливаются отчеты об их результатах, используются две: Хроматэк-Аналитик (Россия) и ChemStation (США).

Была установлена возможность обработки результатов газохроматографического измерения одновременно по традиционному и предложенному методам, ввиду того, что последний в своем применении не требует каких-либо дополнительных измерений или процедур. Таким образом, любая испытательная лаборатория может обработать полученные данные сначала по традиционному используемому методу, а затем по предложенному и сравнить получаемые результаты.

В целях содействия профильным белорусским испытательным лабораториям в направлении освоения предложенного метода, были разработаны алгоритмы его использования на базе данных программ. Подробные процедуры калибровки, анализа испытуемого образца и формирования отчета были представлены в виде обучающих видеороликов на сайте Института ядерных проблем БГУ [56], а также на тематическом YouTube-канале [57].

1.5 Возможность применения метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» в ГХ-МС

1.5.1 Распространение технологии

Масс-спектрометрия является незаменимым аналитическим инструментом в химии, биохимии, фармацевтике, медицине и многих смежных областях науки. Выяснение структуры неизвестных веществ, соединений в окружающей среде, контроль качества лекарств, продуктов питания и

полимеров, анализы при криминалистической экспертизе: все вышечисленное в большой степени полагается на масс-спектрометрию.

Какой бы ни была цель, масс-спектрометрия направлена на выявление структуры соединений из молекулярной или атомной массы (масс) его составляющих. Информация, предоставляемая только по массе, может быть достаточной для определения молекулярной формулы вещества.

В настоящее время масс-спектрометрия развивается большими темпами, а соответствующие инновации производятся с огромной скоростью. Экологические и фармацевтические исследования оказались движущей силой в достижении более низких пределов обнаружения, чем при использовании других методов.

Технология газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), признана «золотым стандартом» в сфере идентификации химических веществ в смесях. ГХ-МС есть комбинация двух мощных аналитических инструментов: газовой хроматографии, обеспечивающей высокоэффективное разделение компонентов сложных смесей в газовой фазе, и масс-спектрометрии, позволяющей идентифицировать как известные, так и неизвестные компоненты смеси. ГХ-МС высокоспецифично характеризует вещества по газохроматографическим индексам удерживания и масс-спектрам. Вещества с перекрывающимися хроматографическими пиками различают по их масс-спектрам. С другой стороны, изомеры с похожими или идентичными масс-спектрами различают по индексам удерживания. Таким образом, ГХ и МС дополняют друг друга при анализе сложных смесей [58].

1.5.2 Регистрация этанола

В целях установления возможности использования ГХ-МС систем для количественного определения летучих примесей в этанолсодержащей продукции методом «Этанол в качестве внутреннего стандарта», были проведены экспериментальные исследования на газовом хроматографе, сопряженным с квадрупольным масс-селективным детектором.

Главной обнаруженной проблемой оказалось насыщение детектора ионами, образующимися при ионизации этанола. Как следствие, детектор переставал детектировать этанол, пик которого был «обрезанным» сверху. Понятно, что в таком случае метод не мог быть использован, т.к. при калибровке и анализе испытуемого образца предложенным методом необходимо знать площадь пика этанола. Линейный динамический диапазон МС детектора составляет порядка 10^5 , что как минимум на два порядка ниже, чем диапазон линейности ПИД. Согласно ранее проведенным исследованиям [41-44], метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» может быть

использован даже при определении примесей в образцах с высоким содержанием этилового спирта, на пример в спирте этиловом ректифицированном с крепостью порядка 96%. Высокая линейность ПИД позволяет регистрировать сигналы как определяемых летучих примесей, так и этанола, чье содержание относительно других компонентов очень велико. По первым экспериментам стало очевидно, что использование метода на ГХ-МС не может быть полностью идентично использованию на ГХ-ПИД.

По результатам литературного поиска было установлено, что этанол ранее определялся количественно на ГХ-МС как отдельная примесь, например, в биологических образцах [59], парфюмерии [60], твердой пище [61]. Однако во всех приведенных работах верхний предел определения этанола не превышал 0,5 % об., что позволяло беспрепятственно его детектировать. Количественное определение проводилось методом абсолютной градуировки. Если содержание этанола было выше, образцы разбавляли.

Что касается алкогольных напитков, то при количественном определении этанола напитки разбавляли водой или использовали более высокий сброс метода [62-65]. В обоих случаях измерения проводились дважды: сначала измерялись летучие компоненты, а затем, после разбавления/увеличения сброса – этанол. Во избежание насыщения детектора, некоторые авторы прерывали измерение во время выхода этанола [66].

Таким образом, основываясь на опыте предыдущих исследователей, алгоритм использования предложенного метода можно было бы представить следующим образом: в первую очередь измерять образец и регистрировать сигналы определяемых примесей, после чего разбавлять образец водой или увеличивать сброс пробы и отдельным измерением регистрировать этанол. Ввиду несоизмеримо больших трудовых затрат, которые бы негативно сказались на метрологических характеристиках предложенного метода и полностью бы нивелировали его достоинства, этот подход на практике реализован не был.

Решением вышеуказанной проблемы видится подход искусственного уменьшения чувствительности МС детектора к этанолу, в результате которого станет доступной его одновременная регистрация вместе с определяемыми летучими примесями без выполнения отдельных дополнительных измерений. Таких подходов было предложено два. Первый заключается в селективной регистрации более редких ионов, образующихся при электронной ионизации и последующей фрагментации молекул этанола. Второй – в уменьшении напряжения на диноде детектора в момент выхода пика этанола.

1.5.3 Режимы регистрации ионов

Классическим режимом в масс-спектрометрии является режим

регистрации полного ионного тока ТИС (Total Ion Current). Его суть заключается в получении масс-спектра вещества путем регистрации всех ионов в выбранном диапазоне масс, например, от 50 до m/z 550. Этот режим характеризуется большой информативностью, поскольку позволяет получить полный спектр соединения и с высокой вероятностью определить его структуру по имеющимся базам масс-спектров.

Полученный спектр также можно настроить на отображение одного или нескольких выбранных ионов, что оказывается полезным при анализе сложных смесей, когда спектр и хроматограмма переполнены информацией. Например, рисунок 3 содержит ГХ-МС хроматограмму эфирного экстракта образца тюленьего жира в режиме регистрации полного ионного тока. Очевидно, что ввиду сложного многокомпонентного состава этого образца количественное определение конкретных веществ является трудной задачей.

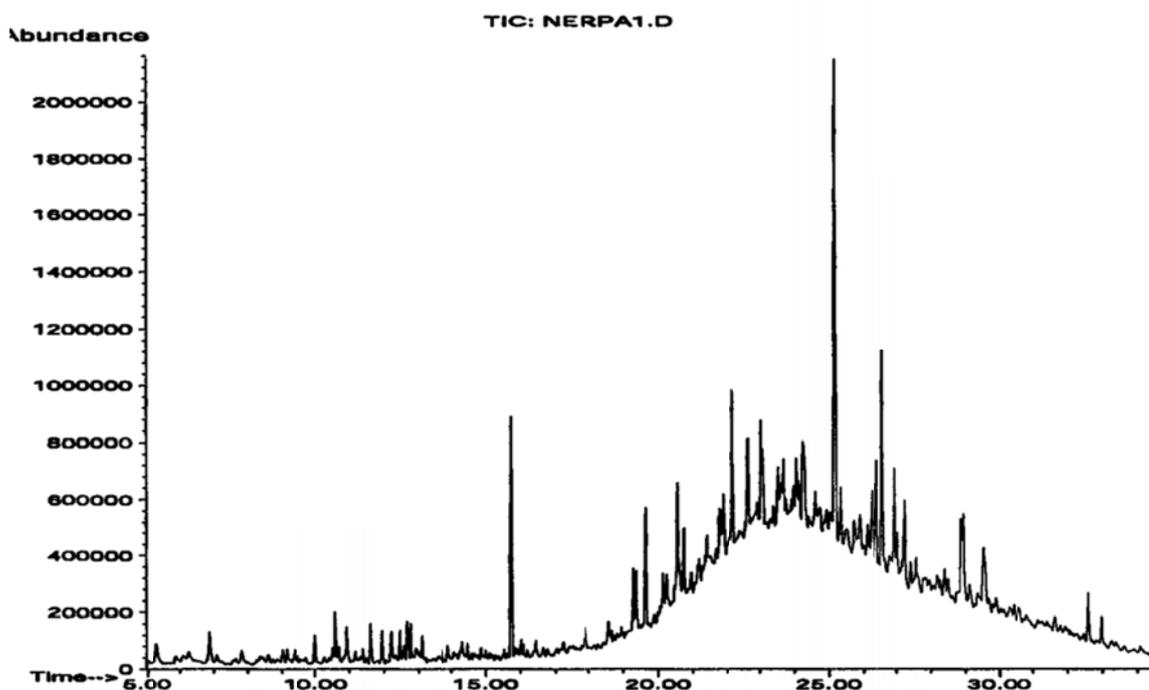


Рисунок 1.3 – ГХ-МС хроматограмма эфирного экстракта образца тюленьего жира в режиме регистрации полного ионного тока [67, с. 336]

Однако при выборе конкретных интересующих ионов для отображения, хроматограмма, приведенная на рисунке 3, полностью преобразуется (см. рис. 4) и становится доступной регистрация отдельных интересующих соединений.

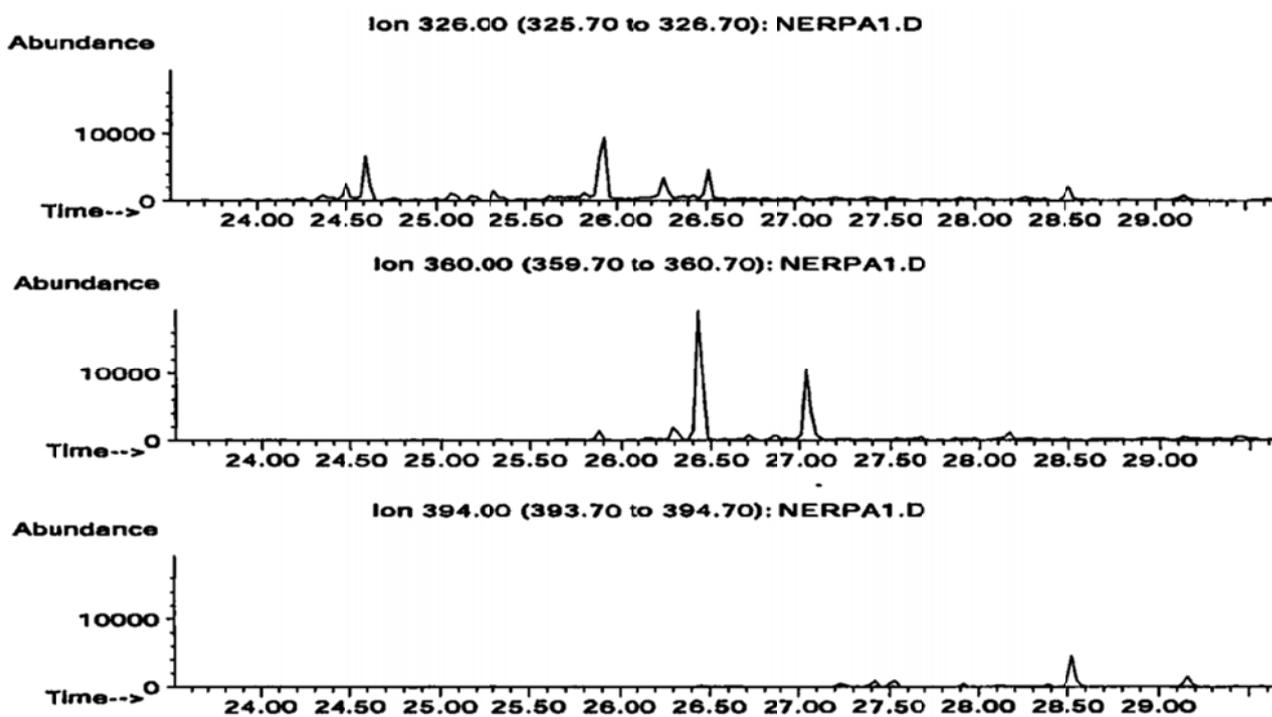


Рисунок 1.4 – ГХ-МС хроматограмма экстракта образца тюленьего жира в режиме регистрации выбранных ионов 326, 360 и 394, сверху вниз, соответственно [67, с. 336]

ГХ-МС часто используют в режиме мониторинга заданных ионов SIM (Selected Ion Monitoring). Такой подход также носит название масс-фрагментографии [67]. В этом случае масс-спектрометр не регистрирует диапазон масс, а жестко настраивается на регистрацию нескольких ионов с заданными значениями m/z .

