



Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka metodą chromatografii gazowej head-space – walidacja metody

Wprowadzenie

Badania oznaczania zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka przeprowadzane są przez policyjnych ekspertów kryminalistyki od 1957 roku. Pierwsza pracownia, w której badano zarówno próbki krwi i moczu powstała w Zakładzie Kryminalistyki KG MO. Próbki nadsyłane były wówczas z obszaru całej Polski, głównie jednak z terenu dzisiejszego województwa mazowieckiego. Od początku 1995 roku stopniowo na terenie całego kraju powstawały w laboratoriach kryminalistycznych komend wojewódzkich Policji kolejne pracownie badań płynów ustrojowych człowieka na zawartość alkoholu etylowego. W chwili obecnej jest ich 13, w których w sumie wykonywanych jest średnio około 75 000 analiz rocznie. Liczba wydawanych w tym zakresie opinii w ciągu tych kilku lat utrzymuje się stale na podobnym poziomie.

W praktyce, zarówno w Polsce, jak i w wielu innych krajach, spośród kilkudziesięciu znanych i opracowanych metod oznaczania stężenia alkoholu etylowego w materiale biologicznym, przyjęły się i znalazły najszersze zastosowanie trzy metody: metoda Widmarka (chemiczna – dwuchromianowa), enzymatyczna (ADH) oraz chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC/FID). Metody te, w myśl Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 6 maja 1983 roku w sprawie warunków i sposobu dokonywania badań na zawartość alkoholu w organizmie, były traktowane równorzędnie pod względem wiarygodności otrzymanego wyniku. Zgodnie z zatwierdzonymi przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w dniu 26 listopada 2004 roku zaleceniami opracowanymi przez Instytut Ekspertyz Sądowych (IES) w Krakowie (opublikowanymi w „Prokuraturze i Prawie”, nr 4, kwiecień 2005 r.), stężenie alkoholu etylowego w płynach ustrojowych wyznacza się metodą chromatografii gazowej oraz metodą enzymatyczną ADH.

Zgodnie z wymienionymi zaleceniami IES przy zastosowaniu metody chromatografii gazowej wskazane

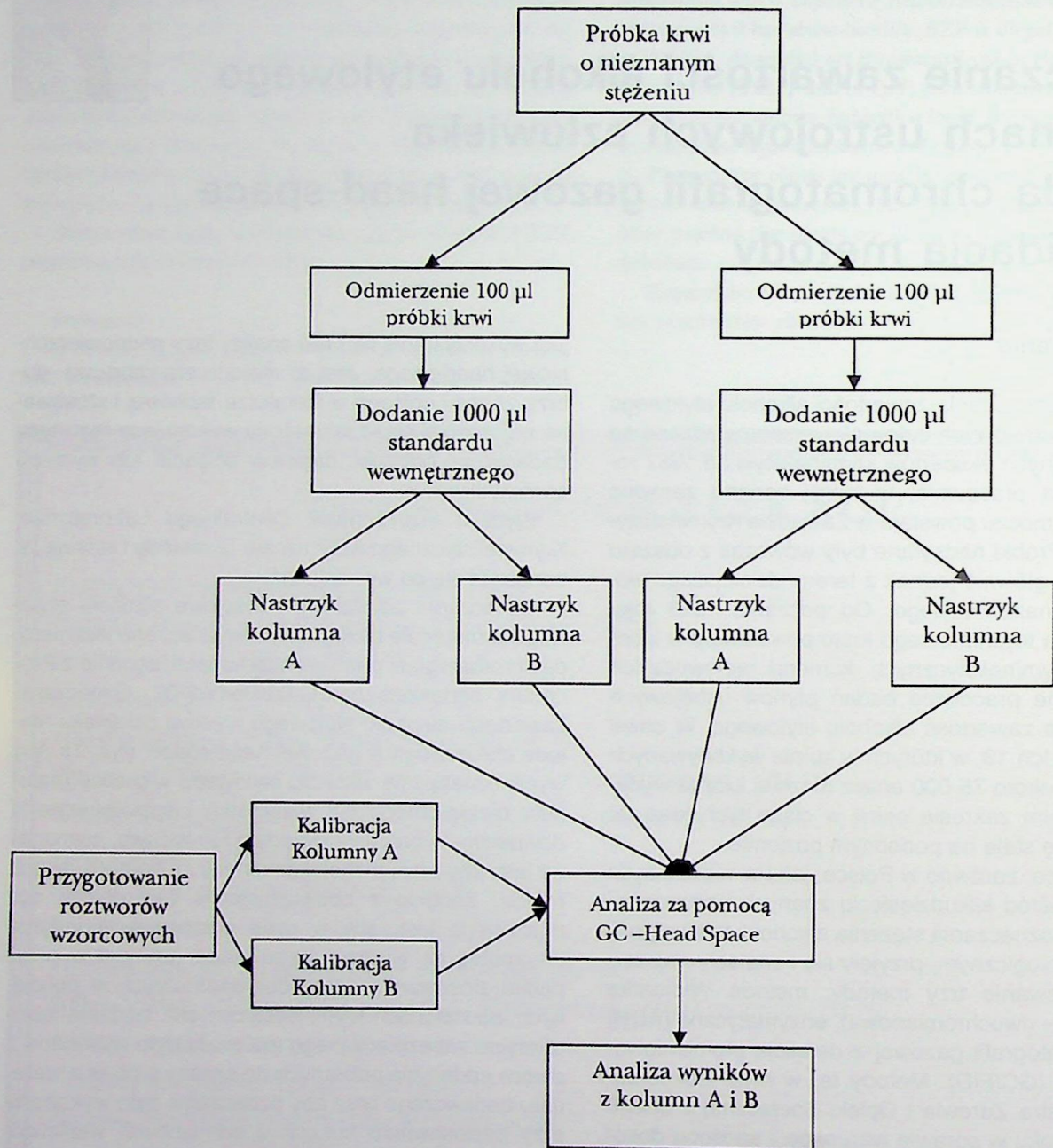
jest wykorzystanie techniki analizy fazy nadpowierzchniowej head-space. Jest to metoda standardowa, dobrze znana i opisana w literaturze fachowej i stosowana najczęściej przez laboratoria wykonujące tego typu badania na potrzeby organów ścigania lub wymiaru sprawiedliwości.

Wydział Fizykochemii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP uznaje tę metodę i stosuje ją, odnosząc się do ww. zaleceń.

Oznaczanie jakościowe i ilościowe alkoholu etylowego w materiale biologicznym wyznaczane jest metodą chromatografii gazowej head-space, zgodnie z Procedurą badawczą nr HJ-60/Pb-IV/3/08 „Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego we krwi człowieka metodą chromatografii gazowej head-space” (ryc. 1). Aby wynik oznaczania alkoholu etylowego w próbce materiału biologicznego był wiarygodny i spełniał kryteria dowodowe w procesie cywilnym lub karnym, wymagane jest, aby pomiar został dokonany za pomocą dwóch metod. Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami dopuszczalne jest, aby w razie zastosowania jedynie chromatografii gazowej head-space (tak jest w przypadku stosowanych procedur badawczych w policyjnych laboratoriach kryminalistycznych), badanie laboratoryjne zabezpieczonego materiału było wykonane z dwóch oddzielnie pobranych do analizy próbek z materiału badawczego oraz aby oznaczenie było wykonane przy zastosowaniu kolumn o odmiennych właściwościach elucyjnych, np. takich kolumn, które różnią się polarnością.

