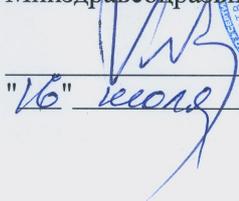


Утверждаю  
Директор ФГБУ «РЦСМЭ»  
Минздравсоцразвития РФ

  
\_\_\_\_\_ **А.В. Ковалев**  
"16" июля 2012 г.



Утверждаю

И.о. главного врача ГКУЗ «Наркологическая  
клиническая больница № 17 ДЗМ»

  
\_\_\_\_\_ **С.В. Золотухин**  
"16" июля 2012 г.



Утверждаю  
Начальник ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское  
областное бюро судебно-медицинской  
экспертизы»

  
\_\_\_\_\_ **В.В. Рычков**  
2012 г.



Утверждаю

Директор ФГБУ «Научно-практический  
токсикологический центр ФМБА России»

  
"2" июля 2012 г.



Утверждаю  
Директор ООО «НИИХром»

  
\_\_\_\_\_ **А.Д. Румянцев**  
"16" июля 2012 г.



## Методика измерений

### массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне

Москва, 2012 г.

**Разработана:**

ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздравсоцразвития РФ;

ГКУЗ «Наркологическая клиническая больница № 17 Департамента здравоохранения города Москвы»;

ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»;

ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России»;

ООО «Научно-исследовательский и конструкторский институт хроматографии»

**Исполнители:**

Саломатин Евгений Михайлович



Баринская Татьяна Осковна



Смирнов Алексей Витальевич



Никитин Павел Валерьевич



Клюев Александр Евгеньевич



Румянцев Алексей Дмитриевич



## ОГЛАВЛЕНИЕ

1 Назначение и область применения	4
2 Метрологические характеристики	4
3 Метод измерений	6
4 Термины и определения	7
5 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы	7
5.1 Средства измерений	7
5.2. Вспомогательные устройства	8
5.3. Реактивы	9
6 Требования безопасности	9
7 Требования к квалификации операторов	10
8 Условия выполнения измерений	10
9 Подготовка к выполнению измерений	11
9.1. Приготовление растворов	11
9.1.1. Приготовление водного раствора ТХУ	11
9.1.2. Приготовление водного раствора нитрита натрия	11
9.1.3. Приготовление раствора пропанола-1	12
9.1.4. Приготовление водного раствора смеси спиртов	12
9.2. Подготовка образцов для проведения градуировки хроматографа	12
9.3. Проверка параметров разделения	13
10. Градуировка хроматографа	15
11. Отбор проб биообъектов	16
12 Пробоподготовка и проведение анализа	17
13 Обработка результатов измерений	19
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	22
Приложение 1 (обязательное)	23
Приложение 2 (рекомендуемое)	25

## **1 Назначение и область применения**

Настоящая методика устанавливает процедуру измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне в диапазоне от 0,03 до 12,0 г/дм<sup>3</sup>. Настоящая методика не предназначена для измерений массовой концентрации этанола в указанных биосредах, если в них обнаружен пропанол-1.

## **2 Метрологические характеристики**

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значения погрешности и составляющих погрешности результатов измерений не превышают значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1. Метрологические характеристики

Наименование объекта	Диапазон измерений массовой концентрации, г/дм <sup>3</sup>	Показатель точности				Характеристики повторяемости		Характеристики воспроизводимости			
		Границы относительной погрешности, % (P=0,95)		Границы абсолютной погрешности, г/дм <sup>3</sup> , ±Δ (P=0,95)		Среднее квадратическое отклонение σ <sub>г</sub> повторяемости	Предел повторяемости, г (P=0,95)	Среднее квадратическое отклонение воспроизводимости σ <sub>R</sub>		Предел воспроизводимости R (P=0,95)	
		± δ n=2	± δ <sub>1</sub> n=1	n=2	n=1			n=2	n=1	n=2	n=1
Кровь	0,03-0,3 вкл.			0,03		0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>		0,043 г/дм <sup>3</sup>	
	Св. 0,3 до 2,0	9%	10%			1%	2,8%	4,6%	5,1%	13%	14%
	2 - 12	6,5%	7%			1%		3,3%	3,6%	9,3%	10%
Кровь после замораживания, трупная кровь	0,03-0,3 вкл.			0,06		0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,031 г/дм <sup>3</sup>		0,086 г/дм <sup>3</sup>	
	Св. 0,3 до 1,0	20%	20%			1%	2,8%	10,0%	10,0%	28%	28%
	1 - 12	9,0%	10%					4,6%	5,1%	13%	14%
Моча	0,03-0,3 вкл.			0,03		0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>		0,043 г/дм <sup>3</sup>	
	Св. 0,3 до 2,0	10%	11%			1%	3,1%	5,1%	5,6%	14%	16%
	2 - 12	6,0%	7,0%			1%		3,1%	3,6%	9%	10%
Слюна	0,03-0,3 вкл.			0,04		0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,02 г/дм <sup>3</sup>		0,057 г/дм <sup>3</sup>	
	Св. 0,3 до 2,0	14%	15%			2%	4,2%	7,1%	7,7%	20%	21%
	2 - 12	7,0%	8%			1%		3,6%	3,8%	10%	11%

### 3 Метод измерений

В основе методики лежит алкилнитритный метод газовой хроматографии, разработанный В.Ф. Пономаревым<sup>1</sup> и модифицированный А.А. Колдаевым<sup>2</sup>. Принцип метода состоит в дериватизации спиртов в ходе реакции этерификации с участием нитрита натрия в присутствии трихлоруксусной кислоты с последующим разделением и количественным определением полученных алкилнитритов методом газовой хроматографии.

Внесенные изменения можно отнести к трем категориям:

1 Оптимизация деталей анализа, включающая изменение объема нитрита натрия в реакционной смеси и объема вводимой в колонку газовой фазы, а также снижение концентрации внутреннего стандарта. Эти меры предохраняют колонку от перегрузки, способствуя более длительному сроку ее эксплуатации. Для лучшего разделения пиков используемый в качестве внутреннего стандарта пропанол-2 заменен на пропанол-1.