Во время получения спектра в ТИС режиме, на регистрацию конкретного иона отводится $t/500$ с, где t – время развертки, например, 1 секунда, а 500 – число регистрируемых ионов (диапазон 50-549 m/z). Поскольку ионы генерируются непрерывно, это означает, что детектора достигает 0,2 % ионов каждого типа. Подавляющую часть ионов сканирующий масс-спектрометр просто не может зарегистрировать, поскольку «занят» определением других.

В свою очередь при SIM режиме регистрируются только 2-4 выбранных иона. Это в значительной степени увеличивает процент ионов конкретного масс-зарядного отношения, которые достигают детектора. Как следствие, метод SIM получает выигрыш в чувствительности более чем на порядок. Вместе с этим, этот метод проигрывает в информативности и надежности, поскольку теряется информация о других компонентах смеси. Метод SIM используется в рутинных анализах с ограниченным количеством исследуемых компонентов, когда формула и время удерживания компонента точно известны.

При анализе летучих компонентов используются как ТИС, так и SIM методы. Ввиду того, что любой регулирующий документ, касающийся методов количественного определения летучих примесей в этанолсодержащей продукции, распространяется на конкретный перечень летучих примесей, SIM режим видится предпочтительным ввиду значительно более высокой чувствительности. ТИС режим более уместно использовать в исследовательских работах при анализе состава вин, коньяков и т.д., то есть в тех случаях, когда число компонентов велико и они отличаются большим структурным разнообразием.

1.5.4 Использование иона с m/z 47

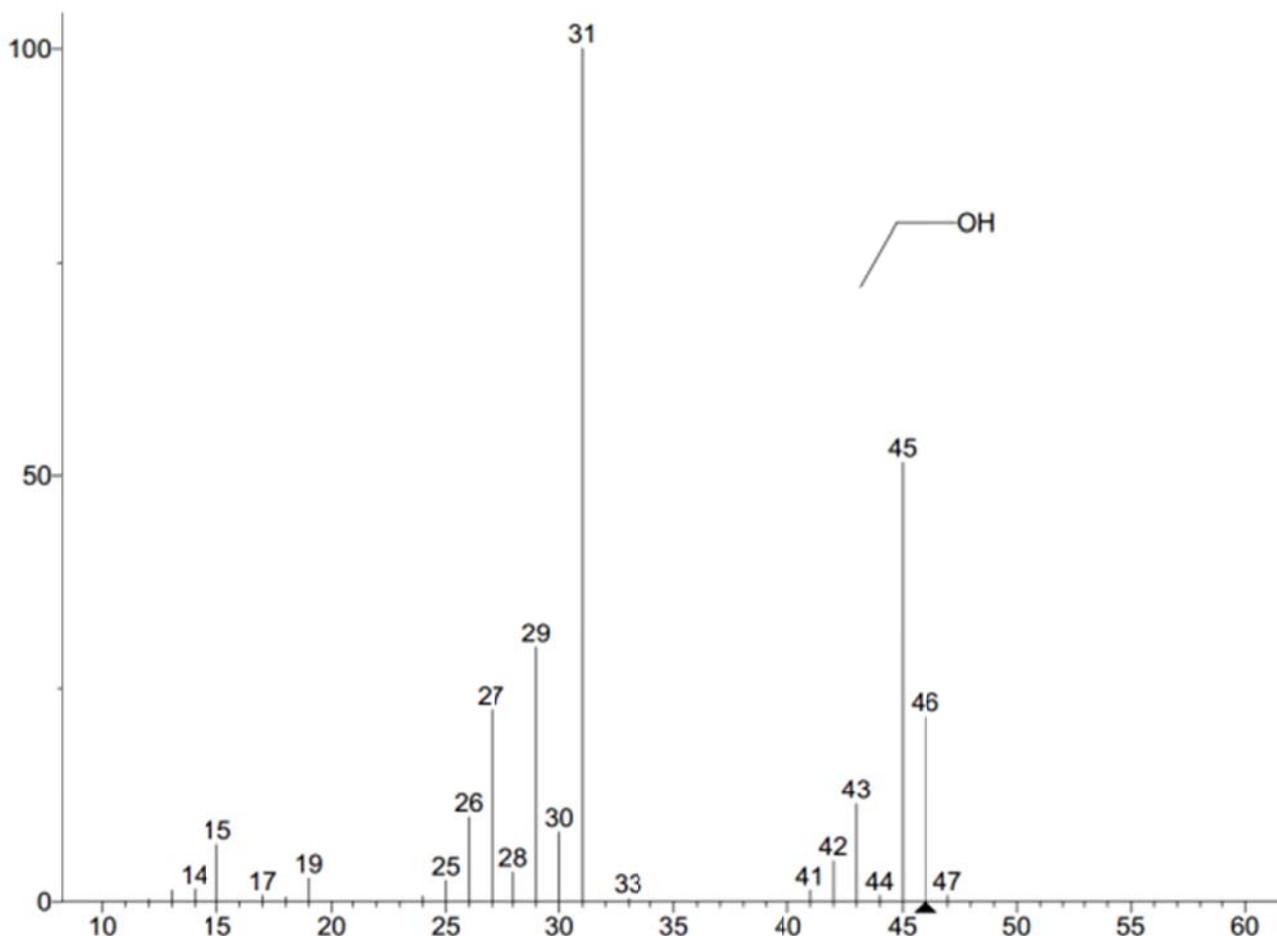


Рисунок 1.5 – Масс-спектр этанола, взятый из библиотеки NIST

На рисунке 5 представлен масс спектр этанола. Как и спектр любого другого вещества, он содержит основные и побочные m/z сигналы, чьи высоты пропорциональны количеству образующихся при ионизации частиц.

С целью регистрации сигнала этанола без насыщения детектора одновременно с исследуемыми примесями было предложено использовать ион этанола с масс-зарядным отношением 47. Молекулярная масса этанола составляет 46 Да, следовательно, эти ионы соответствуют нефрагментированной молекуле, содержащей 1 тяжелый изотоп. Ввиду относительно высокого природного содержания изотопа ^{13}C в 1,07 %, по сравнению с 0,04 % и 0,01 % для изотопов ^{17}O и ^2H , соответственно, было предположено, что наличие ионов с m/z 47 практически полностью соответствует нефрагментированным молекулам состава $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_5\text{H}_6\text{O}$.

ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Валидация метода в одной лаборатории на ГХ-ПИД

С целью установления метрологических характеристик метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» была проведена его валидация в лаборатории аналитических исследований НИИ ЯП БГУ.

2.1.1 Приготовление стандартных образцов

Для проведения валидации гравиметрически было приготовлено семь стандартных образцов летучих компонентов в спиртосодержащей продукции. Сначала была приготовлена водно-этанольная смесь (ВЭС) с объемным содержанием этанола 40 % об. путем смешения спирта этилового (96 % об.) с деионизованной водой. Ректификованный этиловый спирт высшей очистки был предоставлен ЗАО «Ликеро-водочный завод «Алгонь», деионизованная вода была приобретена в ОАО «Интеграл».

Смесь РВЭ-А была приготовлена путем внесения в ВЭС следующих исследуемых летучих компонентов: ацетальдегид, метилацетат, этилацетат, метанол, 2-пропанол, 1-пропанол, 2-метил-1-пропанол (изобутанол), 1-бутанол, 3-метил-1-бутанол (изоамилон). Все индивидуальные летучие компоненты были приобретены у компании Merck и имели чистоту не ниже 99 %. Приготовление образцов проводилось гравиметрическим методом в полном соответствии с требованием [68], с использованием аналитических электронных весов AR 2140 с наибольшим пределом взвешивания 200 г, имеющие класс точности I (первый или специальный класс) и предел допускаемой погрешности не более $\pm 0,2$ мг.

Смеси РВЭ-В, РВЭ-С, РВЭ D и РВЭ-1 были приготовлены путем разбавления образца РВЭ-А водно-этанольной смесью. Смеси РВЭ-2 и РВЭ-3 были приготовлены путем разбавления образца РВЭ-С водно-этанольной смесью. Таким образом, объемное содержание этанола во всех приготовленных стандартных образцах составило 40 % об., что имитирует исходную матрицу большинства испытуемых образцов алкогольной продукции. Приготовленные образцы хранили в закупоренных флаконах из темного стекла при температуре 5-10 °С. Перед ГХ измерениями образцы помещали в стандартные микроцилиндры объемом 1,5 мл, подходящие для непосредственного использования в автоматическом дозаторе жидких проб «ДАЖ-2М».

Концентрации исследуемых летучих компонентов в приготовленных стандартных образцах и их неопределенности приведены в Таблице 2. Неопределенности концентраций примесей в образцах были установлены расчетно-экспериментальным путем.

Таблица 2.1 – Концентрации примесей в приготовленных стандартных образцах и их неопределенности

Компонент	Концентрация, мг/л АА						
	РВЭ-3	РВЭ-2	РВЭ-1	РВЭ-D	РВЭ-C	РВЭ-B	РВЭ-A
ацетальдегид	3,93 ± 0,12	11,0 ± 0,33	48,6 ± 1,5	132 ± 3,5	223 ± 4,5	436 ± 4,4	4336 ± 12
метилацетат	1,03 ± 0,02	9,74 ± 0,19	51,4 ± 1,0	177 ± 4,2	242 ± 4,8	487 ± 4,9	5533 ± 16
этилацетат	1,11 ± 0,02	9,49 ± 0,19	49,7 ± 1,0	237 ± 5,2	233 ± 4,7	476 ± 4,8	6813 ± 21
метанол	18,5 ± 0,56	27,7 ± 0,83	71,7 ± 2,2	189 ± 5,0	271 ± 5,4	526 ± 5,3	5741 ± 16
2-пропанол	2,75 ± 0,08	11,9 ± 0,36	55,6 ± 1,7	139 ± 3,7	258 ± 5,2	512 ± 5,1	5774 ± 16
этанол	789300						
1-пропанол	1,27 ± 0,03	10,7 ± 0,21	56,5 ± 1,1	189 ± 5,1	265 ± 5,3	532 ± 5,3	6010 ± 17
изобутанол	1,45 ± 0,03	11,3 ± 0,23	58,9 ± 1,2	195 ± 4,6	275 ± 5,5	553 ± 5,5	6214 ± 18
1-бутанол	1,72 ± 0,03	11,0 ± 0,22	56,6 ± 1,1	187 ± 5,1	264 ± 5,3	532 ± 5,3	5996 ± 17
изоамилол	1,95 ± 0,04	11,6 ± 0,23	59,2 ± 1,2	196 ± 4,8	276 ± 5,5	556 ± 5,6	6244 ± 18

Концентрации летучих компонентов в приготовленных стандартных образцах были выбраны таким образом, чтобы охватить весь диапазон примесей, содержащихся в различных образцах алкогольной продукции. Например, самые низкие концентрации в образцах РВЭ-3 и РВЭ-2 соответствуют содержанию примесей в водке и спирте этиловом ректифицированном (96 % об.). Образец РВЭ-А с самым большим содержанием примесей соответствует фракциям при перегонке этилового спирта, дистиллятам и др. Остальные образцы занимают промежуточное положение, отражая содержание примесей в других продуктах винодельческой промышленности.

С целью демонстрации работоспособности метода на реальном образце в коммерческом источнике был приобретен образец виски известного бренда. Материал приобретенного напитка был помещен в стандартные микровиалы объемом 1,5 мл. (а может не один напиток? Один напиток исходит из публикации в АОАС 2019 г.)

2.1.2 Параметры оборудования

Для измерений использовался газовый хроматограф «Кристалл 5000.1» фирмы Хроматэк. Использовалась капиллярная колонка Rt-WAX со следующими параметрами: длина – 60 м, внутренний диаметр – 0,53 мм, толщина фазы – 1 мкм. Использовались следующие ГХ параметры: температура испарителя – 160 °С; температура детектора – 200 °С; газ носитель – азот (99,9%); скорость потока – 6,9 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 1 мкл, сброс – 1:7. Были использованы следующие параметры термостата колонки: начальная изотерма 75 °С выдерживалась 9 минут, затем увеличивалась до 130 °С со скоростью 5 °С/мин, затем увеличивалась до 180 °С со скоростью 10 °С/мин с конечной изотермой в 5 минут.

2.1.3 Определяемые метрологические характеристики

Все исследуемые стандартные приготовленные и приобретенные образцы были измерены 30 раз, за исключением калибровочного образца РВЭ-С, который был измерен пятикратно. Определение относительных коэффициентов отклика RRF_i^{Eth} проводилось по формуле (7) по результатам измерения калибровочного образца РВЭ-С. Концентрации примесей в измеренных приготовленных образцах устанавливались по формуле (8).