Metoda chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (*head-space analysis*) zastosowana przy oznaczeniu zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka jest metodą z wyboru, o najwyższym stopniu swoistości. O powszechnym zastosowaniu tej metody decydują jej główne zalety, m.in.: łatwość przygotowania próbek do analizy, potrzeba niewielkiej ilości materiału przeznaczanego do badań, szybka możliwość wykrycia i wykonania oznaczenia oczekiwanej substancji w trakcie jednego cyklu badawczego, możliwość wykona-

Procedura oznaczenia alkoholu metodą chromatografii gazowej head-space



Ryc. 1. Schemat analizy ilościowej alkoholu etylowego we krwi metodą chromatografii head-space

Fig. 1. Flowchart of quantitative analysis of ethyl alcohol in blood by means of head-space chromatography

źródło (ryc. 1–4): autorka

nia dużej liczby prób w krótkim czasie, a także czułość pomiaru oraz duża selektywność w stosunku do etanolu. Metoda ta jest łatwa do automatyzacji, a odtwarzalność i powtarzalność wyniku jest zazwyczaj lepsza niż przy bezpośrednim, ręcznym nastrzyku. Do analizy stosuje się specjalnie do tego przeznaczone naczynia szklane (naczynka chromatograficzne), szczelnie zamknięte membraną z gumy i aluminiowym kapsłem.

Proces izolacji alkoholu etylowego polega na częściowym odparowaniu w podwyższonej temperaturze lotnych związków z próby materiału biologicznego do przestrzeni naczynia nad analizowanym materiałem. W technice tej analizie poddawana nie jest bezpośrednio próbka krwi, lecz faza gazowa znajdująca się nad próbką umieszczoną w zamkniętym naczyniu. Izolowanie prowadzone jest do momentu osiągnięcia stanu równo-

wagi pomiędzy stężeniem związku w materiale biologicznym oraz w fazie gazowej, która następnie jest pobierana poprzez membranę do analizy chromatograficznej gazoszczelną strzykawką. W zamkniętym układzie i ustalonej temperaturze stosunek stężeń alkoholu we krwi do jego stężenia w powietrzu nad krwią ma – zgodnie z prawem Henr’ego-Daltona – wartość stałą.

Do naczynka chromatograficznego o pojemności 22 ml wprowadzany jest 1 ml roztworu tert-butanolu (2-metylo-2-propanol) o stężeniu objętościowym 0,05%, który pełni rolę wzorca wewnętrznego, a następnie dodawane jest 0,1 ml próbki krwi. Naczynko chromatograficzne jest kapslowane i umieszczane w autosamplerze chromatografu gazowego. Ponieważ w oznaczeniach stosowany jest detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), to wielkość sygnału analitycznego, tj. pole powierzchni pod pikiem lub jego wysokość, jest proporcjonalna do stężenia alkoholu w próbce. Ze względu na fakt, że chromatografia gazowa nie jest metodą absolutną, to aby wyznaczyć stężenie alkoholu w badanej próbce, należy wykonać kalibrację, stosując określoną ilość próbek kontrolnych (roztworów wzorcowych), sporządzonych z certyfikowanych materiałów odniesienia. Procedura przygotowania i analizy próbek kontrolnych jest analogiczna do przygotowania i analizy próbek krwi.

Organ procesowy dąży do dokładnego określenia stężenia alkoholu etylowego we krwi badanego. Wynik takiego badania stanowi obiektywny materiał dowodowy w procesie karnym i często ma rozstrzygające znaczenie dla rozpatrywanych przez sąd spraw. Wynik oznaczenia stężenia alkoholu etylowego we krwi jest podstawą do niepodważalnego ustalenia stanu trzeźwości badanego w chwili zdarzenia.

Zgodnie z polskim prawodawstwem stan po użyciu alkoholu zachodzi, gdy zawartość alkoholu w organizmie wynosi lub prowadzi do stężenia we krwi, od 0,2‰ do 0,5‰ alkoholu, co odpowiada obecności od 0,1 do 0,25 mg alkoholu w 1 dm³ wydychanego powietrza, a stan, w którym zawartość alkoholu w organizmie wynosi lub prowadzi do stężenia we krwi powyżej 0,5‰ alkoholu lub obecności powyżej 0,25 mg alkoholu w 1 dm³ wydychanego powietrza, określany jest stanem nietrzeźwości.

Rzetelny, pewny i obarczony jak najmniejszym błędem wynik wykonywanych badań jest ważnym elementem dowodowym w procesie karnym. Mimo szczegółowego opisu wymagań, procedur oraz instrukcji dotyczących m.in. systematycznej kalibracji aparatury analitycznej, a także sprzętu pomocniczego, pobierania próbek do badań, analizy próbek, zapewnienia jakości i kontroli jakości badań, wieloletniego uczestnictwa w programach międzylaboratoryjnych badań biegłości, organizowanych przez uznane międzynarodowe insty-

tucje specjalistyczne oraz sporządzania dokumentacji z badań oraz wydawanej opinii, z punktu widzenia analityka ścisła realizacja tego celu nie zawsze się udaje. Z teorii pomiaru potwierdzonej codzienną praktyką analityczną wiadomo, że wynik każdego pomiaru może być obarczony błędem. Międzynarodowa Organizacja Standaryzacyjna (International Standards Organization) w normie PN-EN ISO/IEC 17025:2005 obliuguje laboratoria do przeprowadzenia walidacji metod badawczych oraz oszacowania niepewności pomiaru. Dzięki przeprowadzonej walidacji z dużym prawdopodobieństwem można powiedzieć, że proces analizy przebiega w sposób prawidłowy oraz że daje precyzyjne i wiarygodne wyniki.

Pracownia badań płynów ustrojowych na zawartość alkoholu etylowego Wydziału Fizykochemii CLK KGP dąży do wykonywania badań na optymalnym poziomie jakościowym, tak aby uzyskiwane wyniki badań były miarodajne, obiektywne i jak najbardziej rzetelne. Pracownia, w której oznaczany jest alkohol etylowy w płynach ustrojowych człowieka, podlega kontroli auditorów wewnętrznych, a okresowo także auditorów zewnętrznych.