2 Модернизация методики в соответствии с современными техническими возможностями включает: применение систем сбора и обработки данных с соответствующим программным обеспечением вместо самописцев; более точная обработка хроматограмм на основе измерения площади пиков вместо высоты; использование одноразовых шприцев для ввода газовой фазы и вакуумных пробирок для отбора крови и пр.

3 Уточнение формул расчета концентрации этанола в нативной крови, полностью гемолизированной крови, моче и слюне путем введения соответствующих экспериментально установленных индивидуальных коэффициентов.

---

<sup>1</sup> Пономарев В.Ф. Определение этилового спирта в крови методом газо-жидкостной хроматографии. В кн.: Сб. трудов Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы и кафедры судебной медицины Таджикского государственного медицинского института им. Абу али Ибн-Сино. Вып. 9. Душанбе, 1967, с. 57 – 69.

<sup>2</sup> Медицинское освидетельствование для установления факта употребления алкоголя и состояния опьянения (методические указания). Утверждено зам. Министра здравоохранения СССР А.М. Москвичевым 01.09.1988 г.

## **4 Термины и определения**

4.1 Градуировочный раствор этанола – государственный стандартный образец (ГСО) состава водного раствора этанола, использующийся для градуировки хроматографа. Состав и погрешность аттестации ГСО состава растворов этанола указаны в паспорте ГСО.

4.2 Контрольный раствор этанола – раствор этанола, используемый для ежедневного контроля точности.

4.3 Фоновая проба – смесь реактивов, необходимых для проведения анализа (без добавления анализируемой пробы).

4.4 Нативная кровь – кровь, отобранная у живых лиц по 11, не подвергавшаяся замораживанию.

## **5 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы**

### **5.1 Средства измерений**

5.1.1 Газовый хроматограф типа МХ с детектором по теплопроводности, с пассивным термостатом и пределом детектирования по этанолу  $2 \cdot 10^{-8}$  г/см<sup>3</sup>, в комплекте с:

- металлической набивной колонкой 2 м х 3 мм, заполненной ПЭГ-1500 (20%) на инзенском кирпиче 600, модифицированном серебром;
- системой сбора и обработки данных «Z-Lab»;
- компьютером с операционной системой Windows XP или выше.

5.1.2 Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 1кг по ГОСТ 53228-2008.

5.1.3 Дозатор пипеточный типа «Колор» (автоматическая пипетка) с дозируемым объемом постоянным 0,5 см<sup>3</sup> (ДПОФ-1-500) или переменным 0,1 – 1 см<sup>3</sup> (ДПОП-1-100-1000) с наконечниками по ТУ 9443-005-33189998-2003, погрешность не более 2%.

5.1.4 \*Дозатор пипеточный типа «Колор» (автоматическая пипетка), с переменным дозируемым объемом 1 - 5 см<sup>3</sup>, (ДПОПц-1-1000-5000) с наконечниками, по ТУ 9443-005-33189998-2003, погрешность не более 2%.

5.1.5 \*Дозатор позитивного вытеснения Ленпипет СТЕППЕР (шаговая пипетка), ДПОПц-1-10-5000 с дозируемым объемом от 0,01 до 5 см<sup>3</sup>, с наконечниками, по ТУ 9452-002-33189998, погрешность не более 5%.

5.1.6 ГСО состава водных растворов этанола ВРЭ-1 (ГСО № 7969-2001, в ампулах по 5 см<sup>3</sup>).

5.1.7 \*Стандартные образцы состава водных растворов этанола ВРЭ-2 - ГСО 8789-2006 (во флаконах по 0,5 дм<sup>3</sup>).

5.1.8 \*Стандартный образец состава водного раствора пропанола-1 ВРП-1 (ЭМ 07.18.001) с массовой концентрацией 1 мг/см<sup>3</sup>.

5.1.9 Колбы мерные 2 кл. по ГОСТ 1770 вместимостью 100 - 2000 см<sup>3</sup>, 2 – 3 шт.

## 5.2 Вспомогательные устройства

5.2.1 Устройство для обжима колпачков типа ПОК-1 по ТУ-64-1 или зажим для флаконов (п. 5.2.2) ПФ-2.

5.2.2 Флаконы из трубки стеклянной для антибиотиков ФО-10-НС-1А вместимостью 10 см<sup>3</sup> (пенициллиновые флаконы) по ТУ 9461-025-00480678-99.

5.2.3 Пробки стандартные к флаконам.

5.2.4 Алюминиевые колпачки к флаконам типов К-2-20 и К-3-34.

5.2.5 Шприцы инсулиновые одноразовые.

5.2.6 Иглы для инъекций к одноразовым шприцам 0,6х30 мм (с голубой канюлей).

5.2.7. Стаканы химические по ГОСТ 25336-82.

5.2.8 Флаконы с пробками для хранения реактивов по ГОСТ 10782-85 вместимостью не более 0,1 дм<sup>3</sup>.

5.2.9 Флаконы темного стекла с пробками для хранения реактивов вместимостью не более 0,1 дм<sup>3</sup>.

5.2.10 Пробирки вакуумированные («Vacutainer»), содержащие этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA).

5.2.11 Пробирки вакуумированные («Vacutainer»), содержащие фторид натрия (NaF).

5.2.1. Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> с крышками (для слюны).

5.2.13 Контейнеры с завинчивающимися крышками вместимостью 20 – 100 см<sup>3</sup> (для мочи).

5.2.14 Шприц вместимостью 5 - 10 см<sup>3</sup>.

5.2.15 Холодильник бытовой.

5.2.16 Морозильная камера.

### 5.3 Реактивы

5.3.1 Трихлоруксусная кислота (ТХУ, CCl<sub>3</sub>COOH), квалификации не ниже «хч».