На основании полученных измерений определялись следующие метрологические характеристики:

- внутрилабораторная повторяемость метода была оценена путем расчета величин относительных стандартных отклонений повторяемости на каждом уровне концентраций приготовленных растворов, а также в

случае **приобретенных алкогольных напитков** согласно требованиям ИСО 5725 [52];

- внутрилабораторная воспроизводимость метода была оценена путем расчета величин относительных стандартных отклонений воспроизводимости на каждом уровне концентраций приготовленных растворов, а также в случае **приобретенных алкогольных напитков** согласно требованиям ИСО 5725 [52];
- линейность метода была оценена методом наименьших квадратов по результатам измерения всех приготовленных стандартных образцов, за исключением образца РВЭ-С. Линейная зависимость вида $y=kx$ устанавливалась в осях отношение концентраций i -го исследуемого компонента и этанола в мг/л АА (абсцисса) и отношение площадей газохроматографических пиков i -го компонента и этанола (ордината);
- предел количественного определения LOQ (Limit of Quantification) определялся по результатам измерения стандартного образца РВЭ-3, содержащего самые низкие концентрации летучих компонентов среди всех приготовленных по п. 2.1.1 образцов [54];
- правильность метода была оценена путем расчета относительных величин смещения (Relative Bias) i -го компонента на l -ом уровне концентраций по следующей формуле:

$$Relative\ bias_{il}, \% = \frac{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (Concn_{ilj} - Concn_{il}^{st})}{Concn_{il}^{st}} \cdot 100\%, \quad (9)$$

где $Concn_{ilj}$ j -ая измеренная концентрация i -го летучего компонента в l -ом стандартном образце, мг/л АА; $Concn_{il}^{st}$ – приготовленная (стандартная) концентрация i -го летучего компонента в l -ом стандартном образце, мг/л АА; N – число измерений, 30.

2.2 Исследование метода на ГХ-МС

2.2.1 Приготовление стандартных образцов

Для исследований использовались образцы РВЭ приготовленные по п. 2.1.1. Для проверки линейности детектора был приготовлен отдельный набор образцов путем разбавления образца РВЭ-А (п. 2.1.1) водой в 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 5000 раз. Кроме этого, чистый этанол (Lach-Ner, Чехия) был смешан с водой для получения 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 90 % (об.) водно-этанольных растворов.

Для проверки работоспособности метода на реальных образцах алкогольной продукции в коммерческом источнике были приобретены два дистиллированных спиртных напитка известных брендов: виски и коньяк.

2.2.2 Параметры оборудования

Для измерений был использован газовый хроматограф «GCMS-QP2010» фирмы Shimadzu. Использовалась капиллярная колонка ZB-WAX plus со следующими параметрами: длина – 60 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, толщина фазы – 0,5 мкм. Использовались следующие ГХ параметры: температура испарителя – 170 °С; газ носитель – гелий (99,999%); скорость потока – 1,36 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 0,5 мкл, сброс – 1:50. Были использованы следующие параметры термостата колонки: начальная изотерма 60 °С выдерживалась 9 минут, затем увеличивалась до 120 °С со скоростью 10 °С/мин, затем увеличивалась до 210 °С со скоростью 30 °С/мин с конечной изотермой в 2 минуты. Все измерение занимало 20 минут. МС детектор использовался в режиме электронного удара (70 эВ), температура источника ионов устанавливалась равной 230 °С. На конце колонки был установлен кварцевый Y-разветвитель, который направлял потоки в МС детектор и ПИД в соотношении 1:9, соответственно.

2.3 Установление неопределенностей измерений

Расчет погрешностей (неопределенностей) выполняемых измерений был проведен в соответствии с требованиями серии стандартов ИСО 5725 [ссылка] и руководством Евролаб [ссылка].

Неопределенности измерений u массовых концентрации определяемых летучих компонентов, выраженные в процентах, были рассчитаны как корень суммы квадратов стандартного отклонения s , характеризующего прецизионность измерения, и оценки смещения b по формуле (10):

$$u = \sqrt{s^2 + b^2}. \quad (10)$$

Стандартное отклонение s , выраженное в процентах, рассчитывали по следующей формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \cdot 100\% / x_{ref}, \quad (11)$$

где x_i – результат единичного измерения из n параллельных измерений; \bar{x} – среднее арифметическое n параллельных результатов; x_{ref} – паспортное значение концентрации летучего компонента в стандартном образце.

Вклад смещения в неопределенность, выраженный в процентах, определяли из среднего смещения Δ , неопределенности эталонного значения u_{ref} и вариации оценки смещения s^2/n по следующей формуле:

$$b = \sqrt{\Delta^2 + u_{ref}^2 + \frac{s^2}{n}}. \quad (12)$$

Среднее смещение метода Δ , выраженное в процентах, определяли по следующей формуле:

$$\Delta = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_{ref})^2}}{x_{ref}} \cdot 100\% . \quad (13)$$

Неопределенности эталонного значения u_{ref} , т.е. неопределенности паспортных значений приготовленных стандартных образцов, были установлены расчетно-экспериментальным путем. Для всех исследуемых летучих компонентов во всех приготовленных образцах, кроме образцов РВЭ-2 и РВЭ-3, неопределенность паспортной концентрации составила 3 %, для образцов РВЭ-2 и РВЭ-3 – 4,5 %.

Величина относительной расширенной неопределенности U рассчитывалась как удвоенное значение u ($P=0,95$).

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Валидация метода в одной лаборатории

Повторяемость метода была оценена для двух диапазонов концентраций: низкого и высокого. К диапазону низких концентраций отнесли результаты измерений стандартных образцов РВЭ-2 и РВЭ-3, к диапазону высоких концентраций – все остальные приготовленные стандартные образцы. Таблица 3 содержит максимальные значения ОСКО повторяемости и воспроизводимости среди стандартных образцов, входящих в соответствующую группу. Анализ полученных результатов указывает на высокую прецизионность метода.

Таблица 3.1 – Максимальные величины ОСКО повторяемости (RSD_t) и воспроизводимости (RSD_R) для двух диапазонов концентраций. Диапазон 1: 10–25 мг/л АА для метанола и 2–10 мг/л АА для остальных компонентов. Диапазон 2: 25–5000 мг/л АА для метанола и 10–5000 мг/л АА для остальных компонентов

Компонент	Относительное среднеквадратическое отклонение, %			
	Диапазон 1		Диапазон 2	
	RSD_t	RSD_R	RSD_t	RSD_R
ацетальдегид	2,9	3,2	1,7	1,6
метилацетат	4,5	5,0	2,0	2,0
этилацетат	4,4	4,7	1,7	2,0
метанол	0,9	1,1	0,9	1,5
2-пропанол	2,8	3,6	1,7	1,9
1-пропанол	4,5	4,3	1,7	1,7
изобутанол	2,7	3,4	1,3	1,4
1-бутанол	4,5	4,7	0,9	1,6
изоамилол	4,4	4,1	1,2	1,7

По результатам исследования линейности, коэффициент детерминации R^2 для всех исследуемых летучих компонентов был не ниже 0,9959, что свидетельствует о высокой линейности метода в выбранном широком диапазоне концентраций.

Величины смещений и пределов количественного определения приведены в таблице 4. Анализ полученных результатов показал, что метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» позволяет получать правильные значения концентраций летучих примесей на всем исследуемом диапазоне концентраций летучих компонентов, о чем свидетельствуют низкие величины относительных смещений метода.

Таблица 3.2 – Величины относительных смещений и пределов количественного определения метода

Компонент	Относительное смещение, %						LOQ, мг/л АА
	РВЭ-3	РВЭ-2	РВЭ-1	РВЭ-D	РВЭ-B	РВЭ-A	
ацетальдегид	-2,6	-0,6	-1,4	0,4	-0,5	-0,3	0,30
метилацетат	0,7	-0,3	-1,0	0,8	-0,2	-0,5	0,23
этилацетат	-1,7	-0,2	0,6	0,6	0,0	-0,5	0,30
метанол	-1,0	-0,1	-1,2	0,2	0,0	-0,2	0,33
2-пропанол	-2,0	-0,2	-0,1	0,9	-0,3	-0,5	0,25
1-пропанол	-2,0	-0,8	-0,2	0,1	-0,2	-0,1	0,25
изобутанол	-2,0	-0,3	-0,3	0,2	0,1	-0,3	0,16
1-бутанол	-2,0	-0,3	-0,1	0,2	0,0	-0,1	0,26
изоамилол	-2,0	-0,3	-0,1	0,3	0,0	0,0	0,27

Погрешность метода была оценена путем расчета величин относительной расширенной неопределенности U (п. 2.3). Величины U были установлены для всех исследуемых компонентов во всех исследуемых образцах. Далее выбирали максимальное значение неопределенности для каждого исследуемого компонента среди образцов, входящий в один из двух диапазонов. Диапазон 1 составлял 10–25 мг/л АА для метанола и 1–10 мг/л АА для остальных компонентов и включал в себя стандартные образцы РВЭ-2 и РВЭ-3. Диапазон 2 составлял 25–5000 мг/л АА для метанола и 10–5000 мг/л АА для остальных компонентов и включал в себя стандартные образцы РВЭ-1, РВЭ-D, РВЭ-B и РВЭ-A. Полученные результаты оценки неопределенности метода приведены в таблице 5.

Таблица 3.3 – Неопределенность предложенного метода на ГХ-ПИД, установленная для двух диапазонов концентраций летучих примесей

Компонент	Диапазон концентраций, мг/л АА	Относительная расширенная неопределенность U , %
ацетальдегид	1–10	11,2
	10–5000	5,8
метилацетат	1–10	13,0
	10–5000	6,1
этилацетат	1–10	13,3
	10–5000	6,1
метанол	10–25	6,7
	25–5000	5,1
пропанол-2	1–10	10,3
	10–5000	5,7
пропанол-1	1–10	11,4
	10–5000	5,4
изобутанол	1–10	10,0
	10–5000	5,0
бутанол-1	1–10	12,0
	10–5000	5,2
изоамилол	1–10	11,5
	10–5000	5,3

Приобретенный образец виски был измерен 30 раз аналогично приготовленным образцам. Для него не представлялось возможным установить характеристики точности метода, поэтому в данном случае были проведены лишь оценки прецизионности, приведенные в таблице 6.

Таблица 3.4 – Результаты измерения приобретенного образца виски и определенные характеристики прецизионности метода

Компонент	Концентрация, мг/л АА	RSD _r , %	RSD _R , %
ацетальдегид	57,9	0,7	1,6
метилацетат	12,3	2,1	2,4
этилацетат	371	1,3	1,7
метанол	65,5	0,5	0,6
2-пропанол	3,09	2,3	2,9
1-пропанол	621	0,1	0,2
изобутанол	623	0,4	0,4
1-бутанол	3,59	3,0	2,8
изоамилол	778	0,2	0,2

3.2 Валидация метода на основании ранее полученных данных

Возможность валидации метода «Этанол в качестве внутреннего стандарта» на основании ранее полученных данных была продемонстрирована на примере статьи [55]. Данная работа содержит результаты валидации метода традиционного внутреннего стандарта в одной лаборатории по алгоритмам, изложенным в регламенте Еврокомиссии ЕС 2870/2000 [27].

После обращения, авторы статьи предоставили данные гравиметрически приготовленных стандартных образцов. Концентрации в них были рассчитаны в единицах измерения мг/л АА, после чего были установлены относительные факторы отклика RRF_i^{Eth} по алгоритмам, изложенным в п 1.4.1.1. Концентрации летучих компонентов в этих образцах, а также относительные факторы отклика, рассчитанные относительно этанола в 3-пентанола, выбранного традиционного внутреннего стандарта, приведены в таблице 7.

Таблица 3.5 – Концентрации летучих компонентов в единицах измерения мг/л АА в стандартных образцах «0,05» - «2,0» и средние калибровочные коэффициенты RRF для двух внутренних стандартов

Вещество	Концентрация, мг/л АА				Средний калибровочный коэффициент	
	“0,05”	“0,1”	“0,5”	“2,0”	RRF_i^{Eth}	RRF_i^{3-pent}
ацетальдегид	25.0	50.1	250	1001	1.319	2.011
метилацетат	32.6	65.2	326	1303	1.733	2.642
этилацетат	33.0	66.0	330	1320	1.275	1.945
метанол	28.9	57.7	289	1155	1.427	2.175
этанол	789300				1.000	1.525
2-бутанол	29.7	59.3	297	1186	0.777	1.184
1-пропанол	28.8	57.6	288	1153	0.796	1.214
изобутанол	29.8	59.5	298	1191	0.676	1.030
3-пентанол	583				0.656	1.000
1-бутанол	30.0	60.0	300	1200	0.713	1.087
2-метил-1-бутанол	29.3	58.5	293	1171	0.656	1.000
изоамилол	29.1	58.1	290	1162	0.643	0.980

После калибровки, концентрации в стандартных образцах «0,05» - «2,0», приготовленных авторами статьи [55] согласно п. 5.14.6 регламента Еврокомиссии [27] были пересчитаны по предложенному методу. На основании полученных данных была оценена линейность метода. Коэффициенты аппроксимации R^2 для всех исследуемых компонентов в случае традиционного метода, используемого авторами статьи, были не ниже 0,9981, в случае предложенного метода – не ниже 0,9999.