W lutym 2009 roku auditorzy z Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) ocenili m.in.:

- a) obsługę i kontrolę pracy aparatury badawczej,
- b) kontrolę kalibracji i sprawdzeń wyposażenia pomiarowego,
- c) dokumentację stosowanej metody analizy oznaczania zawartości alkoholu etylowego we krwi człowieka,
- d) dokumentację uczestnictwa w programach międzylaboratoryjnych badań biegłości organizowanych przez uznane międzynarodowe instytucje specjalistyczne,
- e) sposób zapisywania i kontroli raportowanych wyników analizy,
- f) sposób i przebieg przeprowadzenia walidacji stosowanej metody,
- g) raport z przeprowadzonej walidacji,
- h) sposób dokumentowania przebiegu badań oraz sporządzane opinie.

Dnia 22 maja 2009 roku Wydział Fizykochemii CLK KGP uzyskał Certyfikat Akredytacyjny na zgłoszoną metodę oznaczania jakościowego i ilościowego alkoholu etylowego we krwi człowieka metodą chromatografii gazowej head-space.

Ważne jest, aby oprócz podania samego wyniku badania mieć świadomość stopnia dokładności uzyskanych oznaczeń oraz mieć oszacowaną niepewność zastosowanej metody. W tym celu przeprowadzono ocenę całego postępowania analitycznego, dzięki której przedstawiono dowody, że wprowadzona do badań metoda oznaczania alkoholu etylowego we krwi człowieka metodą

chromatografii gazowej head-space zgodnie z Procedurą badawczą nr HJ-60/Pb-IV/3/08 jest stosowana właściwie. Ponadto udowodniono, że w procesie przeprowadzanych analiz, który przebiega w sposób rzetelny i prawidłowy, otrzymuje się wyniki badań na oczekiwanym poziomie jakościowym, obarczone niepewnością nie większą, niż założono. W tym celu zostały wyznaczone i ocenione następujące parametry walidacyjne:

- wyznaczenie zakresu i liniowości metody
- wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności
- określenie powtarzalności
- wyznaczenie dokładności
- określenie odtwarzalności
- wyznaczenie niepewności metody badawczej.

Aparatura badawcza

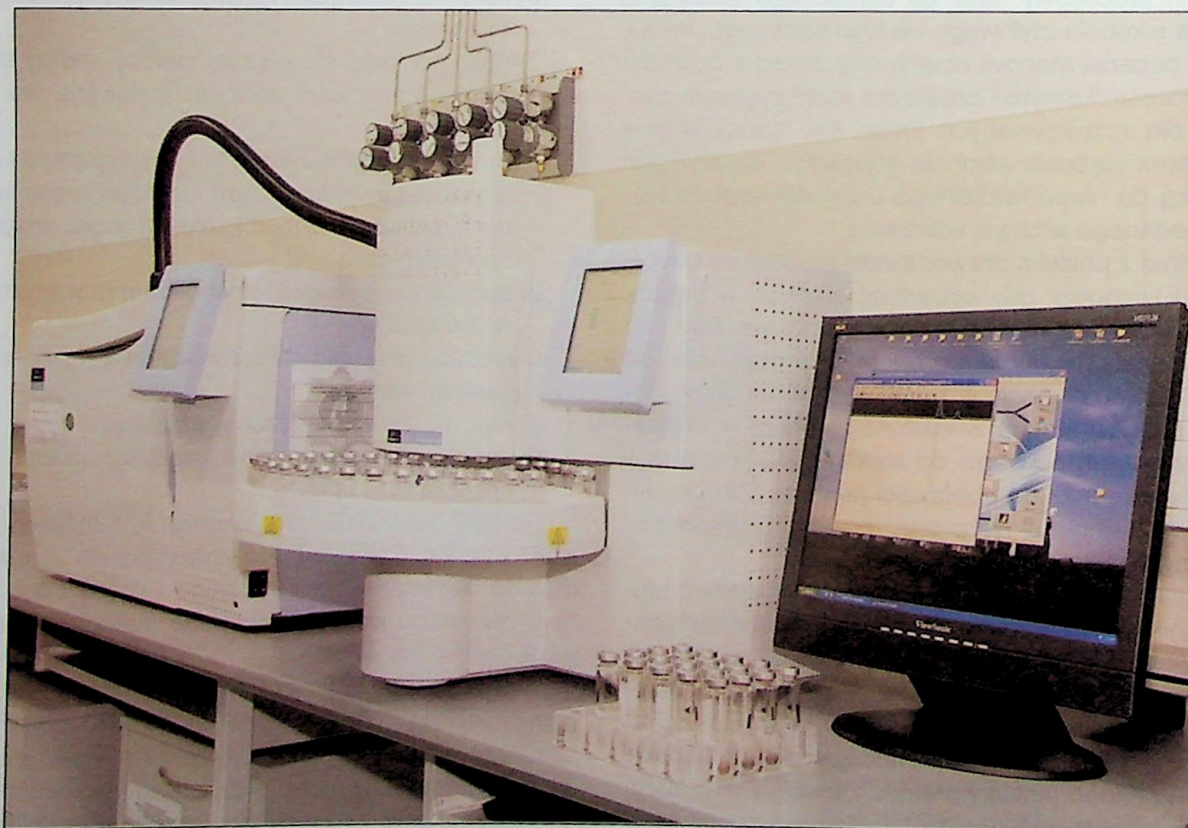
Badania przeprowadzono z użyciem chromatografu gazowego Clarus 500 (model dwukanałowy – kanały synchroniczne), wyposażonego w automatyczny podajnik próbek (autosampler) TurboMatrix HS-40 firmy Perkin-Elmer oraz sterownik komputerowy z odpowiednim oprogramowaniem (ryc. 2). Rozdział dokonywany jest na dwóch kolumnach kapilarnych, różniących się polarnościami:

1. Bac 2 o długości 10 m, średnicy wewnętrznej 0,18 mm i grubości filmu 0,63 μm .
2. Bac 3 o długości 10 m, średnicy wewnętrznej 0,18 mm i grubości filmu 0,30 μm , w temperaturze 35°C.

Do wykrycia obecności alkoholu etylowego w strumieniu gazu nośnego (helu) wykorzystywane są detektory płomieniowo-jonizacyjne (FID).

Wyposażenie pomiarowe (ryc. 3):

- pipeta półautomatyczna, o numerze fabrycznym 1729898, pozwalająca na odmierzenie 0,1 ml; o wartości niepewności max. 0,21%,
- pipeta półautomatyczna, o numerze fabrycznym 1734278, pozwalająca na odmierzenie 1,0 ml; o wartości niepewności max. 0,27%,
- dozownik półautomatyczny o numerze fabrycznym 1602238, pozwalający na odmierzenie 1,0 ml, o wartości niepewności max. 0,27%,
- jednorazowe końcówki do pipet lub do dozownika (zgodnie ze specyfikacją techniczną używanego wyposażenia pomiarowego),
- termohigrometr posiadający aktualne świadectwo wzorcowania,
- naczynka chromatograficzne, zgodne z wymaganiami specyfikacji technicznej użytkowanego chro-



Ryc. 2. Chromatograf gazowy Clarus 500 z autosamplerem Turbo Matrix HS-40
Fig. 2. Clarus 500 gas chromatograph with Turbo Matrix HS-40 autosampler

- matografu oraz gumowe korki i aluminiowe kapsle w niezbędnej ilości.