5.3.2 Нитрит натрия (NaNO<sub>2</sub>), ГОСТ 19906-74, квалификации не ниже «хч».

5.3.3 Метанол (CH<sub>3</sub>OH), ГОСТ 2222-95, марка А.

5.3.4 Этанол (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), содержание основного вещества не менее 95%.

5.3.5 Пропанол-1 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH) по ТУ 6-09-4344-77.

5.3.6 Пропанол-2 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH), квалификация не ниже «хч».

5.3.7 \*Азид натрия (NaN<sub>3</sub>), содержание основного вещества - не менее 99%.

**Примечание 1** Допускается применение иных средств измерений, вспомогательного оборудования и реактивов, метрологические и технические характеристики которых не уступают указанным выше, если при этом параметры разделения не уступают описанным в 9.3 и выполняются требования контроля качества по 10.4 и 14.

**Примечание 2** «\*» отмечены средства измерений и реактивы, использование которых не обязательно.

## **6 Требования безопасности**

6.1 При выполнении анализов соблюдают требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76.

6.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм установленных по ГОСТ 12.1.005-88.

6.3 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

6.4 При эксплуатации хроматографа соблюдают «Правила технической эксплуатации электроустановок потребителей и правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей», изд. Энергоатомиздат, 1986. Хроматограф устанавливают на лабораторном столе с деревянным или пластмассовым покрытием и надежно заземляют. Техническое обслуживание производят только при выключенном электропитании.

## **7 Требования к квалификации операторов**

К пробоподготовке и выполнению измерений допускают специалистов с высшим или средним специальным образованием, опытом работы на газовом хроматографе, освоивших данную методику и подтвердивших экспериментально соответствие получаемых ими результатов нормативам контроля по разделу 14.

К приготовлению растворов допускают оператора с квалификацией не ниже «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

Градуировку хроматографа осуществляет врач клинической лабораторной диагностики или врач судебно-медицинский эксперт (химик-эксперт, судебный эксперт).

## **8 Условия выполнения измерений**

8.1 Приготовление растворов, подготовку проб и выполнение анализа проводят в следующих условиях:

- температура воздуха (20±5) °С;
- атмосферное давление (84-106) кПа;
- относительная влажность воздуха не более 80%.

#### 8.2 Условия хроматографического анализа:

- температура инжектора ввода пробы 60 °С;
- температура термостата колонок 60 °С;
- температура детектора 60 °С;
- расход газа-носителя (гелий) 20-30 см<sup>3</sup>/мин;
- время анализа 140 с.

**Примечание** Данные условия хроматографического анализа выполняются при применении металлической набивной колонки по 5.1.1. При использовании иных колонок условия анализа могут быть изменены.

## 9 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление растворов и подготовку хроматографа.

### 9.1 Приготовление растворов

#### 9.1.1 Приготовление водного раствора ТХУ с массовой долей 50%

Раствор готовят в химическом стакане (5.2.7). Навеску ТХУ (5.3.1) растворяют в дистиллированной воде из расчета 50 г на 100 г раствора (50 г ТХУ+50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды), перемешивают, переливают во флакон(ы) (5.2.8) и закрывают пробками. Определяют в соответствии с 12.2 фоновое содержание этанола. Содержание этанола в растворе не должно превышать 0,03 г/дм<sup>3</sup>. В противном случае раствор готовят из реактива другой партии.

Срок хранения раствора ТХУ при температуре от 0 до +5 °С не ограничен.

#### 9.1.2 Приготовление водного раствора нитрита натрия с массовой долей 30%

Раствор готовят в химическом стакане. Навеску нитрита натрия (5.3.2) растворяют в дистиллированной воде из расчета 30 г на 100 г раствора (30 г

нитрита натрия+70 см<sup>3</sup> воды), перемешивают и после растворения разливают во флакон(ы) темного стекла (5.2.9) для хранения.

Срок хранения раствора в емкостях из темного стекла при температуре от 0 до +5 °С 2 месяца.

### **9.1.3 Приготовление раствора пропанола-1 в водном растворе азиды натрия (внутренний стандарт)**

В дистиллированной воде, заполняющей примерно на  $\frac{3}{4}$  мерную колбу, растворяют навеску азиды натрия (5.3.7) из расчета 0,5 г/дм<sup>3</sup>, перемешивают и с помощью пипеточного дозатора (5.1.3 или 5.1.4) добавляют пропанол-1 из расчета 1,25 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> для получения раствора с массовой долей 1 г/дм<sup>3</sup>, после чего доводят объем раствора до метки водой и снова перемешивают путем переворачивания закупоренной колбы. После этого раствор переливают во флакон(ы) для хранения по п. 5.2.8, полностью заполняя емкость, и плотно закупоривают.

Срок хранения раствора при условии полного заполнения и плотной закупорки емкостей при температуре от 0 до 5 °С - 3 месяца. Вскрытый флакон может храниться при температуре от 0 до 5 °С при условии плотной закупорки не более 3 дней.

Допускается использование раствора пропанола-1 в дистиллированной воде без азиды натрия. Срок хранения раствора при указанных выше условиях не более 2 недель.

### **9.1.4 Приготовление водного раствора смеси спиртов**

Смесь спиртов со значениями объемной доли 0,5 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> готовят следующим образом: в мерную колбу (5.1.9), заполненную дистиллированной водой примерно на  $\frac{3}{4}$ , добавляют с помощью дозатора пипеточного (п. 5.1.3): метанол (5.3.3), этанол (5.3.4) и пропанол-2 (5.3.5) из расчета 0,5 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>, после чего доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивают путем переворачивания закупоренной колбы.

Срок хранения раствора при температуре от 0 до 5 °С - 6 месяцев.