Дополнительно для данных стандартных образцов были рассчитаны относительные стандартные отклонения, которые находятся в таблице 8. Анализ полученных экспериментальных результатов показывает, что прецизионность метода с использованием этанола в качестве внутреннего стандарта не хуже прецизионности традиционного метода внутреннего стандарта, поскольку соответствующие величины относительного стандартного отклонения сопоставимы.

Таблица 3.6 – Относительные стандартные отклонения нового и традиционного методов в образцах «0,05» - «2,0» согласно п. 5.14.6 регламента Еврокомиссии [2]

Вещество	Относительное стандартное отклонение, %							
	“0,05”		“0,1”		“0,5”		“2,0”	
	Нов.	Трад.	Нов.	Трад.	Нов.	Трад.	Нов.	Трад.
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

На основании полученных результатов также была оценена правильность метода путем расчета величин относительного смещения. В таблице 9 приведены величины смещений, полученные для обоих методов. Несмотря на то, что метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» не показал меньшее смещение во всех случаях, показано, что его точность сопоставима с точностью традиционного метода внутреннего стандарта даже на низких концентрациях исследуемых примесей.

Таблица 9. Смещения

Также была проведена оценка пределов количественного определения двух методов. Полученные результаты приведены на рисунке 6. Полученные результаты очень близки, что свидетельствует о том, что метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» не хуже традиционного метода в плане пределов количественного определения летучих примесей.

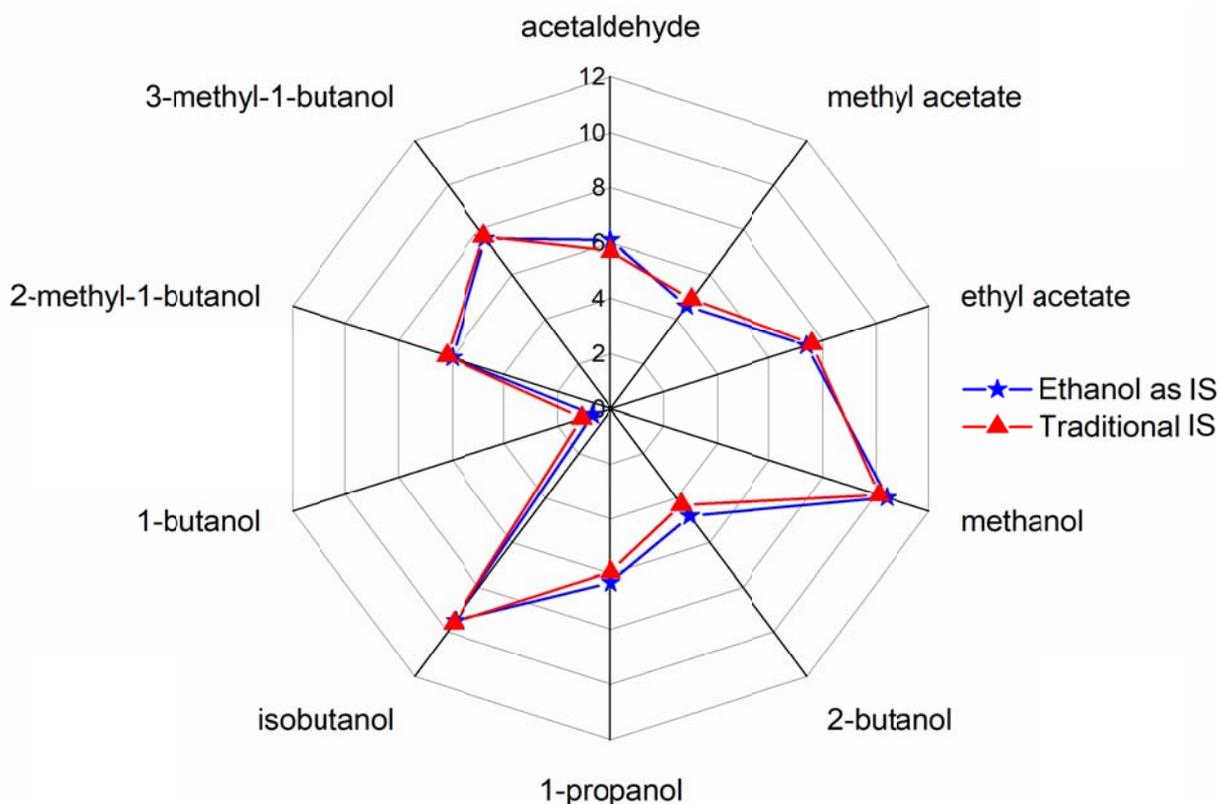


Рисунок 3.1 – Диаграмма пределов количественного определения (мг/л АА) двух методов

Авторы статьи [55] также выполняли измерения четырех образцов реальных алкогольных напитков: вина, бренди, ракии и виски. В качестве примера, на рисунке 7 в логарифмическом масштабе приведена хроматограмма ракии, на которой цветом отмечены пики, соответствующие двум выбранным внутренним стандартам: пентанол-3 (традиционный) и этанол (предложенный). Величины концентраций летучих компонентов в напитках, измеренных новым и традиционным методами внутреннего стандарта, мг/л АА, приведены в таблице 8. Для проверки наличия значимого смещения между полученными результатами был использован t-тест Стьюдента для двух независимых выборок.

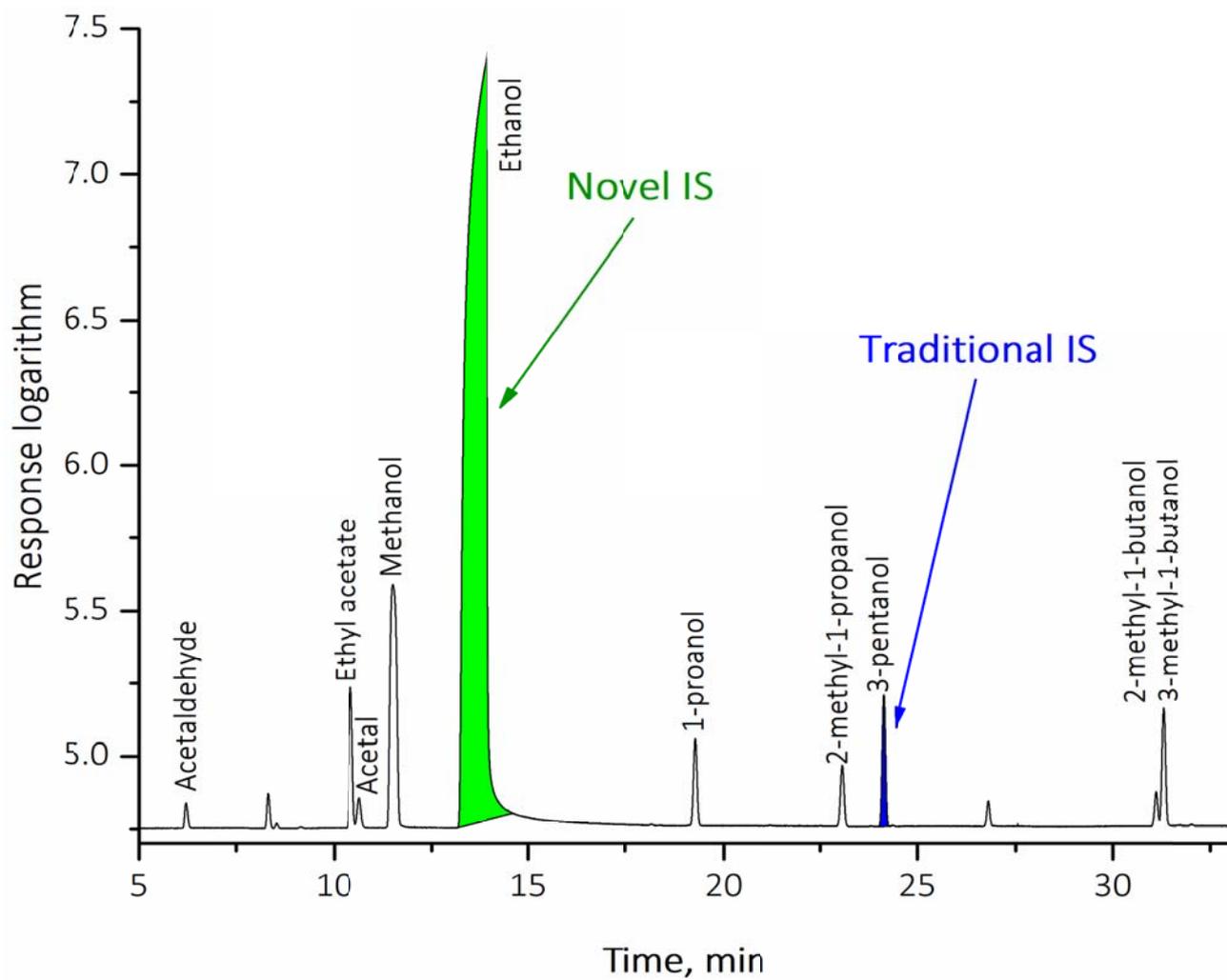


Рисунок 3.2. Хроматограмма ракии в логарифмическом масштабе.

Таблица 3.6 – Величины концентраций летучих компонентов в напитках, измеренных новым и традиционным методами внутреннего стандарта, мг/л АА, и проверка двух выборок на наличие значимого смещения между ними

Компонент	Вино			Бренди			Ракия			Виски		
	Нов.	Трад.	t	Нов.	Трад.	t	Нов.	Трад.	t	Нов.	Трад.	t
ацетальдегид	40.9	42.3	Нет	99.1	102.4	Нет	113.5	137.2	Нет	55.9	58.3	Нет
этилацетат	430.7	444.7	Нет	145.8	150.6	Нет	933.6	1128.6	Да	170.9	178.3	Нет
ацеталь	—	—	—	46.9	48.4	Нет	100.3	121.3	Да	23.8	24.8	Нет
метанол	1213.2	1252.5	Нет	88.3	91.3	Нет	5190.3	6274.3	Да	71.1	74.2	Нет
пропанол-1	149.0	153.8	Нет	412.6	426.4	Нет	297.8	360.0	Да	352.3	367.6	Нет
изобутанол	250.9	259.1	Нет	419.4	433.5	Нет	167.6	202.6	Да	406.4	424.1	Нет
2-метил-1-бутанол	207.7	214.4	Нет	108.8	112.4	Нет	64.1	77.4	Нет	146.5	152.9	Нет
изоамилол	850.2	877.8	Нет	329.4	340.4	Нет	359.6	434.7	Да	369.4	385.6	Нет

Сравнение полученных результатов по t-критерию Стьюдента для двух независимых выборок показало, что в трех из четырех напитках для всех исследуемых компонентов статистически значимая разность результатов измерений отсутствует. Исключением являлся образец ракии, для которого смещение было значимым почти для всех компонентов. Анализ полученных результатов показал, что величины концентраций всех летучих компонентов, полученные предложенным методом меньше представленных авторами на одну и ту же величину (порядка 21%). Этот факт указывает на высокую вероятность ошибки в данных, представленных авторами статьи.

Вариант 1. Написать, что авторы вероятно ошиблись, предоставив не ту крепость, т.е. оставить как есть

Вариант 2. Написать, что после контакта с авторами, было подтверждено, что они ошиблись, и что значимого смещения на самом деле нет. (плюс в том, что покажем, что метод референтный и позволяет идентифицировать такие вот ошибки)

Вариант 3. Просто написать, что смещения отсутствуют везде

Причиной такого могла быть ошибка при добавлении традиционного внутреннего стандарта или определения крепости. В связи с тем, что для всех остальных образцов, в том числе и гравиметрически приготовленных, величины концентраций оказались близки, отсутствуют основания полагать, что предложенный метод привел к некорректным величинам концентраций в случае анализа ракии.

Таким образом, в данном разделе были продемонстрированы результаты валидации предложенного метода прямого количественного определения летучих компонентов в алкогольной продукции на основании ранее полученных данных. В ходе валидации были оценены такие важнейшие метрологические характеристики как повторяемость, линейность, предел количественного определения и смещение. По результатам расчета всех вышеперечисленных характеристик по предложенному методу можно утверждать, что он является не хуже традиционного метода внутреннего стандарта. Отсутствие статистически значимого смещения между методами при анализе реальных образцов алкогольных напитков также свидетельствует о возможности его применения на практике.

3.3 Исследование метода на ГХ-МС

3.3.1 Описание SIM метода. Примеры получаемых хроматограмм

Для селективной регистрации ряда летучих компонентов был создан SIM режим на ГХ-МС. Все исследуемые летучие компоненты были разделены на группы, в которых селективно детектировался конкретный набор ионов. Если у компонентов совпадали самые распространенные масс-зарядные фрагменты,

они объединялись в одну группу. В таблице 9 содержится информация о веществах, входящих в отдельные группы, временах и выбранных ионов.