Do wyznaczenia precyzji objętości pipet wykorzystano dane zawarte w załączonych certyfikatach jakości, dostarczonych wraz z pipetami przez ich producenta, firmę Eppendorf (Niemcy):

Odczynniki

- standard wewnętrzny w niezbędnej ilości – 0,05% wodny roztwór tert-butanolu,
- certyfikowany materiał odniesienia – roztwór wodny alkoholu etylowego o określonych stężeniach zawartych w granicach od 0,1% do 5,0%,

- środki dezynfekujące o właściwościach bakterio-bójczych, grzybobójczych i wirusobójczych w niezbędnej ilości.

Dla wyznaczenia powtarzalności pomiarów za pomocą aparatu wykorzystano dane z kilkudziesięciu pomiarów dla tego samego stężenia roztworu wzorcowego, sporządzonego z certyfikowanego materiału odniesienia. Błąd stężenia alkoholu w roztworach wzorcowych odczytano ze świadectw certyfikowanych materiałów odniesienia, wystawionych dla każdego poziomu stężenia roztworu wzorcowego przez producenta, firmę Cerilliant, dostarczonych przez dostawcę, firmę



Ryc. 3. Wyposażenie stanowiska przeznaczonego do przygotowania próbek do analizy metodą chromatografii head-space
Fig. 3. Workstation for preparation of samples to head-space chromatography analysis

- próbki krwi zawierające alkohol etylowy,
- gazy: hel, powietrze, wodór, o czystości minimum 99,9%

Wyposażenie pomocnicze

- statyw z otworami do umieszczenia odpowiedniej liczby naczynek chromatograficznych na stanowisku przygotowania próbek,
- przyrząd służący do zamykania naczynek chromatograficznych – kapsłownica oraz do ich otwierania – dekapłownica,
- środki ochrony osobistej (m.in. fartuchy ochronne, rękawiczki jednorazowe, przyłbice stomatologiczne),

LGC Standards (USA) oraz Merck KgaA (Darmstadt, Niemcy) i przedstawiono w tabeli 4, w rozdziale dotyczącym oszacowania niepewności.

Przebieg badań

Wyznaczenie zakresu pomiarowego od 0,10% do 5,0% i liniowości metody

Liniowość jest to przedział zawartości analitu, dla którego sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego jest proporcjonalny do tej zawartości w określonym za-

kresie, zgodnie z wyznaczonym równaniem matematycznym:

$$y = ax + b$$

gdzie:

- y – zmienna zależna (sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego),
- x – zmienna niezależna (zawartość oznaczanego analitu),
- b – wyraz wolny (oznacza punkt przecięcia się krzywej ze współrzędną y),
- a – współczynnik kierunkowej prostej (mówi o nachyleniu prostej względem współrzędnych x i y).

Zakres liniowy najczęściej jest wyznaczany z użyciem krzywej kalibracyjnej urządzenia pomiarowego. W tym celu przeprowadzono pomiary dla roztworów wzorcowych różniących się między sobą stężeniem analitu na pięciu poziomach stężeń, tj. 0,10‰; 0,20‰; 0,50‰; 2,0‰ i 5,0‰. Wykonano po trzy niezależne oznaczenia i na tej podstawie z pięciu punktów kalibracji została wykreślona dla każdej kolumny krzywa kalibracji.

Parametry krzywych kalibracji:

kolumna A: $y = 0,6088x - 0,0288$; $r^2 = 0,999868$

kolumna B: $y = 0,5898x - 0,0398$; $r^2 = 0,999853$

Zależność między zmiennymi charakteryzuje współczynnik korelacji r . Jeżeli jego wartość jest równa co najmniej 0,99, można mówić o liniowości metody (w zakresie stężeń, dla których sporządzono roztwory wzorcowe w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej).

Uzyskane wysokie wartości współczynnika r świadczą o prawidłowym skorelowaniu wielkości, a także o liniowości wskazań detektora FID w badanym zakresie stężeń dla obu kolumn.

Zakres pomiarowy jest to przedział stężeń analizowanej substancji (pomiędzy najniższym i najwyższym stężeniem), w którym można osiągnąć akceptowalną dokładność i precyzję. W badaniach wykorzystano certyfikowany materiał odniesienia (roztwory wodne etanolu firmy Merck oraz Cerilliant w zakresie stężeń od 0,1‰ do 5,0‰).

Granica wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności (*limit of detection* – LOD) – jest to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji chemicznej, możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Wartość granicy wykrywalności jest ściśle związana z poziomem szumów stosowanego urzą-

dzenia analitycznego, przyjmuje się, że wartość LOD to trzykrotność poziomu szumów.

Można ją również wyznaczyć na podstawie odchylenia standardowego zbioru sygnałów i współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej, korzystając z zależności:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{a}$$

gdzie:

- a – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej,
- s – odchylenie standardowe.

Granica oznaczalności (*limit of quantification* – LOQ) – jest to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji, możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej metody analitycznej z założoną dokładnością i precyzją. Jej wartość jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości granicy wykrywalności (LOD). Zazwyczaj przyjmuje się zależność:

$$LOQ = 3 \times LOD$$

Powtarzalność

Powtarzalność jest parametrem wyrażającym precyzję oznaczeń wykonanych w krótkim odstępie czasu, przez tego samego analityka i w tych samych warunkach. Powtarzalność została wyznaczona poprzez obliczenie odchylenia standardowego dla każdego poziomu stężenia alkoholu etylowego w zakresie kalibracji od 0,10‰ do 5,0‰ w oparciu o wyniki 55 następujących po sobie pomiarów wykonanych w krótkich przedziałach czasu, za pomocą instrumentu chromatograf gazowy head-space Clarus 500 firmy Perkin-Elmer, oddzielnie dla każdej z kolumn A i B, jako wartości względnego odchylenia standardowego dla następujących sześciu poziomów stężeń: 0,10‰; 0,20‰; 0,50‰; 1,0‰; 2,0‰ i 5,0‰;

Uzyskane wyniki pomiarów jak i obliczone wartości średnie ($\bar{x}_{gr}$) dla każdej serii, wartości odchylen standardowych (S), wartości względnych odchylen standardowych (RSD) oraz odchylenia standardowe średniej ($\bar{s}$) przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Odtwarzalność – sprawdzono poprzez analizę próbek kontrolnych o stężeniach 0,2‰ oraz 0,5‰ w 30 seriach w różne dni. Uzyskane wyniki pomiarów jak i obliczone wartości średnie ($\bar{x}_{gr}$) dla każdego stężenia, wartości odchylen standardowych (S), wartości względnych odchylen standardowych (RSD) oraz odchylenia standardowe średniej ($\bar{s}$) przedstawiono w tabeli 3.

Dokładność i poprawność – jest definiowana jako zgodność pomiędzy uzyskanym wynikiem (pojedynczego) pomiaru z wartością rzeczywistą (oczekiwaną).