## 9.2 Подготовка образцов для проведения градуировки хроматографа

В качестве градуировочных растворов используют ГСО состава ВРЭ-1 по 5.1.6. В качестве контрольного раствора используют один из растворов, входящих в комплект ВРЭ-1, или ГСО состава ВРЭ-2 по 5.1.7 с массовой концентрацией этанола в диапазоне (0,3 – 1,2) г/дм<sup>3</sup>. После вскрытия флакона с ГСО весь объем переносится в пенициллиновые флаконы (5.2.2), которые закрываются пробками (5.2.3) и закупориваются алюминиевыми колпачками (5.2.4) с помощью устройства типа ПОК-1 5.2.1. Срок использования флакона после вскрытия – не более 1 недели при условии хранения плотно закупоренном флаконе при температуре от 0 до 5 °С.

Подготовка образцов осуществляется в соответствии с 12.4. Вместо исследуемого образца добавляют 0,5 см<sup>3</sup> градуировочного раствора, контрольного раствора или смеси спиртов (9.1.4).

## 9.3. Проверка параметров разделения

После выхода хроматографа на рабочий режим проводят анализ смеси спиртов ( 9.1.4) по (12.4 – 12.7). После регистрации хроматограммы с помощью программного обеспечения (системы сбора и обработки данных по 5.1.1) определяют времена удерживания компонентов и параметры разделения.

9.3.1 Время удерживания компонентов может варьировать в зависимости от свойств конкретной колонки и скорости потока газа-носителя, однако порядок выхода пиков остается неизменным: воздух+несорбируемые газы, метилнитрит, этилнитрит, пропил-2-нитрит, пропил-1-нитрит. Значения времени удерживания и допускаемые отклонения от них определяют эмпирически и вносят в соответствующее названию пика окно градуировочной таблицы согласно инструкции к системе сбора и обработки данных. Определение времени удерживания спиртов повторяют при изменении условий разделения пиков (например, скорости потока газа-носителя), а также после длительного периода, в течение которого хроматограф был выключен. На рис. 1 приведена типичная хроматограмма смеси спиртов, в таблице 2 - типичные значения времени удерживания компонентов и допускаемые отклонения).

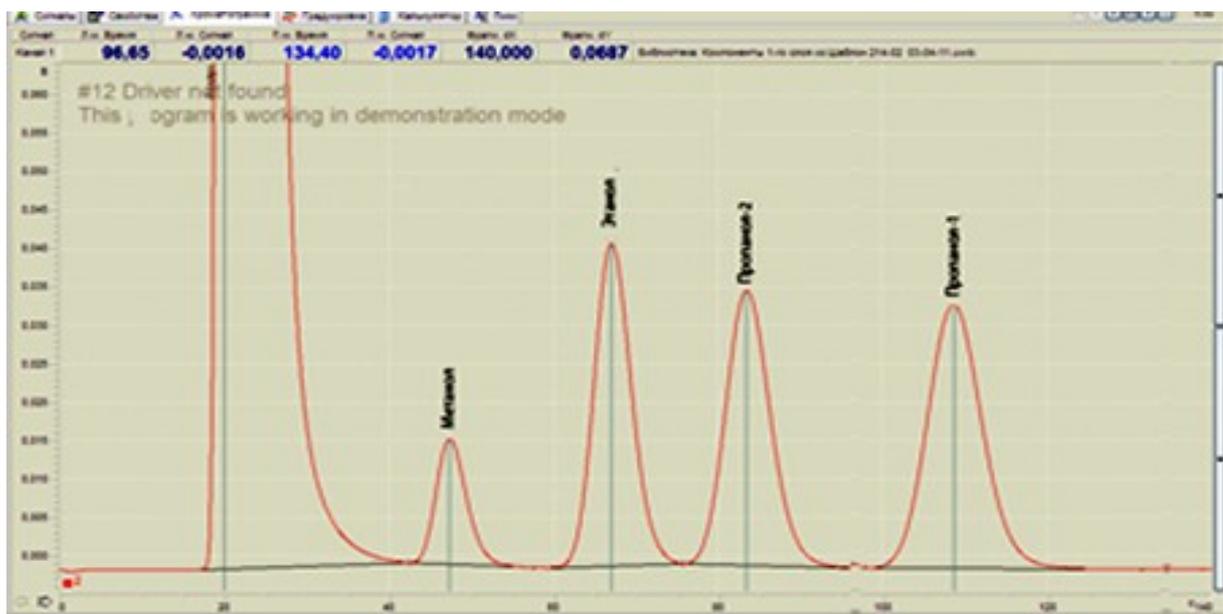


Рис. 1. Типичная хроматограмма раствора смеси спиртов

**Примечание** Допускается подписывать пики на хроматограмме названиями соответствующих спиртов: этанол – вместо этилнитрит, пропанол-1 – вместо пропи-1-нитрит и т.д.

Таблица 2. Типичные значения времени удерживания компонентов

Наименование компонента	Время удерживания, с
Метилнитрит	52±5
Этилнитрит	70±5
Пропил-2-нитрит	84±5
Пропил-1-нитрит	106±5

9.3.2 Эффективность колонки (число теоретических тарелок  $N$ ) для этилнитрита рассчитывают по формуле (1):

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (1),$$

где:  $t_R$  – время удерживания этилнитрита, с;

$w_{0,5}$  – ширина пика на половине высоты, с.

Степень разделения ( $R_s$ ) соседних пиков рассчитывают по формуле (2)

$$R_s = \frac{t_R^a - t_R^b}{W_{0,5(a)} + W_{0,5(b)}} \quad (2),$$

где индексы «а» и «b» относятся к двум соседним пикам.

Параметры разделения должны удовлетворять следующим требованиям:

- эффективность колонки должна составлять не менее 500 теоретических тарелок;
- степень разделения пиков пропил-2-нитрита и этилнитрита должна быть не менее 1,1.

## 10 Градуировка хроматографа

10.1 Для установления градуировочной характеристики зависимости проводят последовательно анализ по 12.4 – 12.7 не менее 4-х стандартных растворов по 9.2 в диапазоне 0,03 – 6 г/дм<sup>3</sup>.