Таблица 3.7 – Описание созданного режима SIM

Соединение	Группа, №	Время, мин	m/z
ацетальдегид метилацетат этилацетат	1	0.00-8.85	29, 43
метанол	2	8.85-9.50	29, 31, 32
пропанол-2	3	9.50-10.14	27, 43, 45
этанол	4	10.14-12.00	47
пропанол-1	5	12.00-13.70	31, 41-43
вода	6	13.70-14.80	19 или 20
изобутанол бутанол-1 изоамилол	7	14.80-20.00	31, 41-43, 55, 56

Было обнаружено, что вода, являясь основным компонентом изучаемых смесей, может быть зарегистрирована аналогично этанолу, путем выбора иона 19 или 20, что соответствует нефрагментированным молекулам, содержащим один или два тяжелых изотопа, соответственно. Ввиду отсутствия необходимости регистрации сигнала воды и с целью более бережного отношения к детектору в большинстве экспериментов в период выхода воды (13.7-14.8 мин) детектор отключали.

На рисунке 8 приведен пример полученной хроматограммы самого концентрированного стандартного образца РВЭ-А.

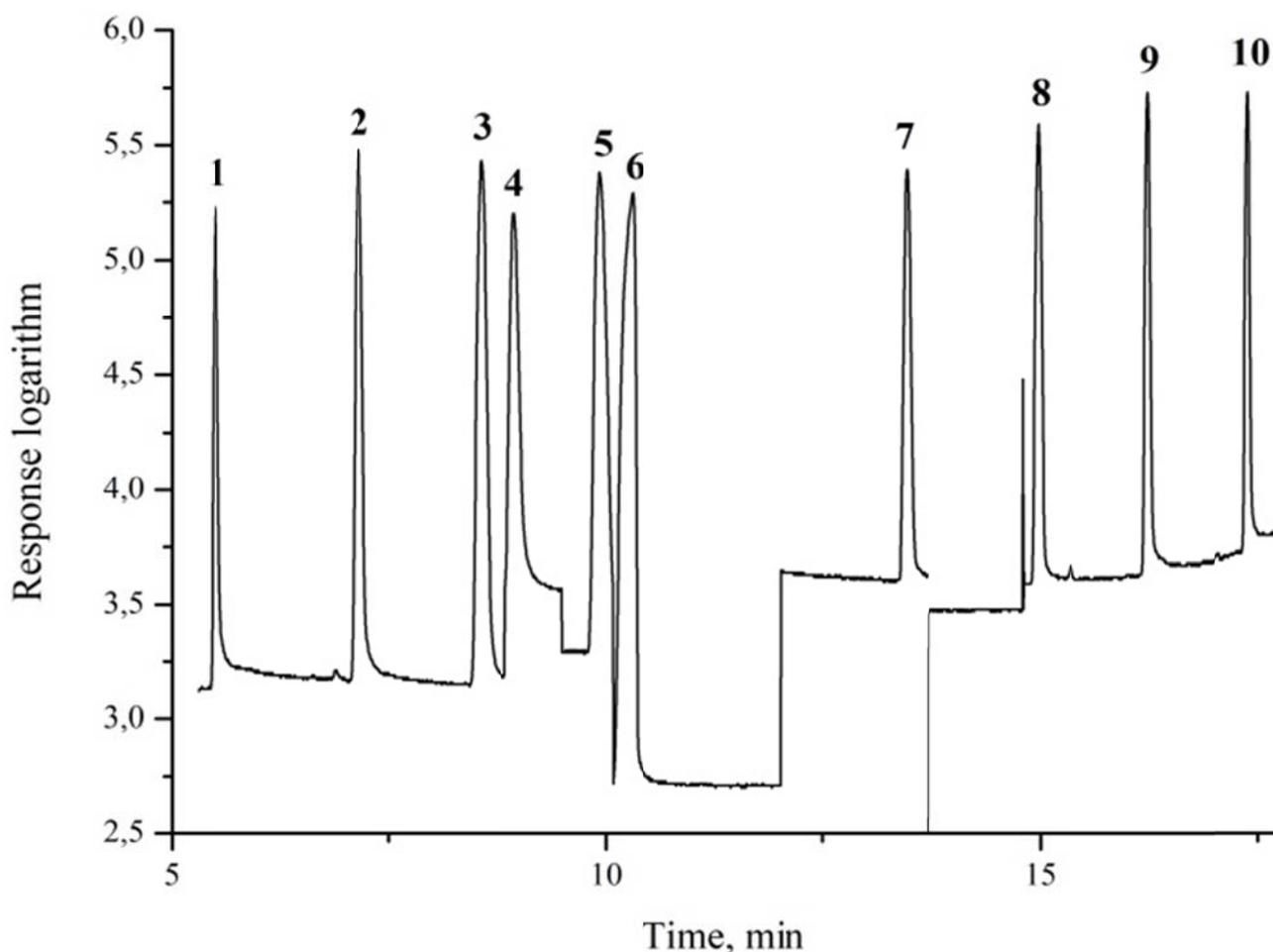


Рисунок 3.3 – МС Хроматограмма образца РВЭ-А

В случае анализа образцов с относительно большим содержанием летучих компонентов сигналы последних будут сопоставимы с сигналом этанола. Большие концентрации летучих компонентов могут встретиться при анализе спиртных напитков из мезги. Так, например, согласно регламенту [1] содержание метанола в напитках, полученных из виноградной или фруктовой мезги не должно превышать 10.000 и 15.000 мг/л АА, соответственно, что в несколько раз превышает концентрацию метанола в измеренной смеси РВЭ-А (рис. 8). Можно предположить, что при анализе образца, содержащего метанол или другие летучие компоненты в таких концентрациях, площадь пика исследуемого летучего компонента будет превышать площадь пика этанола.

3.3.2 Калибровка прибора

Калибровка ГХ-МС была проведена путем установления коэффициентов *RRF* по формуле (7). Для этого был использован образец РВЭ-С, который был измерен трижды в условиях повторяемости. Ввиду того, что на выходе из колонки поток направлялся одновременно в МСД и ПИД, калибровочные

коэффициенты были определены для обоих детекторов. Полученные результаты приведены в таблице 10.

Таблица 3.8 – Полученные калибровочные коэффициенты

Компонент	RRF (ПИД)	RRF (МСД)
ацетальдегид	2.157	0.02120
метилацетат	2.408	0.00821
этилацетат	1.842	0.00733
метанол	1.872	0.01065
пропанол-2	1.282	0.00595
этанол	1.000	1.00000
пропанол-1	1.015	0.00946
изобутанол	0.887	0.00713
бутанол-1	0.897	0.00639
изоамилол	0.819	0.00709

Как и ожидалось, ввиду искусственного уменьшения интенсивности отклика детектора на этанол, получаемые калибровочные коэффициенты уменьшились в большой степени и стали много меньше единицы. Естественно, величины RRF для этанола в обоих случаях были равны единице.

3.3.3 Оценка метрологических характеристик

Оценка метрологических характеристик метода была проведена путем анализа приготовленных стандартных образцов «РВЭ».

Повторяемость метода была оценена путем расчета величин относительного среднеквадратичного отклонения (ОСКО) согласно требованиям стандарта ИСО 5725 [52]. Полученная диаграмма приведена на рисунке 9.

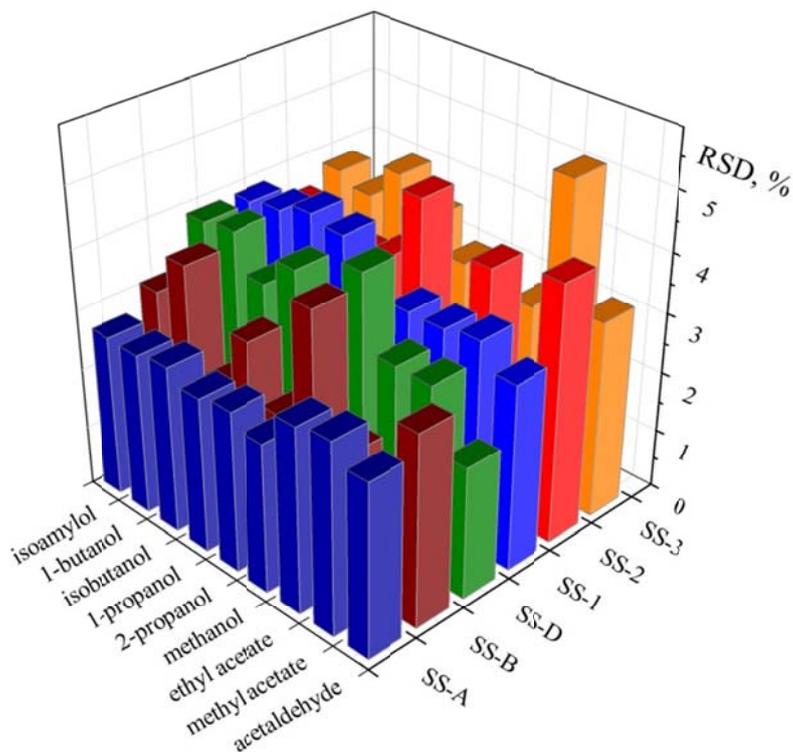


Рисунок 3.4 – ОСКО метода на разных уровнях концентраций

Было обнаружено отсутствие какой-либо зависимости ОСКО от концентраций компонентов.

Правильность метода, как одна из важнейших его характеристик была оценена путем расчета величин относительного смещения метода. Результаты приведены в виде диаграммы на рисунке 10.

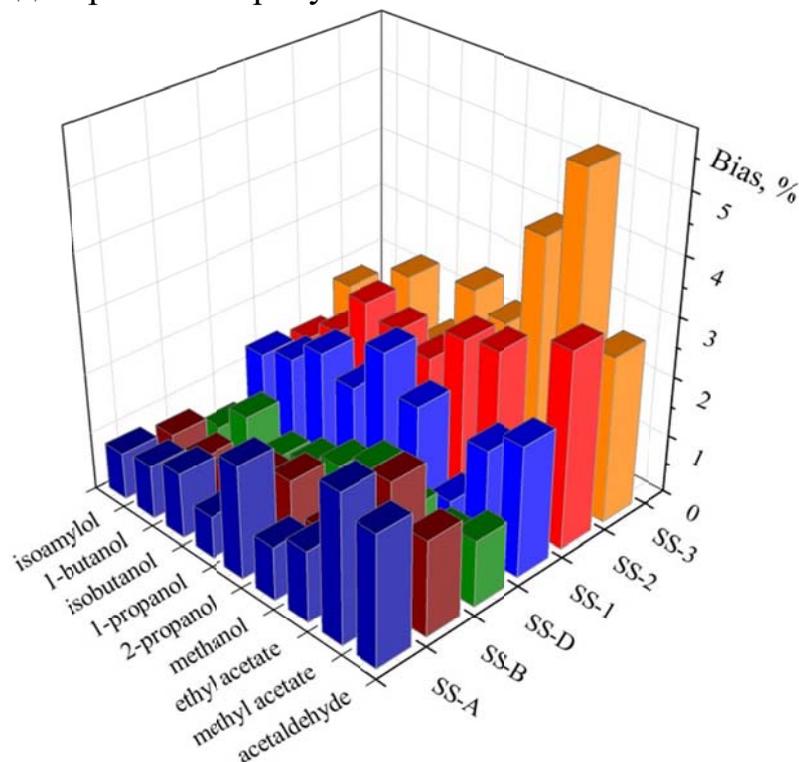


Рисунок 3.5 – Смещение метода на разных уровнях концентраций

Большинство полученных значений не превысило 3%. Исключением являлись образцы «РВЭ-2» и «РВЭ-3», имеющие самые маленькие значения концентраций исследуемых компонентов. Ранее, при проверке правильности метода на ПИД, мы наблюдали подобное явление. Это может быть связано с высокой реакционной способностью ацетальдегида и сложных эфиров. Так или иначе, величины смещения являются удовлетворительными, и метод по праву может считаться правильным.

Для оценки пределов количественного определения, смесь РВЭ-3 с самыми низкими значениями концентраций анализируемых компонентов была десятикратно измерена. Величины LOQ были рассчитаны как десятикратно увеличенное стандартное отклонение и приведены в таблице 11.