Tabela 1

Wartości uzyskane dla stężeń wzorców od 0,10‰ do 0,50‰ (kolumna A i B)
 Values obtained for standard concentrations from 0,10‰ to 0,50‰ (columns A and B)

	0,10‰		0,20‰		0,50‰	
	A	B	A	B	A	B
średnia ($\bar{x}_s$)	0,103‰	0,102‰	0,201‰	0,202‰	0,498‰	0,500‰
odchylenie standardowe (s)	0,003‰	0,003‰	0,004‰	0,004‰	0,008‰	0,006‰
względne odchylenie standardowe (RSD)	3,092%	3,223%	1,962%	1,901%	1,583%	1,140%
odchylenie standardowe średniej ($\bar{s}$)	4,29E-04‰	4,44E-04‰	5,32E-04‰	5,19E-04‰	1,06E-03‰	7,69E-04‰

źródło (tab. 1–8): opracowanie własne

Tabela 2

Wartości uzyskane dla stężeń wzorców od 1,0‰ do 5,0‰ kolumna A i B)
 Values obtained for standard concentrations from 1,0 % to 5,0% (columns A and B)

	1,0‰		2,0‰		5,0‰	
	A	B	A	B	A	B
średnia ($\bar{x}_s$)	0,994‰	0,998‰	1,999‰	2,001‰	5,009‰	5,005‰
odchylenie standardowe (s)	0,011‰	0,012‰	0,013‰	0,007‰	0,025‰	0,017‰
względne odchylenie standardowe (RSD)	1,146%	1,200%	0,673%	0,333%	0,505%	0,331%
odchylenie standardowe średniej ($\bar{s}$)	1,53E-03‰	1,61E-03‰	1,81E-03‰	9,00E-04‰	3,41E-03‰	2,24E-03‰

Poprawność to stopień zgodności wyniku oznaczenia (jako średniej obliczonej na podstawie serii pomiarów) z wartością oczekiwaną. Zatem poprawność jest parametrem określającym zgodność wyników uzyskiwanych za pomocą danej metodyki analitycznej z wynikami rzeczywistymi (oczekiwanymi). Dokładność stanowi połączenie poprawności i precyzji, ponieważ im bardziej poprawne i precyzyjne będą wyniki otrzymane z zastosowaniem danej metodyki analitycznej, tym bardziej dokładny będzie wynik pojedynczego oznaczenia.

Dokładność została określona tymi samymi 30 seriami, jakimi obliczona została odtwarzalność:

Dla stężenia 0,2‰

Wartość rzeczywista (znana wartość składnika w próbce standardu I-rzędowego): 0,200‰

Odchylenie wartości rzeczywistej (średnia wartość minus wartość rzeczywista): 0,001‰

Dokładność (100 x średnia/rzeczywista wartość): 100%

Dla stężenia 0,5‰

Wartość rzeczywista (znana wartość składnika w próbce standardu I-rzędowego): 0,500‰

Tabela 3

Wartości uzyskane dla stężeń wzorców od 0,20‰ do 0,50‰ (kolumna A i B)
 Values obtained for standard concentrations from 0,20‰ to 0,50‰ (columns A and B)

	0,20‰		0,50‰	
	A	B	A	B
średnia ($\bar{x}_s$)	0,200‰	0,201‰	0,500‰	0,501‰
odchylenie standardowe (s)	0,005‰	0,003‰	0,010‰	0,009‰
względne odchylenie standardowe (RSD)	2,575%	1,255%	1,969%	1,788%
odchylenie standardowe średniej ($\bar{s}$)	4,29E-04‰	4,44E-04‰	5,32E-04‰	5,19E-04‰

Odchylenie wartości rzeczywistej (średnia wartość minus wartość rzeczywista): 0,001‰

Dokładność (100 x średnia/rzeczywista wartość): 100%

Ślepa próba

Na 10 chromatogramach wykonanych z próbek wody na kolumnie A oraz kolumnie B nie stwierdzono obecności pików chromatograficznych przy czasach retencji odpowiadających alkoholowi etylowemu i standardowi wewnętrznemu.

Oszacowanie niepewności pomiaru

Niepewność jest podstawową właściwością każdego pomiaru. Wyznaczając niepewność pomiaru, zwiększamy jego miarodajność. Na podstawie oszacowanej wartości niepewności można określić przydatność danej metody analitycznej. Określenie rozszerzonej niepewności badanej metody analitycznej pozwala mówić o jakości wyników osiąganych za pomocą danej metody. Niepewność jest parametrem związanym z wynikiem pomiaru, który określa przedział wokół wartości średniej, w którym może znaleźć się wartość oczekiwana. Niepewność pomiaru jest składową niepewności wszystkich pojedynczych etapów postępowania analitycznego.

Źródłem niepewności w trakcie badania próbki krwi za pomocą niniejszej procedury są m.in.:

- a) niepewność związana z etapem kalibracji chromatografu gazowego (u_{kal}), na którą składają się:
 - powtarzalność odczytu wartości sygnału R_i zarówno dla próbek wzorcowych – na podstawie