Градуировку начинают с раствора с наименьшей концентрацией. Анализ каждого раствора выполняют не менее 2 раз. Расхождение между результатами параллельных определений должно удовлетворять условию приемлемости по п. 13.2 (формулы 7 или 8).

10.2 Расчет градуировочной характеристики выполняют с помощью системы обработки данных по методу наименьших квадратов. При этом строят градуировочную зависимость концентрации от площади пика этилнитрита методом внутреннего стандарта, используя функцию вида

$$y = ax + b \quad (3),$$

где:

$$y = C_{AS}/C_{IS};$$

$$x = S_{AS}/S'_{IS};$$

$C_{AS}$  – массовая концентрация этанола в стандартном растворе, г/дм<sup>3</sup>;

$C_{IS}$  – массовая концентрация внутреннего стандарта (пропанола-1), г/дм<sup>3</sup>;

$S_{AS}$  – площадь пика этилнитрита, мВ\*с;

$S'_{IS}$  – площадь пика внутреннего стандарта (пропил-1-нитрита), мВ\*с;

$a$  – коэффициент относительной чувствительности, безразмерный;

b – отрезок, отсекаемый на оси «у», безразмерный.

Градуировочная зависимость считается приемлемой, если значение ОСКО результатов измерений не превышает 1%, а  $R^2 \geq 0,999$ . Оба параметра могут быть рассчитаны системой обработки данных в автоматическом режиме или отдельно в программе Excel (Приложение 1).

10.3 Стабильность градуировочной характеристики периодически (через 25-30 анализов) проверяют следующим образом. Проводят анализ контрольного раствора (п. 9.2) по пп. 12.4 – 12.7. Результат анализа  $C_K$  не должен отличаться от аттестованного значения содержания этанола в контрольном растворе ( $C_{nom}$ ) более, чем на  $0,08 \cdot C_K$ :

$$|C_K - C_{nom}| \leq 0,08 \times C_{nom} \quad (4),$$

где:

$C_K$  – результат измерения массовой концентрации этанола в контрольном растворе;

$C_{nom}$  - аттестованное значение массовой концентрации этанола в контрольном растворе.

В противном случае градуировку проводят заново. Рекомендуется проводить градуировку при замене растворов ТХУ, внутреннего стандарта или иных изменениях условий анализа. Градуировка обязательна при изменении концентрации раствора внутреннего стандарта.

## **11 Отбор проб биообъектов**

Кровь у живых лиц отбирают в вакуумированные пробирки по 5.2.10. Кровь трупов отбирают из крупных вен конечностей или синусов твердой мозговой оболочки в вакуумированные пробирки по 5.2.11.

Слюну собирают на ватные тампоны, помещенные в ротовую полость в области выхода слюнных желез (2 – 3 тампона), около 5 минут (до полной

пропитки тампонов слюной), после чего тампоны помещают в шприц по 5.2.14, и с помощью поршня слюну отжимают в пробирки «Эппендорф» по 5.2.12<sup>3</sup>.

Мочу у живых лиц собирают при естественном мочеиспускании или через катетер в контейнеры по 5.2.13; мочу трупов отбирают при помощи шприца по 5.2.14 через разрез или прокол стенки мочевого пузыря и помещают в контейнеры или пенициллиновые флаконы по 5.2.2, которые закрывают пробками и закупоривают колпачками.

Все пробы биообъектов должны храниться до анализа в следующих условиях: заполнение емкости не менее чем на 80% объема, плотная закупорка емкости, температура хранения от 0 до 5 °С, при этом срок хранения до анализа не должен превышать 7 дней, или в условиях замораживания при температуре не выше -18 °С, при этом срок хранения – до 2 месяцев.

## **12 Пробоподготовка и проведение анализа**

12.1 Каждая серия анализов начинается с анализа фоновой пробы по 4.3, с целью выявления следов этанола в реактивах, используемой посуде, шприце. Анализ производят по 12.4 - 12.7. Содержание этанола в фоновой пробе не должно превышать 0,03 г/дм<sup>3</sup>. В противном случае следует обнаружить источник загрязнения и устранить его.

12.2 Затем проводят анализ контрольного образца (по 9.2). Если результат анализа удовлетворяет условию приемлемости (4) по 10.3, приступают к анализу проб биообъектов. В противном случае градуировку проводят заново, после чего приступают к анализу проб биообъектов.

12.3 Все растворы и объекты исследования должны иметь комнатную температуру. Размораживание крови, хранившейся в морозильной камере, также проводят при комнатной температуре.

12.4 В пенициллиновый флакон (5.2.2) вносят 0,5 см<sup>3</sup> раствора ТХУ ( 9.1.1), 0,5 см<sup>3</sup> водного раствора пропанола-1 (внутренний стандарт, по 9.1.3 или 5.1.8) и 0,5 или 0,25 см<sup>3</sup> (см. 13.7) исследуемого объекта (мочи, слюны или крови), после

---

<sup>3</sup> Сбор слюны «методом плевания» непригоден для анализа, т.к. в этом случае слюна содержит слизевые сгустки и не поддается точному дозированию.

чего флакон немедленно закрывают пробкой. Для дозирования раствора ТХУ применяют дозатор СТЕППЕР по 5.1.5 или дозатор пипеточный по 5.1.3. Для дозирования внутреннего стандарта и объекта используют дозатор пипеточный. Перед дозированием крови пробирку несколько раз переворачивают до достижения гомогенности. Кровь дозируют методом обратного пипетирования, и после ее добавления к смеси флакон следует немедленно энергично встряхнуть до получения гомогенной взвеси. Особенно энергичное встряхивание требуется при работе с кровью после замораживания и трупной кровью. Затем флаконы обжимают алюминиевыми колпачками при помощи ПОК-1 или применяют зажим для флаконов (5.2.1).

**Примечание** Если моменты внесения внутреннего стандарта и объекта исследования разделены по времени, то в промежутке флакон должен быть закрыт пробкой.