Таблица 3.9 – Рассчитанные величины LOQ для ПИД и МСД

Компонент	LOQ, мг/л АА	
	ПИД	МСД
ацетальдегид	1.15	0.72
метилацетат	2.04	0.79
этилацетат	1.53	0.75
метанол	0.66	0.61
пропанол-2	1.71	0.84
этанол	0.94	0.43
пропанол-1	1.13	0.48
изобутанол	0.71	0.33
бутанол-1	0.75	0.31

Как и ожидалось, пределы количественного определения для МСД оказались ниже, чем в случае ПИД. Здесь необходимо отметить, что из-за того, что поток колонки одновременно направлялся в ПИД и МСД и был разделен в соотношении 9:1, соответственно, в действительности, пределы количественного определения для МСД значительно ниже. Но даже в случае разделенного потока полученные величины оказались ниже предела определения для ПИД. Следовательно, метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта», может применяться на ГХ-МС системах при анализе таких образцов алкогольной продукции как водка и спирт этиловый ректифицированный высшей очистки: такие образцы, как правило, содержат примеси в минимально определяемых количествах.

Неопределенность метода была оценена аналогично п. 3.1, описывающего результаты валидации метода в одной лаборатории. Величины U были также установлены для всех исследуемых компонентов во всех исследуемых

образцах. Полученные результаты оценки неопределенности метода приведены в таблице 12.

Таблица 3.10 – Неопределенность предложенного метода на ГХ-МС, установленная для двух диапазонов концентраций летучих примесей

Компонент	Диапазон концентраций, мг/л АА	Относительная расширенная неопределенность U , %
ацетальдегид	1–10	15,2
	10–5000	10,7
метилацетат	1–10	13,1
	10–5000	7,6
этилацетат	1–10	8,6
	10–5000	6,8
метанол	10–25	9,6
	25–5000	6,2
пропанол-2	1–10	12,8
	10–5000	7,9
пропанол-1	1–10	10,4
	10–5000	5,4
изобутанол	1–10	11,2
	10–5000	8,4
бутанол-1	1–10	13,1
	10–5000	8,5
изоамилол	1–10	10,8
	10–5000	8,3

3.3.4 Линейность

В связи с использованием комбинации нетрадиционных в аналитической химии подходов, а именно, использовании основного компонента в качестве вещества внутреннего стандарта и уменьшение чувствительности МСД к нему, линейность метода была изучена тремя разными способами с целью всесторонней объективной оценки.

3.3.4.1 Варьируемое содержание примесей при фиксированном содержании этанола

Этот способ заключается в изучении стандартных образцов «РВЭ» (п. 2.1.1), которые были приготовлены путем разбавления образца «РВЭ-А» водно-этанольной смесью. Таким образом, содержание этанола во всех образцах оставалось постоянным – 40 объемных процентов, а содержание примесей

варьировалось от 5000 до единиц мг/л АА. На основании результатов измерений для каждого исследуемого i -го летучего компонента были построены соответствующие линейные зависимости в координатах отношение площадей – отношение концентраций i -го компонента к этанолу. Коэффициенты детерминации R^2 полученных зависимостей имели значения не ниже 0,9975.

3.3.4.2 Варьируемое содержание этанола и примесей

Данный тип линейности метода был оценен путем измерения растворов, полученных разбавлением стандартного образца «РВЭ-А» водой, а не ВЭС. Образец «РВЭ-А» был разбавлен водой в 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 5000 раз. На рисунке 11 приведена хроматограмма образца «РВЭ-А», разбавленного водой в 1000 раз.

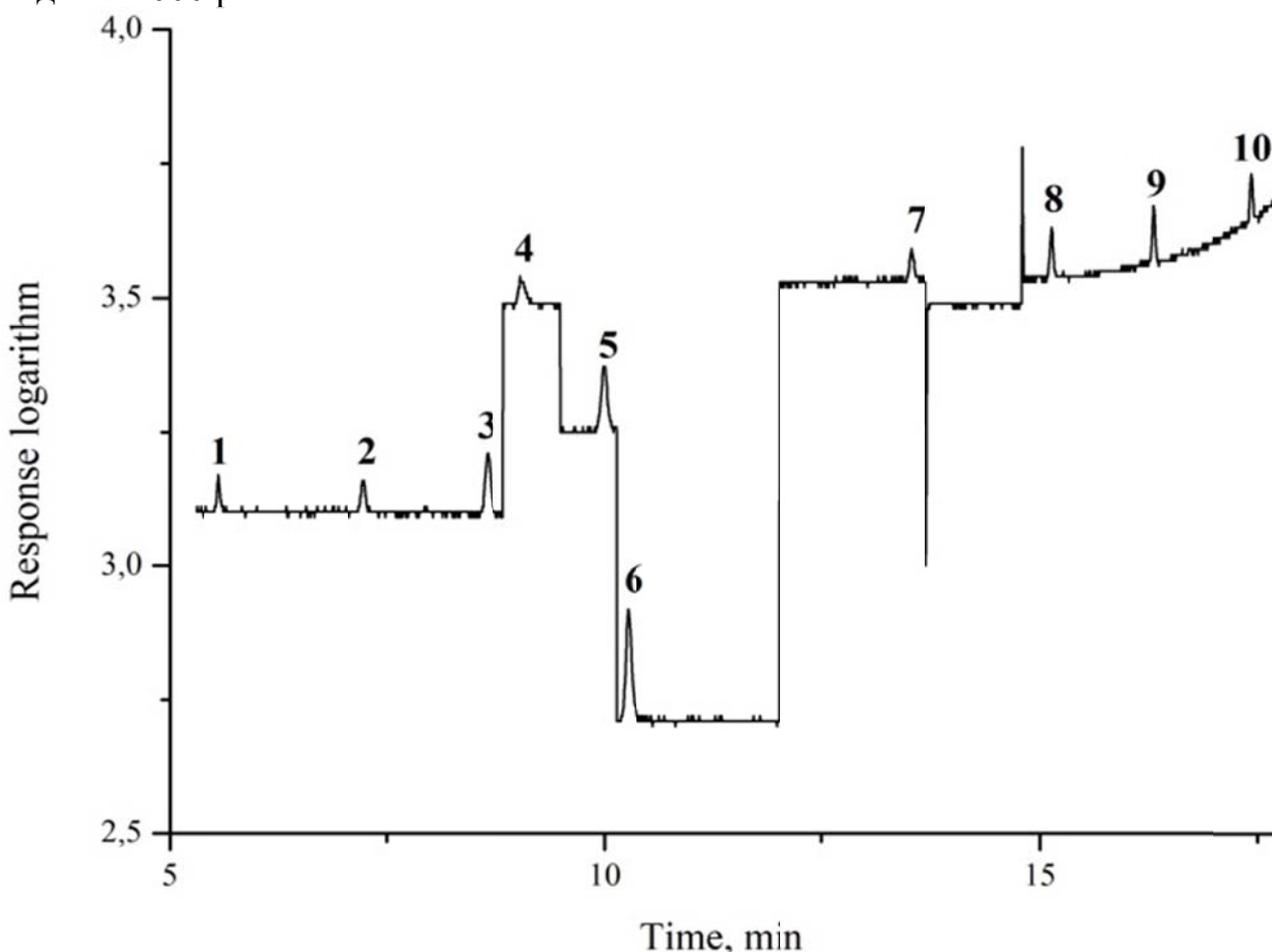


Рисунок 3.6 – Хроматограмма образца «РВЭ-А», разбавленного водой (1:1000)

По мере разбавления образца «РВЭ-А» концентрации летучих компонентов в размерности мг/л будут уменьшаться. Однако, ввиду того, что образец разбавляли водой, и крепость образцов уменьшалась пропорционально коэффициенту разбавления, концентрации компонентов в размерности мг/л АА оставались постоянными. В связи с этим даже при 5000-кратном разбавлении

образца водой, концентрация примесей в мг/л АА была такой же, как и в исходном образце «РВЭ-А».

Пример полученной линейной зависимости для метанола приведен на рисунке. Он содержит в себе информацию об отклике детектора на компонент, в зависимости от его концентрации в единицах измерения мг/л и мг/л АА. Как было указано выше, график прямой для размерности мг/л АА имеет вид $y=const$, поскольку концентрации примесей в мг/л АА не менялись. Коэффициент детерминации R^2 для всех компонентов был не ниже 0,9986.

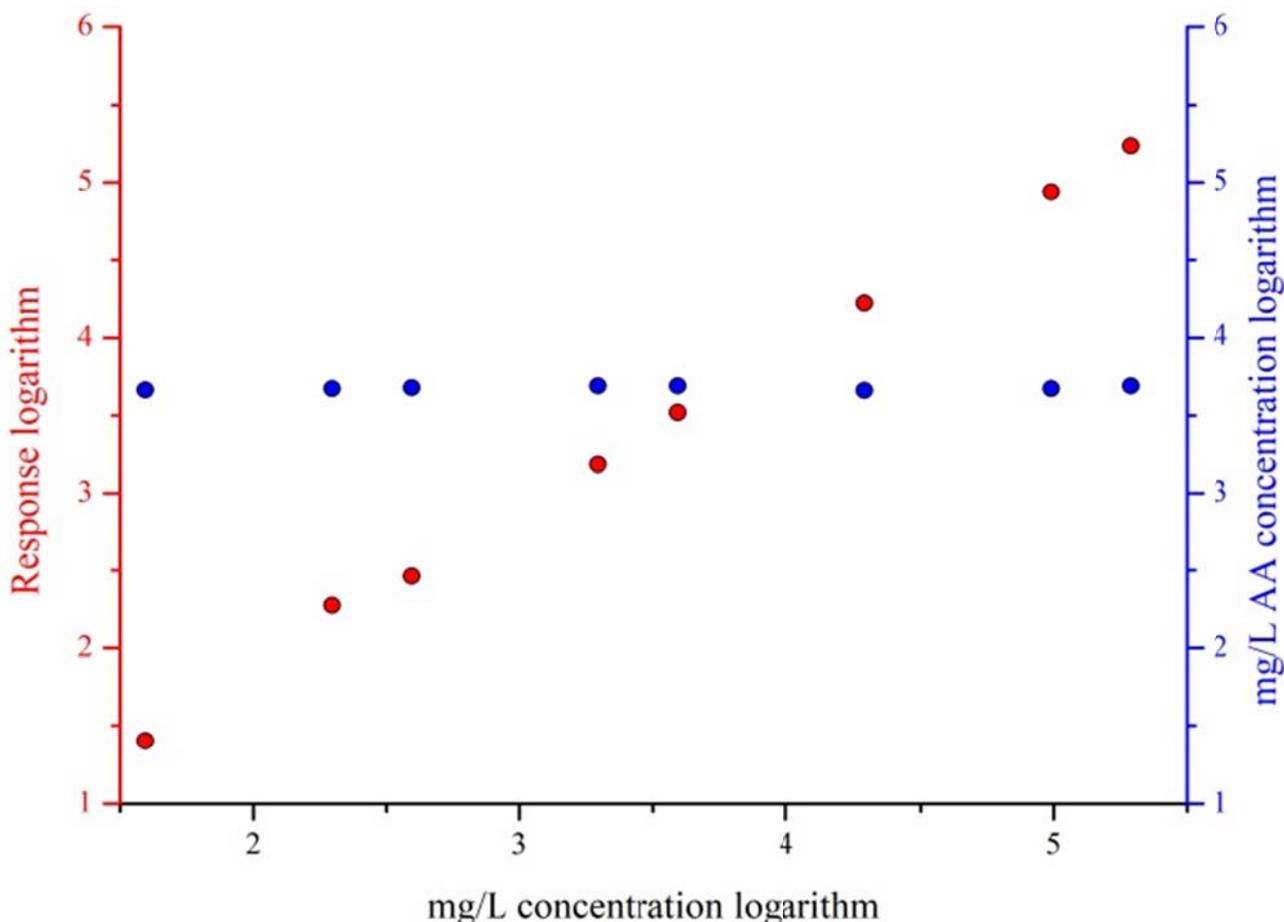


Рисунок 3.7 – Линейность метода на примере метанола. Коэффициент детерминации R^2 равен 0,9994

3.3.4.3 Варьируемое содержание этанола

В заключение были проведены исследования линейности отклика детектора от объемного содержания этанола в образце. Водно-этанольные образцы с объемным содержанием этанола 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100% были приготовлены путем смешения воды и абсолютного этанола. Образцы измерялись не только изотопным методом, но и методом понижения напряжения на детекторе. В последнем случае в соответствующем окне SIM режима регистрировались самые интенсивные пики спектра этанола (27, 31 и 45, см. рис. 5) и уменьшалось напряжение на детекторе с 0,96 кВ до 0,6 кВ.

Подход с уменьшением напряжения на детекторе использовался только в данном эксперименте ввиду большей сложности процесса.

На рисунке 13 представлены полученные зависимости отклика детектора от объемного содержания этанола. Было обнаружено, что изотопный подход с использованием m/z 47 этанола обладает хорошей линейностью на всем исследуемом диапазоне объемного содержания этанола, от 1 до 100 %: величина рассчитанного коэффициента аппроксимации R^2 составила 0,9959. Что касается подхода с уменьшением напряжения на детекторе, полученный график оказался вовсе не линейным. Было проведено несколько повторных экспериментов, показавших идентичные результаты. Природа нелинейной зависимости отклика детектора в данном случае неясна. Была построена экспоненциальная зависимость отклика в интервале 30-90 % объемного содержания этанола. Величина полученного коэффициента аппроксимации составила 0,9975, что говорит о потенциальной возможности использования данного подхода для анализа большого количества образцов алкогольной продукции. Однако очевидно, что изотопный подход более предпочтительный ввиду линейной зависимости отклика и более широкого диапазона объемных концентраций. Кроме того, не все масс-спектрометры способны к изменению напряжения детектора в процессе измерения.