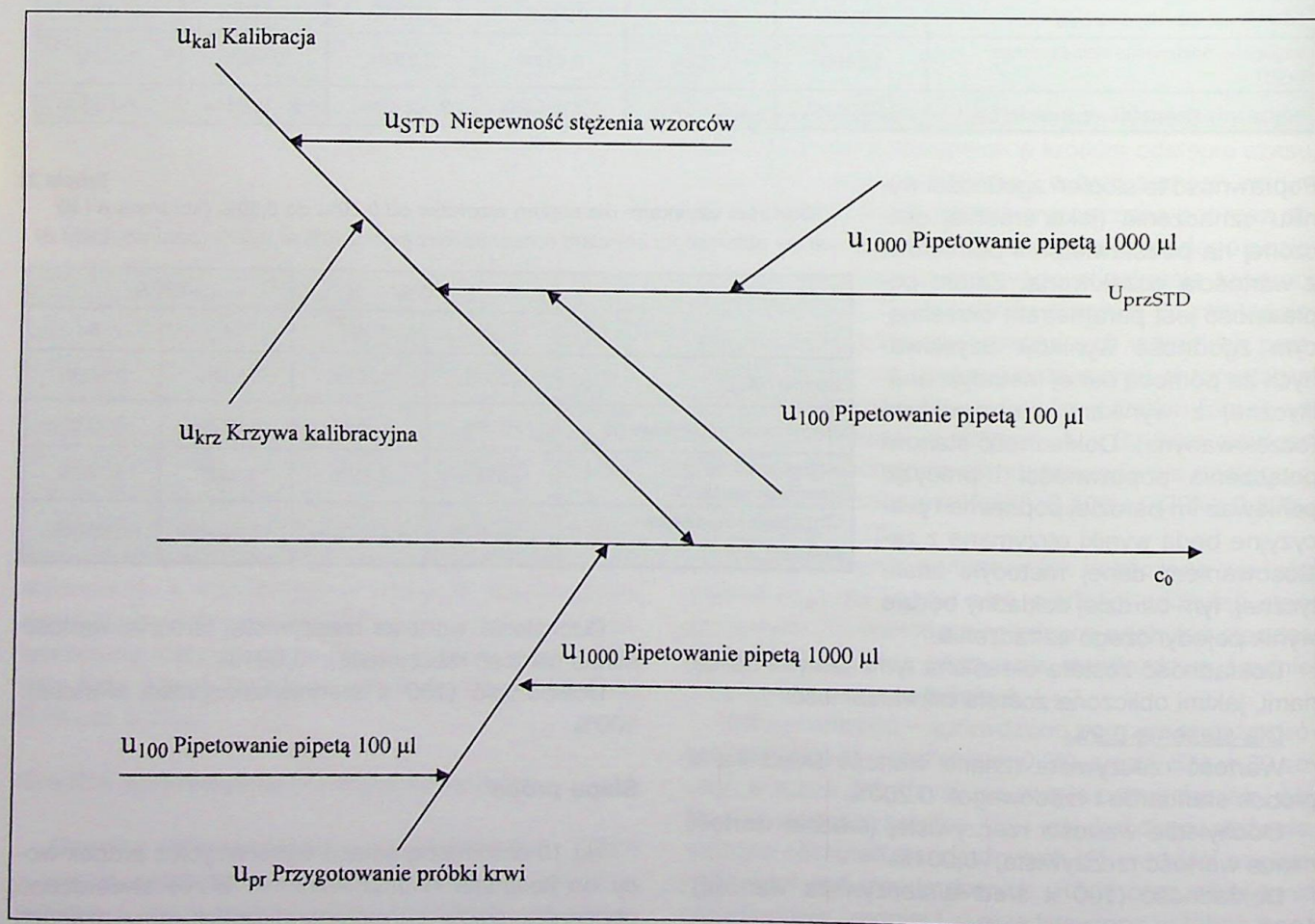
których wykreślono krzywą kalibracyjną, jak i badanych próbek krwi (u_{krz}),

- sposób przygotowania próbek wzorcowych (u_{przSTD}),
- niepewność związana z wyznaczeniem wartości odniesienia dla próbek wzorcowych (u_{STD}) – z danych producenta certyfikowanych materiałów odniesienia,

b) standardowa niepewność związana z przygotowaniem próbek krwi (u_{pr}).

Wpływ poszczególnych źródeł niepewności przedstawiono, stosując diagram Ishikawy (ryc. 4).

Pominięto niepewność wyznaczenia stałej Henry'ego dla alkoholu oraz niepewność wyznaczenia objętości naczynek chromatograficznych, ze względu na niewielki ich wkład w sumaryczny budżet niepewności. Biorąc pod uwagę wszystkie składowe przedstawione w diagramie Ishikawy, względną niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu w próbce krwi można zapisać następująco:



Ryc. 4. Wpływ poszczególnych parametrów na wartość niepewności oznaczenia alkoholu etylowego we krwi człowieka przedstawiono, stosując diagram Ishikawy

Fig. 4. Effect of specific parameters on value of uncertainty in determination of ethyl alcohol in human blood are presented on Ishikawa diagram

$$u_{C_0}^2 = u_{kal}^2 + u_{pr}^2$$

i

$$u_{kal}^2 = u_{przSTD}^2 + u_{krz}^2 + u_{STD}^2$$

Na niepewność metody wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej head-space wpływają przedstawione poniżej zmienne. Aby oszacować niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej, należy przedstawić funkcję wiążącą zmienne ze stężeniem alkoholu w próbce krwi: c_0

$$c_0 = f(R_S, R_{STD}, R_i, c_i^{STD}, V_{STD}, V_{IS}^{STD}, V_0, V_0^{STD})$$

gdzie:

c_0 – stężenie alkoholu etylowego w próbce krwi odczytane z krzywej kalibracyjnej [%],

R_S – pole powierzchni piksu etanolu w nieznanej próbce,

R_{STD} – pole powierzchni piksu standardu wewnętrznego t-butanolu w nieznanej próbce,

c_i^{STD} – stężenie i-tego wzorca alkoholu,

V_{STD} – objętość dodawanego i-tego wzorca alkoholu etylowego na etapie kalibracji, zawsze 100 μ l,

V_{IS}^{STD} – objętość dodawanego standardu wewnętrznego na etapie kalibracji, zawsze 1000 μ l,

R_i – stosunek powierzchni wzorca alkoholu etylowego do powierzchni piksu standardu wewnętrznego,

V_0 – objętość krwi pobrana do badań zawsze 100 μ l,

V_0^{STD} – objętość standardu wewnętrznego dodawana do próbki krwi, zawsze 1000 μ l,

a następnie obliczyć zgodnie z prawem propagacji błędów wartość rozszerzonej niepewności według wzoru:

$$U_{c_0} = kc_0 \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\delta c_0}{\delta X_i} \right)^2 \delta X_i}$$

gdzie:

X_i – kolejne zmienne,

c_0 – stężenie alkoholu uzyskane z badań,

k – współczynnik rozszerzenia.

Do wyznaczenia niepewności objętości V_{STD} , V_{IS}^{STD} , V_0 , V_0^{STD} uwzględniono dane zawarte w cer-

Tabela 4

Zestawienie danych zawartych w certyfikatach CRM oraz obliczonych na podstawie danych z certyfikatów CRM
Comparison of data comprised in CRM certificates and calculated basing on data from CRM certificates

Nazwa	Poziom stężenia [%]	Producent	Data wydania certyfikatu/ważności wzorca	Niepewność z certyfikatu CRM	Względna niepewność $(u_r)^2$
C_1^{STD}	0,10‰	Cerilliant	23 lutego 2007/luty 2012	$\pm 0,00031\%$	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_2^{STD}	0,20‰	Cerilliant	5 marca 2007/luty 2012	$\pm 0,00062\%$	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_3^{STD}	0,50‰	Cerilliant	19 stycznia 2007/styczeń 2012	$\pm 0,00155\%$	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_4^{STD}	2,0‰	Merck*	23 sierpnia 2007/30 czerwca 2012	$(1,99 - 2,03)\%$	$1,33 \cdot 10^{-4}$
C_5^{STD}	5,0‰	Cerilliant	12 lutego 2008/styczeń 2013	$\pm 0,0155\%$	$9,61 \cdot 10^{-6}$

*W przypadku firmy Merck nie podano na jakim poziomie ufności została oznaczona wartość stężenia, więc niepewność standardową obliczono ze wzoru:

$$u_{c_4^{STD}} = \frac{2,03\% - 1,99\%}{\sqrt{3}} = 0,0231\%$$

dla pozostałych wzorców poziom ufności wynosił 95%.

tyfikatach jakości, dołączonych przez producenta pipet, firmę Eppendorf (Niemcy) (tab. 4).

W obliczeniach uwzględniono ilość odmierzeń przeprowadzanych każdą z pipet.

W celu wyznaczenia niepewności etapu kalibracji sporządzono krzywą kalibracyjną dla stężeń 0,10‰, 0,20‰, 0,50‰, 2,0‰ i 5,0‰.

Dla każdego ze stężeń zarejestrowano po cztery serie wyników dla każdej z kolumn. Przygotowano próbki krwi o stężeniu oczekiwanym alkoholu etylowego na poziomie około 0,5‰, dla której zarejestrowano po pięć wyników na każdej z kolumn A i B.

Niepewność standardową związaną z przeprowadzeniem kalibracji i zastosowaniem metody regresji liniowej obliczono z poniższego wzoru:

$$u_{krz} = \frac{s_{CR}}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_{pr} - c_{ar})^2}{Q_{CR}}}$$

gdzie:

s_{CR} – resztkowe odchylenie standardowe,

p – liczba pomiarów (powtórzeń) wykonanych dla badanej próbki krwi, ($p = 5$),

n – liczba punktów kalibracyjnych,

c_{pr} – średnie stężenie alkoholu w próbce wzorcowej odczytane za pomocą wyznaczonej krzywej kalibracyjnej,

c_{sr} – średnia ze wszystkich wartości stężeń roztworów wzorcowych, dla których wykonano pomiar w celu sporządzenia krzywej wzorcowej,

Q_{CR} – wartość opisana wzorem: $\sum_{i=1}^n (c_i - c_{ar})^2$,

a – współczynnik nachylenia wyznaczonej krzywej kalibracji,

b – wartość odciętej z wyznaczonej krzywej kalibracji.

Otrzymane wyniki cząstkowe zestawiono w tabeli 5. Współczynnik kierunkowy oraz odciętą krzywej kalibracyjnej obliczono, stosując metodę najmniejszych kwadratów.

Błąd stężenia alkoholu w jego roztworach wzorcowych odczytano ze świadectw certyfikowanych materiałów odniesienia, wystawionych przez producenta, firmę Cerilliant, dostarczanych przez dostawcę, firmę LGC Standards (USA) oraz świadectw CRM, wystawionych przez firmę Merck KGaA (Darmstadt, Niemcy). Średnie stężenie oraz średnią niepewność standardową dla wyników z kolumny A i B uzyskano, posługując się poniższymi wzorami i otrzymano następujące wyniki:

$$\bar{c}_0 = \frac{c_{prA} * \frac{1}{u_{krzA}^2} + c_{prB} * \frac{1}{u_{krzB}^2}}{\frac{1}{u_{krzA}^2} + \frac{1}{u_{krzB}^2}} = 0,499 ‰$$

$$\bar{u}_{krz} = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{u_{krzA}^2} + \frac{1}{u_{krzB}^2}}} = 0,017 ‰$$

Zbiorne wyniki przedstawiono w tabelach 6 i 7.

Następnie porównano obliczoną wartość niepewności z odchyleniem standardowym, uzyskanym dla średniej z próbek kontrolnych o stężeniu 0,50‰ alkoholu etylowego.

Do obliczeń średniej brano pod uwagę wyniki pomiędzy kolejnymi kalibracjami wykonanymi po badaniach walidacyjnych (wyniki zestawiono w tabeli 8).

Omówienie wyników

1. Dla próbki o stężeniu 0,5‰ alkoholu etylowego niepewność standardowa wynosi 0,02‰, niepewność rozszerzona (przy współczynniku rozszerzenia $k = 2$) wynosi 0,04‰.
2. Największy wkład do budżetu niepewności (86%) wnosi wyznaczenie krzywej kalibracyjnej i odczytanie z niej wartości stężenia oraz czystość certyfikowanego materiału odniesienia (13%). Wkład obu tych czynników jest zrozumiały, gdyż zawartość alkoholu w badanych próbkach, a także we wzorcach jest niewielka. Wkład pozostałych czynników: przygotowania roztworów wzorcowych oraz próbek krwi jest równy 1%.
3. Certyfikowany materiał odniesienia c_4^{STD} (firmy Merck) o stężeniu 2,0‰ odbiega zdecydowanie

Tabela 5

Wyniki cząstkowe do obliczeń u_{krz} dla kolumn A i B
Partial results for calculation of u_{krz} for columns A and B

Parametry	kolumna A	kolumna B
a	0,6042	0,6143
b	-0,0147	-0,0047
n	20	20
p	5	5
s_{CR}	0,0284	0,0284
Q_{CR}	102,792	102,792
c_{pr}	0,501‰	0,496‰
c_{sr}	1,560‰	1,560‰
$u_{krzA} \mid u_{krzB}$	0,024‰	0,024‰

Tabela 6
Zmienne wpływające na niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu etylowego metodą chromatografii gazowej head-space
Variables influencing uncertainty of determining ethyl alcohol concentrations by means of head-space gas chromatography

	Wartość	Niepewność standardowa u	m	Względna niepewność $m \cdot (u_r)^2$
V_0	100 μ l	0,12 μ l	1	$1,47 \cdot 10^{-6}$
V_{STD}	100 μ l	0,12 μ l	5	$7,35 \cdot 10^{-6}$
V_{IS}^S	1000 μ l	1,56 μ l	5	$8,11 \cdot 10^{-7}$
V_0^{STD}	1000 μ l	1,56 μ l	1	$4,06 \cdot 10^{-6}$
C_1^{STD}	0,1‰	0,00031‰	1	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_2^{STD}	0,2‰	0,00062‰	1	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_3^{STD}	0,5‰	0,00155‰	1	$9,61 \cdot 10^{-6}$
C_4^{STD}	2,0‰	0,00231‰	1	$1,33 \cdot 10^{-4}$
C_5^{STD}	5,0‰	0,0155‰	1	$9,61 \cdot 10^{-6}$
$\bar{C}_0$	0,499‰	0,017‰	1	$1,14 \cdot 10^{-3}$
$u_{c_0} = \bar{c}_0 \sqrt{u_{pr-STD}^2 + u_{krz}^2 + u_{STD}^2 + u_{pr}^2}$				0,02‰
$U_{c_0} = k \cdot u_{c_0}$				0,04‰
Wynik końcowy dla $k = 2$				$(0,50 \pm 0,04)\%$

Tabela 7
Udział % źródeł niepewności wchodzących w skład budżetu niepewności
Percentages of sources of uncertainty comprised in uncertainty budget

	Względna niepewność $(u_r)^2$	Niepewność %
u_{krz}	1,14E-03	86,0%
u_{pr}	2,28E-06	0,2%
u_{pr-STD}	1,14E-05	0,9%
u_{STD}	1,71E-04	12,9%

- Proces walidacji wraz z oszacowaniem budżetu niepewności przedstawionej procedury analitycznej w pełni potwierdził jej przydatność do zamierzonego zastosowania.
- Wykonywanie badań na optymalnym poziomie jakościowym, tak aby uzyskiwane wyniki badań były jak najbardziej rzetelne, wiarygodne oraz obarczone jak najmniejszą niepewnością, a także stale rosnące wymagania odnośnie do wysokich standardów pracy laboratorium, powodują, że walidacja jest niezwykle ważnym i nieuniknionym elementem potwierdzającym prawidłowe funkcjonowanie każdej pracowni, w której przeprowadzane są badania płynów ustrojowych na zawartość alkoholu etylowego.

Tabela 8
Porównanie wartości niepewności uzyskanej w wyniku oszacowania z wynikami rzeczywistymi
Comparison of estimated uncertainty obtained from estimation with real results

Dane z walidacji [%]		Seria 1 4.08.2008	Seria 2 05.08.2008	Seria 3 06-07.08.2008	Seria 4 07-08.08.2008	Seria 5 03-09.09.2008	Seria 6 09-15.09.2008	Seria 7 22-24.09.2008	Seria 8 25.09-29.10.2008	Seria 9 30-31.10.2008	Seria 10 14.11-10.12.2008
		Liczba próbek									
		12	14	33	20	8	7	8	19	6	10
c_0	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,51	0,50	0,49	0,49	0,49	0,49
U_{c_0}	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

jakością od pozostałych (firmy Cerilliant), gdyż jego wkład w u_{STD} jest największy.

- Odchylenie standardowe obliczone na podstawie próbek kontrolnych pozostaje w zgodzie z niepewnością obliczoną na podstawie budżetu niepewności.

BIBLIOGRAFIA

- „EA-04/16 Wytyczne EA dotyczące wyrażania niepewności w badaniach ilościowych”, grudzień 2003 r.
- „EURACHEM CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” – QUAM:2000.P1.

3. **Gubała W.:** Toksykologia alkoholu – wybrane zagadnienia, Wyd. IES, Kraków 1997.
4. Materiały z warsztatów „Metrologia chemiczna”, zorganizowanych w ramach targów EuroLab – XI Międzynarodowe Targi Analityki i Technik Pomiarowych” – 5.03.2009 r.
5. Metodyka oznaczania jakościowego i ilościowego alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka metodą chromatografii gazowej head-space, nr HJ/W-60/IV/08, wyd. 23.12.2008 r.
6. Niepewność pomiaru raz jeszcze. Różne podejścia do szacowania niepewności – Raport techniczny nr 1/2007 – EUROLAB, marzec 2007.
7. Norma PN-EN ISO/IEC 17025:2005 + Ap1:2007 – Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych.
8. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, **P. Konieczka i J. Namieśnik** [red.], Wyd. WNIT, Warszawa 2007.
9. Podręcznik obliczania niepewności pomiaru w laboratoriach środowiskowych, Biuletyn Informacyjny Klubu POLLAB 2/51/2008, wersja 3, styczeń 2008 r.
10. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 6 maja 1983 roku w sprawie warunków i sposobu dokonywania badań na zawartość alkoholu w organizmie, DzU z 1983 roku, nr 25, poz. 117.
11. **Rödel W., Wölm G.:** Chromatografia gazowa, Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 1992.
12. **Taylor J.R.:** Wstęp do analizy błędów pomiarowych, Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 1995.
13. Ustawa z dnia 26 października 1982 roku o wychowaniu w trzeźwości i przeciwdziałaniu alkoholizmowi, tekst jedn. DzU z 2002 roku, nr 147, poz. 1231 z późn. zm.
14. Ustawa z dnia 20 czerwca 1997 roku Prawo o ruchu drogowym, tekst jedn. DzU z 2003 roku, nr 58, poz. 515 z późn. zm.
15. Zasady przeprowadzania pomiarów stężenia alkoholu oraz opiniowania w sprawach trzeźwości. Zalecenia opracowane przez Instytut Ekspertyz Sądowych zatwierdzone przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w dniu 26 listopada 2004 roku, „Prokuratura i Prawo” 2005, nr 4.
16. **Zuba D.:** Niepewność pomiarowa wyznaczania stężenia alkoholu we krwi, „Z Zagadnień Nauk Sądowych” 2003, nr LIV.

Streszczenie:

Oznaczanie jakościowe i ilościowe alkoholu etylowego w materiale biologicznym wyznaczane jest metodą chromatografii gazowej head-space w Wydziale Fizykochemii CLK KGP, zgodnie z Procedurą badawczą nr HJ-60/Pb-IV/3/08 „Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego we krwi człowieka metodą chromatografii gazowej head-space”. Ww. metoda jest metodą z wyboru, o najwyższym stopniu swoistości. O szerokim zastosowaniu tej metody decydują jej główne zalety, m.in.: łatwość przygoto-

wania próbek do analizy, potrzeba niewielkiej ilości materiału przeznaczonego do badań, szybka możliwość wykrycia i wykonania oznaczenia oczekiwanej substancji w trakcie jednego cyklu badawczego, możliwość wykonania dużej liczby prób w krótkim czasie, a także czułość pomiaru oraz duża selektywność w stosunku do etanolu.

Pracownia badań płynów ustrojowych na zawartość alkoholu etylowego Wydziału Fizykochemii CLK KGP dąży do przeprowadzania badań na optymalnym poziomie jakościowym, tak aby uzyskiwane wyniki badań były miarodajne, obiektywne i jak najbardziej rzetelne. Dzięki przeprowadzonej walidacji z dużym prawdopodobieństwem można powiedzieć, że proces analizy przebiega w sposób prawidłowy oraz że daje precyzyjne i wiarygodne wyniki.

Słowa kluczowe: metoda chromatografii gazowej head-space, walidacja, liniowość, granica wykrywalności i oznaczalności, powtarzalność, odtwarzalność, niepewność pomiaru, budżet niepewności.

Summary

Qualitative and quantitative determination of ethyl alcohol in body fluids is performed by means of head-space gas chromatography in Physics and Chemistry Department of the Central Forensic Laboratory of Polish Police in conformity to Analytical procedure no. HJ-60/Pb-IV/3/08 “Determination of ethyl alcohol in human blood by means of head-space gas chromatography”. The aforementioned method was deliberately selected for its highest specificity. The widespread use of this method is conditioned by its main advantages, such as: easy preparation of samples for analysis, small quantities of test material required, detection and determination can be completed within one analytical cycle, large number of tests can be completed in a short time, measurements of high sensitivity and selectivity to ethanol.

The team of “alcohol in blood” determination in the Physics and Chemistry Department of the Central Forensic Laboratory of Polish Police is aiming at achieving an optimal qualitative level of analyses, so that the results were relevant, impartial and reliable. Upon the completion of the validation one might state with a greater certainty that the process of analysis is performed correctly and provides accurate and reliable results.

Keywords: head-space gas chromatography method, validation, linearity, detection and determinability limit, repeatability, reproducibility, measurement uncertainty, uncertainty budget.

Autorka składa podziękowania
p. Wiktorowi Dmitrukowi
za okazaną pomoc i cenne wskazówki
w trakcie przeprowadzania
badań walidacyjnych.