12.5 Непосредственно перед анализом во флакон с помощью шприца ( 5.2.5 и 5.2.6) путем прокола резиновой пробки вносят 0,25 мл раствора нитрита натрия (по 1.2), энергично встряхивают флакон в горизонтальной плоскости (маятникообразным движением) в течение 3 – 5 с и оставляют в покое. Через  $60 \pm 5$  с иглу другого шприца также путем прокола резиновой пробки вводят во флакон так, чтобы она не касалась жидкой фазы, «промывают» шприц газовой фазой (несколько раз отбирают примерно по  $0,5 \text{ см}^3$  газовой фазы и выпускают ее обратно), после чего отбирают  $0,15 \text{ см}^3$  газовой фазы и вводят пробу в инжектор хроматографа. Шприц для газовой фазы должен быть сухим и герметичным. В промежутках между анализами его следует держать на воздухе без поршня для удаления следов газовой фазы анализируемой пробы.

12.6 Перед началом измерений оператор заполняет информационные поля в соответствии с программой обработки результатов анализа, в том числе, касающиеся идентификации компонентов на хроматограмме.

12.7 Регистрируют хроматограмму в соответствии с инструкцией к системе сбора и обработки данных. Типичная хроматограмма приведена на рисунке 1.

**Примечание** Для проверки отсутствия в пробе пропанола-1 первый анализ каждого образца проводят без добавления внутреннего стандарта. При обнаружении пика пропанола-1 дальнейший анализ не проводят. При отсутствии пика пропанола-1 продолжают анализ по 12.4 – 12.7.

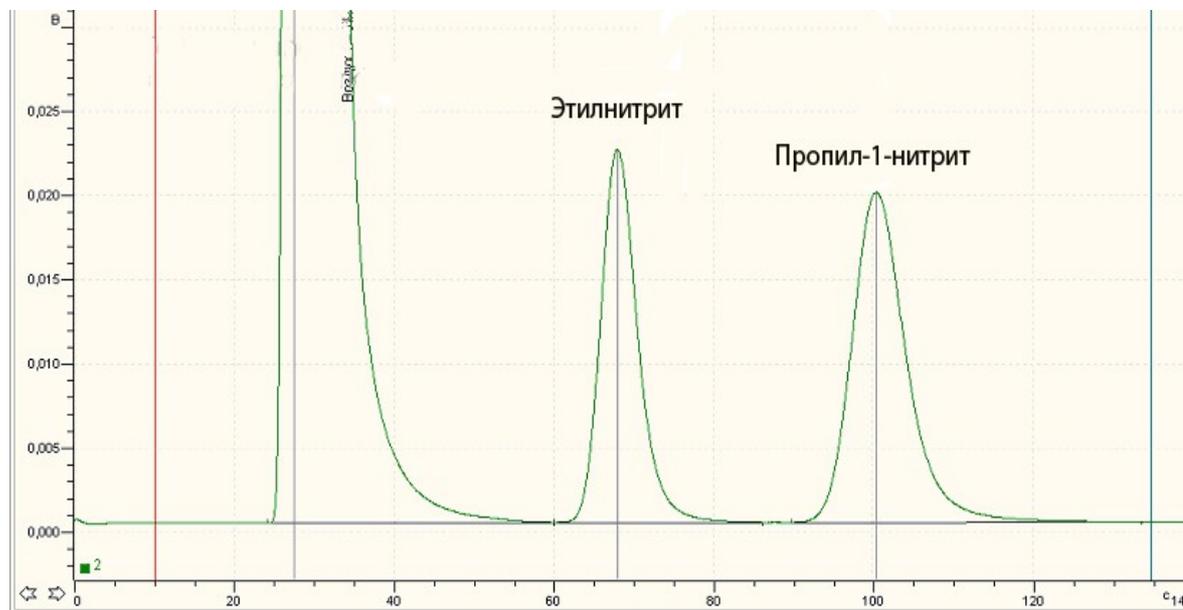


Рисунок 2. Хроматограмма раствора этанола с концентрацией 0,5 г/дм<sup>3</sup>

### 13 Обработка результатов измерений

13.1 Расчет массовой концентрации этанола в исследуемом образце ( $C_x$ ) выполняется автоматически с помощью системы сбора и обработки данных в соответствии с уравнениями:

$$C_x = C_{IS} \times \left( \frac{S_x \times a}{S_{IS}} + b \right) \text{ для мочи и слюны} \quad (5) \text{ и}$$

$$C_x = C_{IS} \times \left( \frac{S_x \times a}{S_{IS}} + b \right) \times \theta \text{ для крови} \quad (6),$$

где:

$C_x$ - массовая концентрация этанола в исследуемом образце, г/дм<sup>3</sup>;

$S_x$  – площадь пика этилнитрита в исследуемом образце, мВ\*с;

$S_{IS}$  – площадь пика пропил-1-нитрита (внутреннего стандарта) в пробе исследуемого образца, мВ\*с;

$\theta$  – поправка (корректирующий фактор) (табл. 3).

**Примечание** Если используемое программное обеспечение не предусматривает введения поправок, то ее вводят в полученный результат вне программы в соответствии с формулой 6.

Таблица 3. Значения поправок для коррекции систематической погрешности при выполнении измерений массовой концентрации этанола в крови алкилнитритным методом

Биосреда	Нативная кровь	Кровь после замораживания, трупная кровь
$\theta$	0,82	0,90

13.2 При проведении параллельных определений за результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (7):

$$\frac{2 \times (|C_1 - C_2|) \times 100}{(C_1 + C_2)} \leq r (\%) \quad (7)$$

или

$$|C_1 - C_2| \leq r (\text{г/дм}^3) \quad (8),$$

где

$C_1, C_2$  – результаты параллельных определений массовой концентрации этанола в одном образце, г/дм<sup>3</sup>;

$r$  – значение предела повторяемости, % или г/дм<sup>3</sup> (таблица 1).

13.3 Если условие (7 или 8) не выполняется, получают еще два результата анализа ( $C_3, C_4$ ) того же образца в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие (9)

$$\frac{4 \times (C_{\max} - C_{\min}) \times 100}{(C_1 + C_2 + C_3 + C_4)} \leq CR_{0,95} \quad (9)$$

где

$C_{\max}, C_{\min}$  – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой концентрации этанола в одном образце, г/дм<sup>3</sup>;

$CR_{0,95}$  – значение критического диапазона для уровня вероятности  $P=0,95$ , и 4-х результатов определений ( $CR_{0,95} = 3,6$ ).

Если условие (9) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

13.4 При проведении параллельных определений результат измерений в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\bar{C} \pm 0,01 \times \delta \times \bar{C} \text{ или} \\ \bar{C} \pm \Delta \quad (10)$$

где

$\bar{C}$  – среднее арифметическое значение результатов  $n$  определений, признанных приемлемыми по 13.2, 13.3, г/дм<sup>3</sup>;

$\delta$  – граница относительной погрешности при  $P=0,95$ , % ( $n=2$ , таблица 1);

$\Delta$  – граница абсолютной погрешности при  $P=0,95$ , г/дм<sup>3</sup> ( $n=2$ , таблица 1).

13.5 При проведении однократных определений результат измерений в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$C \pm 0,01 \times \delta_1 \times C \text{ или} \\ C \pm \Delta \quad (11),$$

где:

$\delta_1$  – граница относительной погрешности при  $P=0,95$ , % ( $n=1$ , таблица 1);

$\Delta$  – граница абсолютной погрешности при  $P=0,95$ , г/дм<sup>3</sup> ( $n=1$ , таблица 1).

13.6 Если значение массовой концентрации этанола находится в диапазоне от 6 до 12 г/дм<sup>3</sup>, проводят повторный анализ образца, при котором во флакон с растворами ТХУ и внутреннего стандарта по 12.4 дозатором пипеточным с переменным объемом по 5.1.3 вносят 0,25 см<sup>3</sup> исследуемого объекта. При этом в окне программы «объем пробы» указывают данный объем исследуемого образца. Дальнейшая обработка результатов проводится с помощью программного обеспечения в соответствии с 13.1-13.3.

13.7 В случае если полученное значение массовой концентрации ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, в документах,

предусматривающих использование результатов измерений, указывают: «массовая концентрация этанола менее 0,03 г/дм<sup>3</sup> (более 12 г/дм<sup>3</sup>)».

## **14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории**

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

## Приложение 1.

### Пример расчета параметров оценки приемлемости градуировки

В процессе градуировки было получено  $m$  хроматограмм стандартных образцов (табл. 4) с аттестованными значениями массовой концентрации, указанными в столбце " $C_{ном}$ ", на основе которых системой обработки данных была рассчитана градуировочная характеристика.

Таблица 4. Результаты градуировки

	$C_{ном}$	$C_f$	$C_f$ средняя
	0,15	0,145 0,146	0,146
	0,30	0,303 0,306 0,309	0,306
	1,00	1,015 1,008	1,011
	1,98	2,015 1,973	1,994
	2,99	2,971 2,979 2,972	2,974
	5,00	5,007 4,996	5,002
<b><math>C_{ном}</math> средняя</b>	1,903	$\Sigma(C_{ном}-C_{f.ср.})^2$	0,0006396
<b>n</b>	6	<b>СКО</b>	0,0113104
		<b>ОСКО</b>	<b>0,59%</b>
		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,99997</b>

Фактические значения массовой концентрации этанола, рассчитанные после градуировки, приведены в столбце " $C_f$ ".

Расчет ОСКО погрешности градуировки выполняется в соответствии с уравнением:

$$ОСКО = \frac{СКО}{C_{ном\ средняя}} \times 100\%$$

Среднее значение концентрации этанола в стандартных образцах рассчитано в ячейке под столбцом " $C_{ном}$ ".

Расчет СКО выполняется в соответствии с уравнением:

$$СКО = \sqrt{\frac{\sum (C_{nom} - C_{f.c.})^2}{n - 1}}$$

Сумма квадратов разности  $\sum(C_{nom}-C_{f. cp.})^2$  - вычисляется средствами Excel (функция "СУММКВРАЗН" в меню функций, категория "математические").

n - число полученных средних, равное числу использованных при градуировке стандартных растворов.

При расчете  $R^2$  корреляция производится средствами Excel (функция «КОРРЕЛ», категория «статистические») между данными столбцов "С<sub>nom</sub>" и "С<sub>f средняя</sub>".

## Приложение 2

### Параметры карты Шухарта для контроля стабильности относительного среднеквадратического отклонения повторяемости

Контроль стабильности относительного среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости осуществляют в соответствии с табл. 5 п. 6.1.13 РМГ76-2004 "ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа" с применением контрольных карт Шухарта.

Контрольный результат:  $\frac{2 \times (C_{\max} - C_{\min})}{C_{\max} + C_{\min}}$  для диапазона св. 0,3 – 12 г/дм<sup>3</sup> или

$C_{\max} - C_{\min}$  для диапазона от 0,03 до 0,3 г/дм<sup>3</sup> вкл.;

Средняя линия:  $1,128 \times 0,01 \times \sigma_{\text{отн.}}$ , где  $\sigma_{\text{отн.}}$  – показатель повторяемости, выраженный в относительных единицах (процентах), или

$1,128 \times \sigma$ , где  $\sigma$  – показатель повторяемости, выраженный в единицах массовой концентрации компонента в пробе (г/дм<sup>3</sup>) (табл. 1);

Предел предупреждения:  $2,834 \times 0,01 \times \sigma_{\text{отн.}}$  или  $2,834 \times \sigma$ ;

Предел действия:  $3,686 \times 0,01 \times \sigma_{\text{отн.}}$  или  $3,686 \times \sigma$ .

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории. При этом число контрольных процедур в месяц должно быть не меньше указанного в табл. 5. При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проверяют точность дозаторов и правильность выполнений процедур пробоподготовки и анализа оператором.

Таблица 5. Рекомендуемое число контрольных процедур за месяц

Число анализируемых рабочих проб за месяц	Число контрольных процедур, не менее	Число анализируемых рабочих проб за месяц	Число контрольных процедур, не менее
Не более 10	2	От 101 до 200	10
От 11 до 20	3	От 201 до 500	12
От 21 до 50	4	Св. 500	15
От 51 до 100	7	-	-

## **Дополнение**

### **Параметры карты Шухарта для контроля стабильности градуировки**

Контроль стабильности градуировочной кривой (контроль погрешности) осуществляется перед каждой серией исследований по п. 10.3 настоящей методики. Результаты проверки фиксируются в соответствии с табл. 6 п. 6.1.13 РМГ76-2004 "ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа" с применением контрольных карт Шухарта.

Параметры карты Шухарта для результатов измерения концентрации этанола в контрольном растворе:

Результат контрольной процедуры:  $\frac{x - C}{C}$ , где  $x$  – измеренное значение концентрации этанола в контрольном растворе, а  $C$  – ее аттестованное значение.

Средняя линия – 0;

Пределы предупреждения – 0,08;

Пределы действия – 0,015.

Параметры пределов предупреждения и действия рассчитаны на основе полученной экспериментально величины границ относительной погрешности ( $\delta_1$ ) для водного раствора этанола в диапазоне концентраций 0,3 – 2 г/дм<sup>3</sup> при однократном анализе (n=1).



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ  
РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
"ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ"**

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46

E-mail: [analyt-vm@vniims.ru](mailto:analyt-vm@vniims.ru)

Тел. (495) 437 9419

Факс: (495) 437 5666

**СВИДЕТЕЛЬСТВО № 01.00225/205-42-12**

**ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ**

**«МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ  
МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭТАНОЛА В КРОВИ, МОЧЕ И СЛЮНЕ»**

Методика измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне (количество страниц – 26), разработанная:

ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» МЗ РФ;

ГКУЗ «Наркологическая клиническая больница № 17 ДЗ г. Москвы»;

ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России»;

ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное бюро судебно-медицинской

экспертизы»;

ООО «Научно-исследовательский и конструкторский институт хроматографии,

аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563–2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002.

Аттестация осуществлена по результатам теоретических и экспериментальных исследований методики измерений.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости и показателя правильности.

Дата выдачи 14 июля 2012 года

Заместитель директора

В.А. Сковородников



РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ АТТЕСТАЦИИ

Наименование объекта	Диапазон измерений массовой концентрации, г/дм <sup>3</sup>	Показатели точности		Характеристики повторяемости		Характеристики воспроизводимости			
		Границы относительной погрешности, % (P=0,95)		Среднее квадратическое отклонение, %	Предел повторяемости, г (P=0,95)	Среднее квадратическое отклонение воспроизводимости, σ <sub>R</sub>		Предел воспроизводимости, R (P=0,95)	
		n=2	n=1			n=2	n=1	n=2	n=1
Кровь	0,03-0,3 вкл.			0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>	0,043 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>	0,043 г/дм <sup>3</sup>
	Св. 0,3 до 2,0	9%	10%	1%	2,8%	4,6%	5,1%	13%	14%
Кровь после замораживания	2 - 12	6,5%	7%	1%		3,3%	3,6%	9,3%	10%
	0,03-0,3 вкл.			0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,031 г/дм <sup>3</sup>	0,086 г/дм <sup>3</sup>	0,031 г/дм <sup>3</sup>	0,086 г/дм <sup>3</sup>
Моча	Св. 0,3 до 1,0	20%	20%	1%	2,8%	10,0%	10,0%	28%	28%
	1 - 12	9,0%	10%			4,6%	5,1%	13%	14%
Слюна	0,03-0,3 вкл.			0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>	0,043 г/дм <sup>3</sup>	0,015 г/дм <sup>3</sup>	0,043 г/дм <sup>3</sup>
	Св. 0,3 до 2,0	14%	15%	1%	3,1%	5,1%	5,6%	14%	16%
	2 - 12	7,0%	8%	1%	4,2%	3,1%	3,6%	9%	10%
	0,03-0,3 вкл.			0,005 г/дм <sup>3</sup>	0,014 г/дм <sup>3</sup>	0,02 г/дм <sup>3</sup>	0,057 г/дм <sup>3</sup>	0,02 г/дм <sup>3</sup>	0,057 г/дм <sup>3</sup>
	Св. 0,3 до 2,0	7,0%	8%	2%		7,1%	7,7%	20%	21%
	2 - 12	7,0%	8%	1%		3,6%	3,8%	10%	11%

Примечание: n – число параллельных определений.

Начальник отдела



Ш.Р. Фаткудинова



Федеральное государственное унитарное  
предприятие  
**"Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
метрологической службы"**

119361, Москва, ул. Озерная, 46

Тел.: (495) 437 5577  
E-mail: Office@vniims.ru

Факс: (495) 437 5666  
Office.vniims@g23.relcom.ru  
http://www.vniims.ru

23.08.12 № 1035-34/612

На № \_\_\_\_\_

**Директору ФГБУ «РЦСМЭ»  
Минздравоохранения РФ  
А.В. Ковалеву**

125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13

Сведения об аттестованных  
методиках (методах)  
измерений

На Ваш исх. № 3034 от 01.08.2012г. сообщаю, что «Методика измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне», разработанная Вашей организацией, ГКУЗ «Наркологическая клиническая больница № 17 ДЗ г. Москвы», ФГБУ «Научно-практический токсикологический центр ФМБА России», ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», ООО «Научно-исследовательский и конструкторский институт хроматографии» и аттестованная ФГУП «ВНИИМС» (свидетельство об аттестации № 01.00225/205-42-12 от 14.07.2012г.), зарегистрирована в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений под номером ФР.1.39.2012.12815.

Зам. директора

В.А. Сквородников

Исп. Скворцова М.В.  
(495) 437-37-01  
skvortsova@vniims.ru