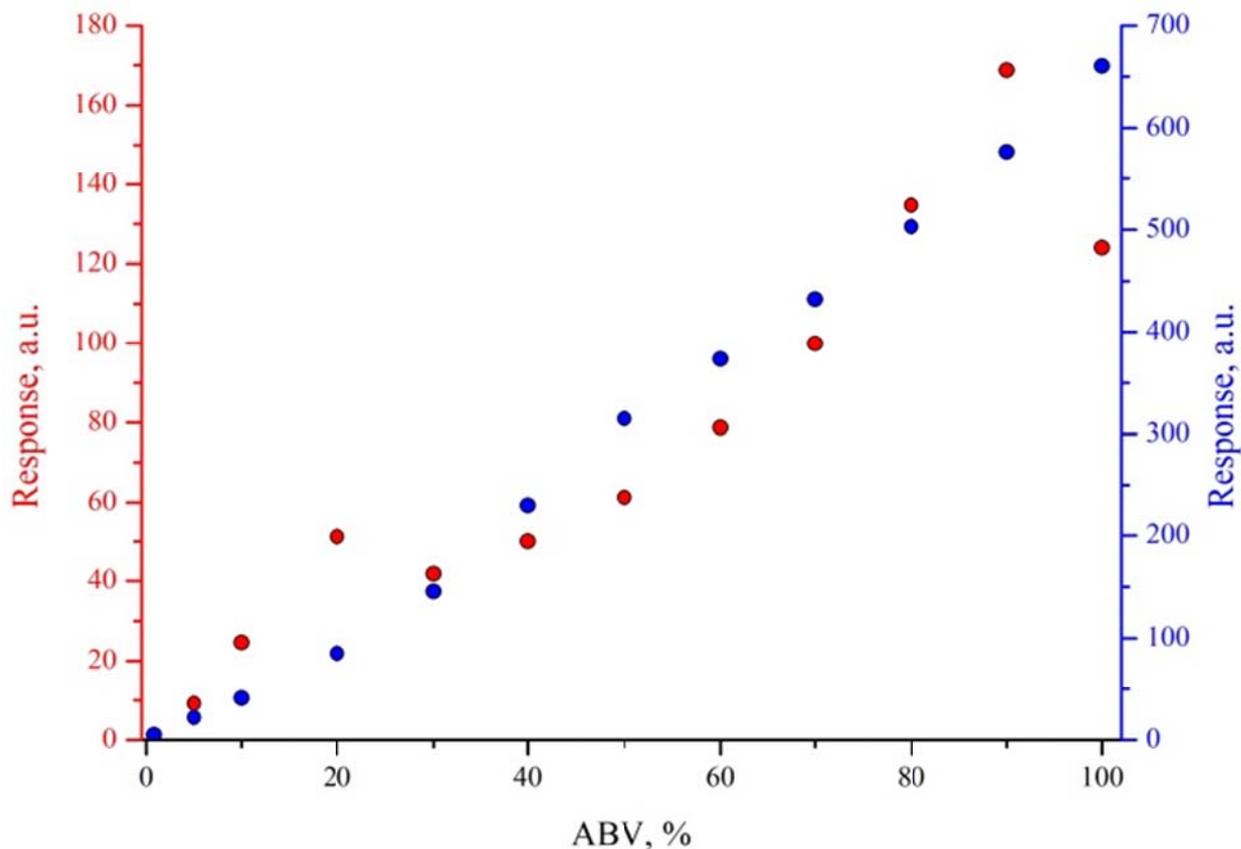


Рисунок 3.8 – Графики зависимости отклика детектора на этанол в зависимости от его объемного содержания. Синими точками помечены результаты, полученные изотопным подходом, красным – подходом с уменьшением напряжения

Таким образом, результаты перекрестной проверки линейности позволяют утверждать, что предложенный метод может быть использован при анализе всего спектра алкогольной продукции с разным количественным содержанием как определяемых летучих компонентов, так и этанола.

3.3.5 Измерение реальных образцов алкогольной продукции

В целях демонстрации работоспособности предложенного метода на реальных образцах алкогольной продукции, были приобретены в коммерческом источнике и проанализированы два популярных спиртных напитка. Данные образцы были измерены методом «Этанол в качестве внутреннего стандарта» на МСД и ПИД. На рисунке 14 представлены МС хроматограммы приобретенных образцов, содержащие сигнал воды (пик w, m/z 19).

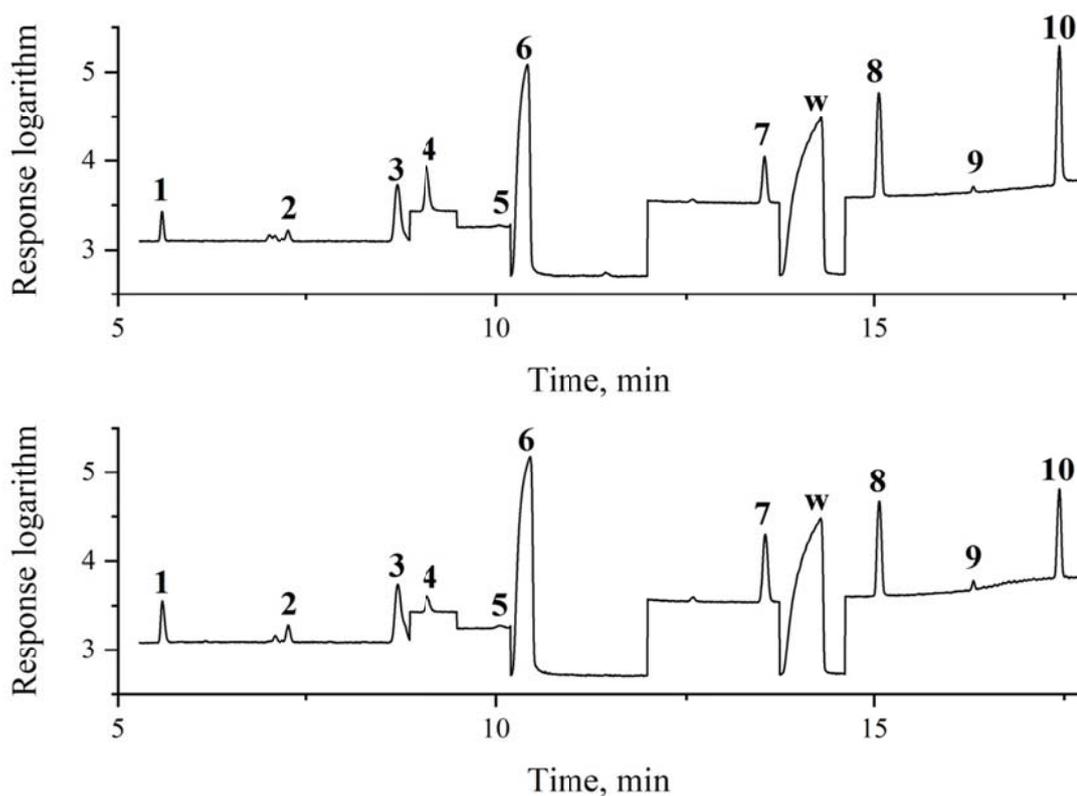


Рисунок 3.9 – Хроматограммы приобретенных образцов алкогольных напитков 1 и 2 (сверху вниз)

Как и ожидалось, результаты, полученные на МСД и ПИД, оказались очень близки друг к другу (см. таблицу 13). Для оценки значимости различий полученных концентраций был применен t-тест Стьюдента для независимых выборок ($p=0,05$). Было установлено, что статистическая значимость различий полученных величин концентраций отсутствует для всех определенных летучих компонентов.

Таблица 3.11 – Результаты определения концентраций летучих компонентов (мг/л АА) в двух приобретенных образцах алкогольных напитков

Вещество	Образец 1		Образец 2	
	ПВД	МСД	ПВД	МСД
ацетальдегид	130.8	133.9	98.7	103.0
метилацетат	9.4	10.3	8.4	8.5
этилацетат	151.1	140.3	219.5	211.8
метанол	51.0	53.9	316.3	322.4
пропанол-2	0.0	1.6	0.0	1.7
пропанол-1	403.1	407.6	267.3	280.3
изобутанол	601.4	606.7	1259	1287
бутанол-1	10.0	9.2	7.4	7.5
изоамилол	642.9	628.0	3368	3266

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объектом исследования данной диссертационной работы является количественное определение летучих примесей в алкогольной продукции. Высокая социальная значимость исследования обусловлена важностью контроля качества данного вида продукции во всем мире.

В работе были представлены существующие методы количественного определения летучих примесей, их теоретические основы и нерешенные ограничения. Были выявлены и аргументированы недостатки, которые имеют единственно существующие в Республике Беларусь стандартные образцы для количественного определения летучих примесей в алкогольной продукции, их влияние на получаемые результаты.

Для решения упомянутых проблем было предложено использовать этанол, основной летучий компонент любого образца алкогольной продукции, в качестве вещества внутреннего стандарта. Этот необычный подход позволяет в значительной степени упростить всю процедуру количественного определения летучих примесей, удешевить ее и сделать более надежной. Доказательство преимуществ метода было основано на валидации, включающей в себя измерения не только гравиметрически приготовленных, но и реальных образцов алкогольной продукции. Анализ полученных результатов позволяет утверждать, что предложенный метод обладает высокими метрологическими характеристиками во всем диапазоне концентраций исследуемых примесей. Линейность метода, его прецизионность и точность, пределы количественного определения оказались не хуже, чем у традиционно используемых методов внутреннего стандарта. В то же время ввиду отсутствия дополнительных процедур внесения вещества внутреннего стандарта извне, измерения плотности и крепости образца, метод является менее материало-, трудо- и времязатратным.

В работе была отражена возможность валидации метода в одной или нескольких лабораториях на основании ранее полученных результатов. Было показано, что если процесс валидации любого другого метода количественного определения летучих примесей был ранее выполнен в лаборатории в соответствии с требованиями международных тематических стандартов, то причины невозможности валидации предложенного метода в этой лаборатории на основании полученных результатов отсутствуют. Были приведены примеры международных организаций, регулярно проводящих межлабораторные испытания образцов алкогольной продукции. Содействие данных организаций в виде предоставления исходных экспериментальных данных выполненным

измерений позволит провести валидацию метода на основании ранее полученных данных на международном уровне.

Работоспособность метода была проверена также на газовом хроматографе, сопряженном с масс-селективным детектором. Было показано, что главной преградой является невозможность регистрации этанола в обычном ТИС режиме. Предложено два пути решения указанной проблемы: использовать ион-квантификатор с масс-зарядным отношением 47, представляющий собой нефрагментированную молекулу этанола с одним тяжелым изотопом, или уменьшать напряжение на МС детекторе в момент выхода этанола. Изотопный подход был признан более предпочтительным, поскольку он более простой в практическом осуществлении и обладает хорошей линейностью не только для исследуемых летучих примесей, но и для этанола во всем диапазоне его объемного содержания. Такие характеристики как правильность, прецизионность и линейность были установлены на основании измерения гравиметрически приготовленных стандартных образцов. Анализ полученных результатов показал, что метод «Этанол в качестве внутреннего стандарта» позволяет получать корректные величины концентраций летучих примесей в любом образце алкогольной продукции. При этом основные достоинства метода, установленные для пламенно-ионизационного детектора, а именно его техническая простота и надежность, сохранились и для МС детектора. А ввиду большей чувствительности МС детектора, пределы количественного определения примесей оказались намного ниже, чем для ПИД. Таким образом, использование МС детектора позволяет значительно расширить область применения предложенного метода. Этот подход может быть использован в рутинном анализе на ликероводочных предприятиях, криминалистической экспертизе и научных исследованиях. Предложенные алгоритмы регистрации основных компонентов смесей за счет выбора «тяжелых» ионов, могут быть использованы в любой анализируемой матрице, что открывает дополнительные горизонты применения метода в практике испытательных лабораторий при анализе качества широкого разнообразия иной продукции.

Республика Беларусь не должна отказаться от того, чтобы контроль качества сотен миллионов литров алкогольной продукции, производимой ежедневно по всему миру, выполнялся по белорусскому методу.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Commission Regulation (EC) No 110/2008 of 15 January 2008 on the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks. Official Journal of the European Communities. 13.02.2008. 39 p.
2. Изделия ликероводочные. Общие технические условия: ГОСТ Р 52192-2003. – Введ. 01.01.2005. – Москва: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2004. – 6 с.
3. Спирты коньячные выдержанные. Технические условия: СТБ 1385-2013. – Введ. 30.08.2013. – Минск: Госстандарт Республики Беларусь, 2013. – 12 с.
4. Дистилляты коньячные. Технические условия: ГОСТ 31728-2012. – Введ. 01.07.2013. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2012. – 8 с.
5. Спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия: СТБ 1334-2003. – Введ. 12.06.2003. Минск: Госстандарт Республики Беларусь, 2003. – 12 с.
6. Водки. Общие технические условия: СТБ 978-2003. – Введ. 12.06.2003. Минск: Госстандарт Республики Беларусь, 2003. – 16 с.
7. Коньяки. Общие технические условия: СТБ 1386-2003. – Введ. 19.03.2003. Минск: Госстандарт Республики Беларусь, 2003. – 15 с.
8. Савчук С.А., Нужный В.П.: Химический состав и потенциальная токсичность образцов легальной и нелегальной алкогольной продукции//Наркология//. – 2006. –№7.- с. 67–76.
9. Leon-Rodriguez, A. [et al.] Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry / A. Leon-Rodriguez, [et al.] // Food Technol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 46, № 4. – P. 448-455.
10. Perestrelo, R. [et al.] Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds / R. Perestrelo [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2006. –№ 563. – P. 154-164.
11. Dieguez, S.C. [et al.] Volatile Composition and Sensory Characters of Commercial Galician Orujo Spirits / S.C. Dieguez [et al.] // 39.J. Agric. Food Chem. – 2005. –№ 53. – P. 6759-6765.
12. Государственная фармакопея Республики Беларусь, Т. 2, 2007. – 471 с.
13. European Pharmacopoeia, 8th edition, V.2, 2013. – 3655 с.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации, Т. 2, 2007. – 698 с.

15. Водка и спирт этиловый. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей: ГОСТ 30536-97. – Введ. 01.06.1998. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1997. – 8 с.
16. Водка и спирт этиловый. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей: СТБ ГОСТ Р 51698-2001. – Введ. 30.05.2001. – Минск: Госстандарт Республики Беларусь, 2001. – 37 с.
17. Водки и водки особые. Правила приемки и методы анализа: ГОСТ 32035-2013. – Введ. 01.07.2014. – Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2013. – 27 с.
18. Спирт этиловый-сырец из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения содержания летучих органических примесей: ГОСТ 31684-2012. – Введ. 01.07.2013. – Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2013. – 12 с.
19. Коньяки, дистилляты коньячные, бренди. Определение содержания альдегидов, эфиров и спиртов методом газовой хроматографии. Межгосударственный стандарт : ГОСТ 33408-2015. – Введ. 01.08.2016. – Минск : Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2015. – 18 с.
20. Продукция винодельческая и сырье для ее производства. Газохроматографический метод определения массовой концентрации летучих компонентов. Межгосударственный стандарт : ГОСТ 33834-2016. – Введ. 01.04.2018. – Минск : Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2016. – 15 с.
21. Напитки спиртные. Газохроматографический метод определения объемной доли метилового спирта: ГОСТ 33833-2016. – Введ. 01.01.2018. – Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2016. – 11 с.
22. Растворы водно-спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта: ГОСТ 3639-79. – Введ. 01.01.1982. – Москва: Госстандарт СССР: Изд-во стандартов, 2004. – 11 с.
23. Водка. Правила приемки и методы анализа: ГОСТ 5363-93. – Введ. 01.01.1995. Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1994. – 23 с.
24. Винодельческая продукция и винодельческое сырье: СТБ 1929-2009. – Введ. 06.01.2009. Минск: Госстандарт, 2009. – 14 с.
25. Таблицы для определения содержания этилового спирта в водно-спиртовых растворах. – Москва: Изд-во стандартов, 1991. – Т.1. - 144 с.

26. International alcoholometric tables. – Paris: International organisation of legal metrology. 1998. 71 p.
27. Community reference methods for the analysis of spirits drinks : EC 2870/2000. – 04.12.2002. –The commission of the European communities, 2002. – 47 p.
28. AOAC Official Methods 972.10. Alcohol (higher) and ethyl acetate in distilled liquors. Alternative gas chromatographic method, 1975.
29. AOAC Official Methods 972.11. Methanol in distilled liquors. Gas chromatographic method, 1973.
30. International Organization of Vine and Wine (OIV). Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of viti-vinicultural origin. Determination of the principal volatile substances of spirit drinks of viti-vinicultural origin. OIV-MA-BS-14: R2009. 12 p.
31. International Organization of Vine and Wine (OIV). Compendium of international methods of analysis of spirituous beverages of viti-vinicultural origin. Propanol-2-ol determination by gas chromatography. OIV-MA-BS-20: R2009. 1 p.
32. General Standard for Beverage : GBT 10789-2015. – 01.04.2016. – National Standards of People’s Republic of China, 2016. – 299 p.
33. Manual of Methods of Analysis of Foods : Lab Manual 13. – 2015. – Food safety and standard authority of India ministry of health and family warfare, 2015. – 56 p.
34. Спирт этиловый. Правила приемки и методы анализа : ГОСТ 5964-93. – Введ. 01.01.1995. Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1994. – 24 с.
35. Спирт этиловый из пищевого сырья. Правила приемки и методы анализа : ГОСТ 32036-2013. – Введ. 01.07.2014. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2013. – 27 с.
36. Коньяки и коньячные спирты. Метод определения метилового спирта : ГОСТ 13194-74. – Введ. 01.01.1976. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1975. – 5 с.
37. Вина, виноматериалы, коньячные и плодовые спирты. Метод определения альдегидов : ГОСТ 12280-75. Введ. – 01.07.1977. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1975. – 11 с.
38. Напитки спиртные. Термины и определения : ГОСТ 33880-2016. Введ. – 01.08.2017. Москва: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2016. – 16 с.
39. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных

микропримесей. Межгосударственный стандарт : ГОСТ 30536-2013. – Введ. 01.07.2014. – Москва : Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2013. – 21 с.

40. Main component (solvent) as internal standard for chromatographic quantitative analysis of impurities: proceedings of the PITTCO Int. Conf., Orlando, 9-14 of May 2003. – P. 526-527.

41. Charapitsa, S. [et al.] Single-Laboratory Validation of a Gas Chromatographic Method of Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks: Need for an Improved Interlaboratory Study / S. Charapitsa [et al.] // Journal of AOAC International. – 2019. – Vol. 102, № 2. – P. 669-672.

42. Charapitsa, S. V. [et al.] Direct Determination of Volatile Compounds in Spirit Drinks by Gas Chromatography / S. V. Charapitsa [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Vol. 61, № 12. – P. 2950-2956.

43. Charapitsa, S. V. [et al.] The Establishment of Metrological Characteristics of the Method ‘Ethanol as Internal Standard’ for the Direct Determination of Volatile Compounds in Alcoholic Products / S. V. Charapitsa [et al.] // Journal of Chemical Metrology. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 59-69.

44. Черепица С.В. Новый метод определения количества примесей в алкогольной продукции методом газовой хроматографии / С.В. Черепица [и др.] // Виноделие и виноградарство. – 2015. – №2. – с. 12–16.

45. A. Korban, A. Makhomet. Expansion of the new method “Ethanol as Internal Standard” for direct determination of volatile compounds in the spirit products. Proceedings of the 12th intern. stud. conf. "Modern Analytical Chemistry". September 19–21, 2016, Prague, Czech Republic. P. 49-55.

46. S. Charapitsa, S. Sytova, A. Korban [et al.]. Novel method for direct determination of the volatile compounds in alcohol products. Proceedings of the international conference "Metrology-2017". April 4-5, 2017, Minsk, Belarus. P. 234-238.

47. A. Korban, S. Sabalenka. The establishment of metrological characteristics of analytical methods concerning the quantification of volatile compounds in alcoholic products. Proceedings of the 10th All-Ukrainian scientific conference for students and Ph.D. students "Chemical Karazinski Readings - 2018". April 23-25, 2018, Kharkiv, Ukraine.

48. S. Charapitsa, S. Sytova, A. Korban. The validation of the method of direct quantification of volatile compounds in alcoholic products with the usage ethanol as an internal standard. Proceedings of the 5th Republican conference "Analytical Chemistry of RB - 2017". Mai 19-20, 2017, Minsk, Belarus. P. 127-128.

49. S. Charapitsa, S. Sytova, A. Korban [et al.]. On-line calculator for direct determination of volatile compounds in alcohol products. Proceedings of the 10th

symposium "In Vino Analytica Scientia". July 17-20, 2017, Salamanca, Spain. P. 202.

50. A. Korban, S. Charapitsa, S. Sytova. The establishment of metrological characteristics of three analytical methods during the quantification of volatile compounds in alcoholic products. Proceedings of the 61th Intern. Conference for Students of Physics and Natural Sciences "Open Readings 2018". March 20-23, 2018, Vilnius, Lithuania.

51. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий : ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. – Введ. 01.01.2009. – Москва : Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2009. – 36 с.

52. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений : ИСО 5725-1994, Части 1-6. Введ. – 09.12.2002. – Минск : Госстандарт Республики Беларусь, 2002.

53. Официальный метод АОАС, Приложение D: Руководство к проведению межлабораторных испытаний с целью валидации характеристик метода анализа (AOAC Appendix D : Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, 2002, Geneva, Switzerland).

54. Официальное руководство АОАС : Руководство к проведению валидации в одной лаборатории метода для анализа пищевых продуктов и растительного сырья (AOAC : AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002, Geneva, Switzerland).

55. Yilmaztekin, M. and 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 / M. Yilmaztekin and T. Cabaroglu // Journal of AOAC International. – 2011. – Vol. 94, № 2. – P. 611-617.

56. Сайт метода «Этанол – внутренний стандарт» [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: <http://www.inp.bsu.by/ethanol/ru/>. Дата доступа 28.05.2019.

57. Канал «Ethanol – IS» [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: https://www.youtube.com/channel/UCXgL2c_KG3m7IW1oxOGqtQ. Дата доступа: 28.04.2019.

58. Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Возможности применения метода ГХ-МС (Обзор) / В.Д. Гладилович, Е.П. Подольская // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 36-49.

59. Morris-Kukoski C. L., Jagerdeo E., Schaff J. E., and LeBeau M. A. Ethanol Analysis from Biological Samples by Dual Rail Robotic Autosampler / C. L. Morris-Kukoski, E. Jagerdeo, J. E. Schaff, and M.A. LeBeau // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2007. – Vol. 80, № 1-2. – P. 230-235.
60. Syariena A., and Puziah H. Rapid Determination of Residual Ethanol in Perfumery Products Using Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry / A. Syariena, and H. Puziah // *Middle-East Journal of Scientific Research*. – 2014. – Vol. 22, № 3. – P. 432-437.
61. Mateus D., Ferreira I., and Pinho O. Headspace SPME-GC/MS Evaluation of Ethanol Retention in Cooked Meals Containing Alcoholic Drinks / D. Mateus, I. Ferreira, and O. Pinho // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 126, № 3. – P. 1387-1392.
62. Len-rodriguez A., Gonzlez-herndez L., Barba A., Escalante-minakata R., and Lpez M. Characterization of Volatile Compounds of Mezcal , an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave Salmiana / A. Len-rodriguez [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 4. – P. 1337-1341.
63. Tiscione N. B., Alford I., Yeatman D. T., and Shan X. Ethanol Analysis by Headspace Gas Chromatography with Simultaneous Flame-Ionization and Mass Spectrometry Detection / N. B. Tiscione [et al.] // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2011. – Vol. 35, № 7. – P. 501-511.
64. Tulashie S. K., Appiah A. P., Torku G. D., Darko A. Y., and Wiredu A. Determination of Methanol and Ethanol Concentrations in Local and Foreign Alcoholic Drinks and Food Products (Banku, Ga Kenkey, Fante Kenkey and Hausa Koko) in Ghana / S. K. Tulashie [et al.] // *International Journal of Food Contamination*. – 2017. – Vol. 4, № 14. – P. 1-5.
65. Wang M., Choong Y., Su N., and Lee M. A Rapid Method for Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages Using Capillary Gas Chromatography / M. Wang [et al.] // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 133-140.
66. Panosyan A. G., Mamikonyan G. V., Torosyan M., Gabrielyan E. S., Mkhitaryan S. A., Tirakyan M. R., and Ovanesyan A. Determination of the Composition of Volatiles in Cognac (Brandy) by Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry / A. G.Panosyan [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2001. – Vol. 56, № 10. – P. 945-952.
67. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А. Т. Лебедев. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с.

68. ASTM D 4307-99 Практика подготовки жидких смесей для использования в качестве аналитических стандартов. Американское общество по испытаниям и материалам, Филадельфия, Пенсильвания, США (ASTM D4307-99 Practice for preparation of liquid blends for use as analytical standards American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA).