



СОГЛАСОВАНО

Директор РУП «БелГИМ»

  
\_\_\_\_\_  
Н. А. Жигора  
« 10 » 05 2001



УТВЕРЖДАЮ

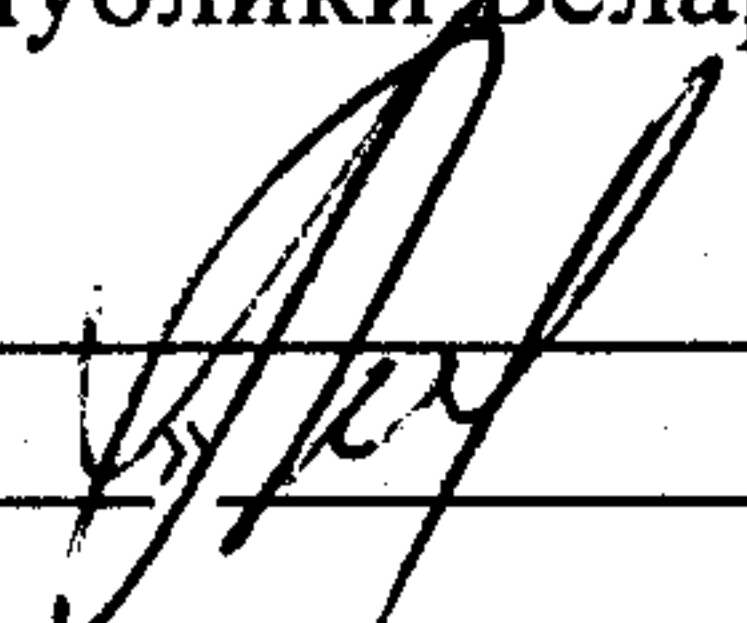
Заместитель министра здравоохранения  
Республики Беларусь

  
\_\_\_\_\_  
А. С. Курченков  
« 22 » 03 2001



СОГЛАСОВАНО

Начальник ГУФМ Минздрава  
Республики Беларусь

  
\_\_\_\_\_  
А. Н. Федоров  
« 22 » 03 2001 г.

МЕТОДИКА  
ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА  
В ЖИДКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ ОРГАНИЗМА

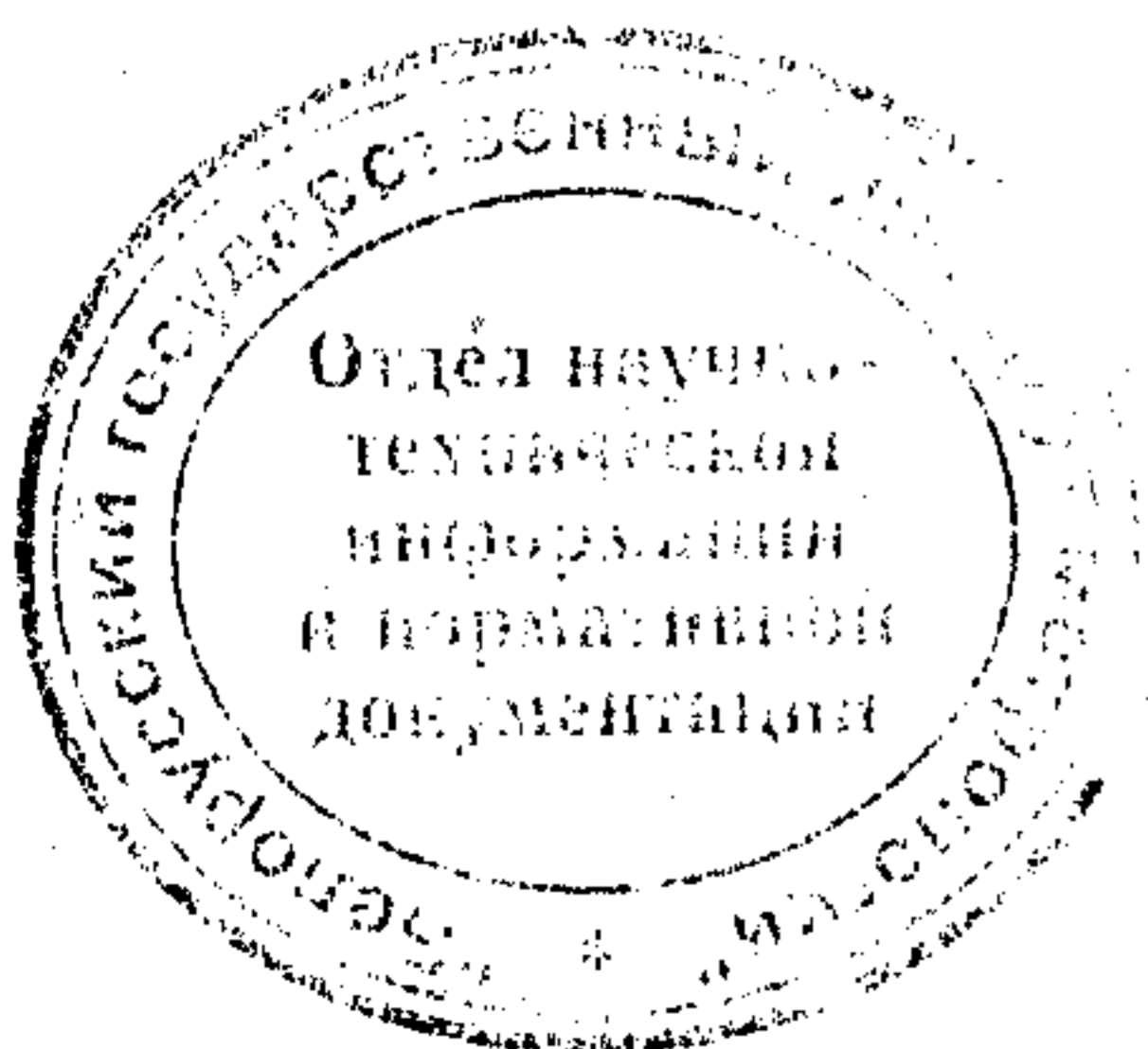
*МВИ.МН 1329-2001*

Разработчики:

Минский городской наркологический диспансер  
НИИ ядерных проблем Белгосуниверситета  
ООО «Новые аналитические системы»

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение и область применения.....	5
2. Нормы погрешности измерений.....	5
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы.....	5
4. Метод измерений.....	7
5. Требования безопасности.....	7
6. Требования к квалификации оператора.....	7
7. Условия измерений.....	7
8. Подготовка к выполнению измерений.....	7
9. Выполнение измерений.....	8
10. Обработка результатов измерений.....	9
11. Оформление результатов измерений.....	9
12. Контроль погрешности.....	9
13. Нормативные ссылки.....	9



## 1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий документ устанавливает методику количественного химического анализа крови, слюны и мочи для определения содержания этанола в диапазоне концентраций от 0,1 ‰ до 6 ‰.

## 2. НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Методика выполнения измерений обеспечивает определение содержания этанола с погрешностью, не превышающей значений, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Нормы погрешности измерения содержания этанола

Диапазон массовой концентрации С, ‰	Показатель сходимости $\sigma_{cx}^0[\Delta]$ не более	Границы погрешности $\Delta$ при $P = 0,95$ не более
0,1 - 6,0	$0,024 \cdot C + 0,018$	$\pm (0,096 \cdot C + 0,020)$

## 3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, устройства, материалы и реактивы:

### 3.1. Средства измерений

Хроматограф «3700» ТУ 25-0585.110-86 с детектором по теплопроводности, Система регистрации, обработки и хранения спектрометрической информации ЮНИХРОМ 97 ТУ РБ 14597800.001-98 с относительной погрешностью измерения площади под пиком не более 1 %,

Колба мерная 2-500-2 ГОСТ 1770-74,

Колба мерная 2-250-2 ГОСТ 1770-74,

Колба мерная 2-100-2 ГОСТ 1770-74,

Колба мерная 2-50-2 ГОСТ 1770-74,

Мензурка 100 ГОСТ 1770-74,

Стаканчики для взвешивания СВ-34/12 ГОСТ 25336-82,

Пипетка мерная 1-1-2-1 ГОСТ 29227-91 (ИСО 835/1),

Пипетка мерная 1-1-2-2 ГОСТ 29227-91 (ИСО 835/1),

Пипетка мерная 1-1-2-5 ГОСТ 29227-91 (ИСО 835/1),

Пипетка мерная 1-1-2-10 ГОСТ 29227-91 (ИСО 835/1),

Ареометр для спирта АСП-Т ГОСТ 18481-81,

Термометр лабораторный ТЛ-2 ГОСТ 28498-90,

Весы лабораторные типа ВЛР-200г по ГОСТ 24104-88 2-го класса точности.

Шприц типа «Рекорд» объёмом 1 мл с силиконовым уплотнителем по ТУ 64-1-863-80,

### 3.2. Устройства

Металлическая колонка длиной 2 м и диаметром 3 мм (Твёрдый носитель (ТН) – целит С-22, фракция 80 – 100 меш, модифицированный металлическим серебром. Неподвижная фаза (НФ) – полиэтиленгликоль – 1500. Соотношение НФ : ТН – 1 : 10),

Иглы к шприцам типа «Рекорд» А-04, 20-1-15 (для отбора парогазовой фазы),

Водоструйный насос, или вакуумный насос, или электроотсос хирургический,

Шкаф сушильный с диапазоном температур от 80 °С до 200 °С,

Шкаф вытяжной,

Холодильник бытовой,

Мойка для мытья лабораторной посуды (двухсекционная),

Приспособление для обжима алюминиевых колпачков ПОК-1,

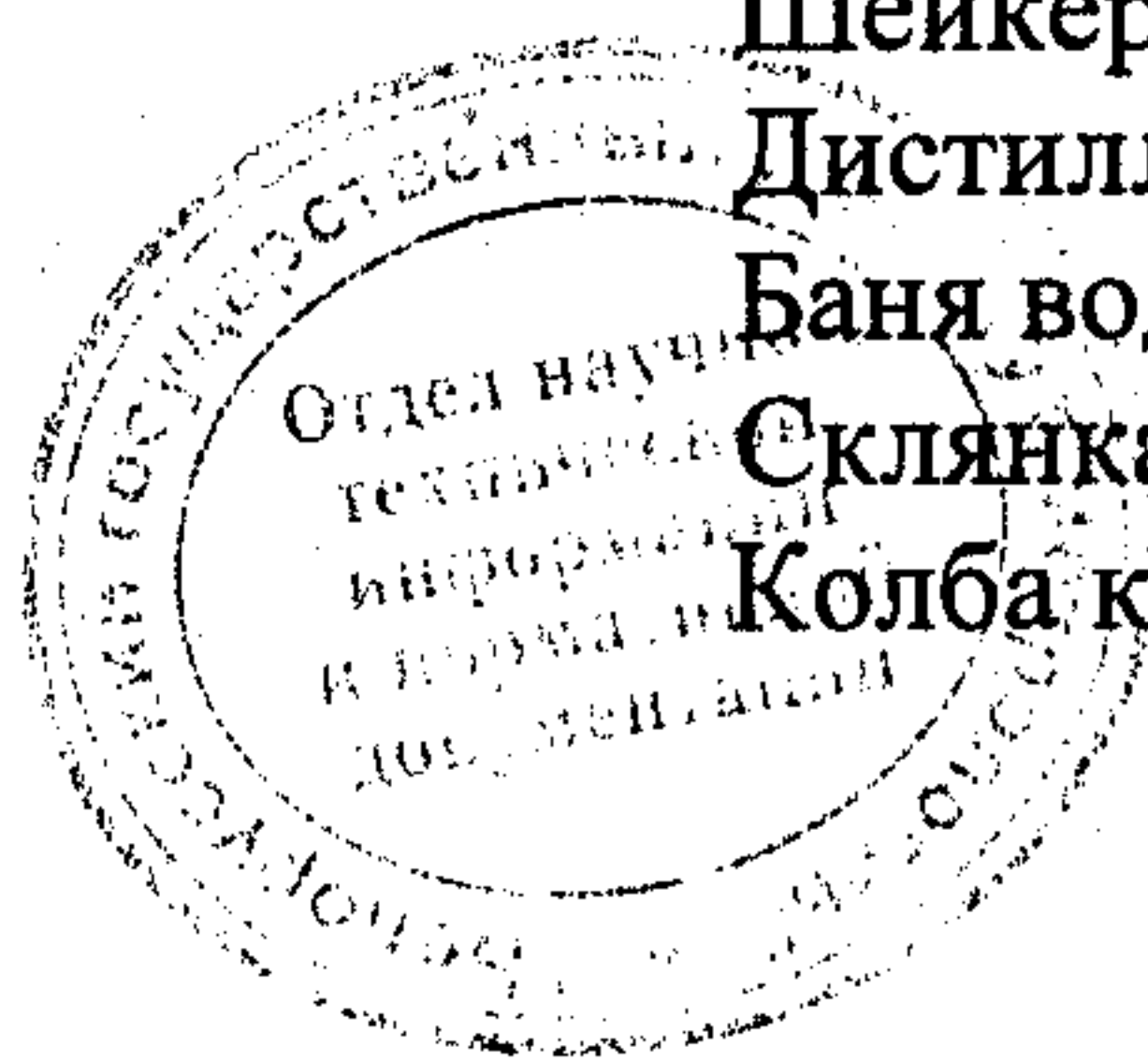
Шейкер,

Дистиллятор,

Баня водяная с диапазоном температур от 55 °С до 90 °С,

Склянка с притёртой пробкой на 100 мл,

Колба круглодонная со шлифом № 29 на 5 л,



Флаконы из-под пенициллина с пробками резиновыми,  
Колпачки алюминиевые,  
Прибор для обжима пенициллиновых флаконов.

### 3.3. Материалы и реактивы

Гелий с чистотой 99,99 % по ТУ 51-940-80,  
Целит С-22, целит 545, или хромотон, или хромосорб с зернением 80 – 100 меш (0,20 – 0,25 мм),

Полиэтиленгликоль 1500 (ПЭГ-1500),

Серебра нитрат «ХЧ»,

Натрия гидрат окиси «ХЧ»,

Натрия сульфат безводный «ХЧ»,

Натрия нитрит «ХЧ»,

Трихлоруксусная кислота «ЧДА» или «ХЧ»,

Водный раствор аммиака, 10%,

Формальдегид (40 % раствор),

Хлороформ (перегнанный),

Пропанол «ОСЧ»,

Едкое кали «ХЧ»,

Этиловый спирт с концентрацией этанола не менее 75%.

Квалификация используемых реактивов должна быть не ниже «ЧДА», если не указано иное. Для всех веществ типа «ОСЧ», «ХЧ» и «ЧДА» содержание основного вещества не менее 99%. Погрешность установления концентрации с вероятностью 0,95 не превышает 1%.

3.5. Допускается использовать другие средства измерений и устройства, которые не уступают по своим характеристикам средствам измерений и устройствам, приведенным в п.п. 3.1. и 3.2.

3.5.1. Чувствительность хроматографического комплекса для этилового спирта должна составлять 0,05 ‰.

3.5.2. Допускается использовать другую аттестованную систему регистрации и обработки данных со следующими минимальными требованиями:

24-разрядный аналого-цифровой преобразователь с частотой измерения не менее 20 Гц,

площадь  $S$  под пиком определяется отношением суммы измеренных сигналов напряжения  $U_i$  (или тока  $I_i$ ) в промежутке от начала до конца пика к частоте  $f$  измерения:

$$S = \frac{1}{f} \cdot \sum_{i=1}^n U_i, \quad (1)$$

относительная погрешность измерения площади под пиком в рабочем диапазоне концентраций не превышает 1 %,

площади  $S_1$ ,  $S_2$  двух не полностью разрешённых пиков определяются по методу перпендикуляра, то есть границей между пиками служит перпендикуляр, проведенный из самой низкой точки разделения к нулевой линии:

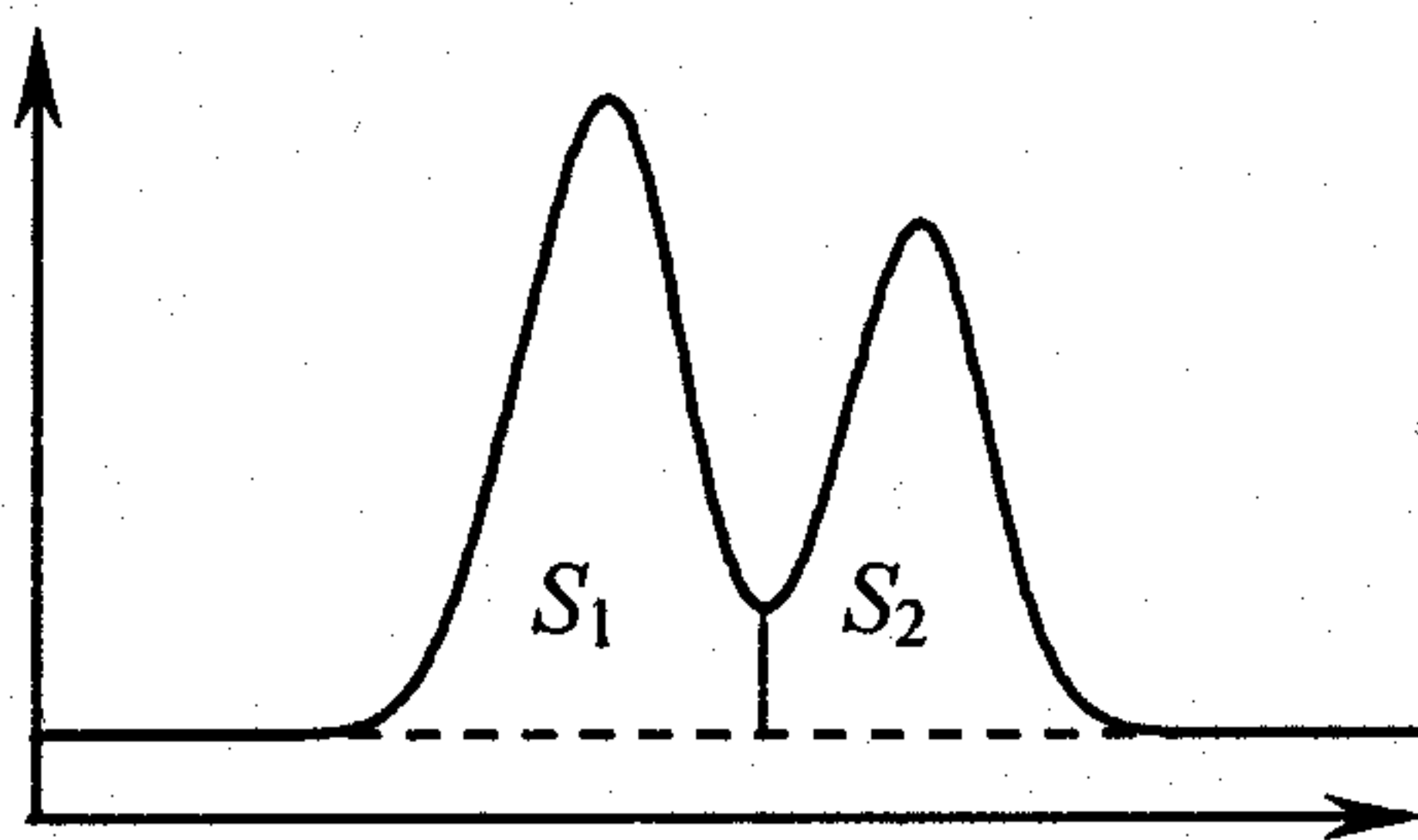


Рис. 1. Расчёт площади не полностью разрешённых пиков по методу перпендикуляра, идентификация компонентов смеси по абсолютным и (или) относительным временам удерживания,

расчёт концентрации по методу внутреннего стандарта в соответствии с п.10.

3.5.3. Допускается использовать другие колонки с ПЭГ-1500 и с номинальными размерами, указанными в п.3.2., которые удовлетворяют критериям, указанным в приложении 2, по эффективности, разрешающей способности и полярности.

3.6. Допускается использовать вместо пропанола изопропанол «ОСЧ» при соблюдении условий, указанных в приложении 2.

#### 4. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Сущность метода заключается в превращении этилового и пропилового спиртов, содержащихся в пробе, в алкилнитриты, более летучие, чем спирты, и в дальнейшем хроматографировании алкилнитритов. Проба в виде парогазовой фазы вводится в хроматограф. Разделённые на хроматографической колонке компоненты смеси последовательно поступают в детектор по теплопроводности, сигналы которого регистрируются и обрабатываются регистрирующей системой, которая обнаруживает пики, определяет площади под ними и идентифицирует их путём сравнения параметров удерживания с табличными параметрами. Расчёт концентрации этилового спирта производят после калибровки по методу внутреннего стандарта. Внутренним стандартом служит пропиловый спирт.

#### 5. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении измерений соблюдают следующие требования безопасности:

Правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.007-76 и ГОСТ 12.1.004-91;

Правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок, 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Энергоатомиздат, 1986 г. - 144 с; ил;

Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением (МНПАГПАН - 5.01.98) Минск, "Асобны Дах" 1998 г.;

правила эксплуатации газового хроматографа "3700" в соответствии с ДАХ1.550.017-01 РЭ, правила эксплуатации системы регистрации и обработки хроматографической информации "ЮниХром" в соответствии с ТУ РБ 14597800.001-98.

#### 6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих высшее или среднее специальное химическое или медицинское образование, изучивших требования безопасности и настоящую методику.

#### 7. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

температура воздуха  $20 \pm 5$  °С,

атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа (630 – 800 мм рт. ст.),

влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С,

электропитание в соответствии с паспортом хроматографа и системы регистрации.

#### 8. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы:

##### 8.1. Готовят измерительную аппаратуру

8.1.1. Готовят колонку в соответствии с приложением 1, устанавливают её в хроматограф и проверяют полученную систему на герметичность. При обнаружении утечек затягивают или заменяют фитинги.

8.1.2. Подключают к хроматографу, включают и настраивают систему регистрации в соответствии с техническим описанием и инструкцией по эксплуатации на неё.

8.1.3. Включают хроматограф и выводят его на режим в соответствии с техническим описанием и инструкцией по эксплуатации на него.

8.1.4. Задают оптимальные условия анализа, приведенные в таблице 2.

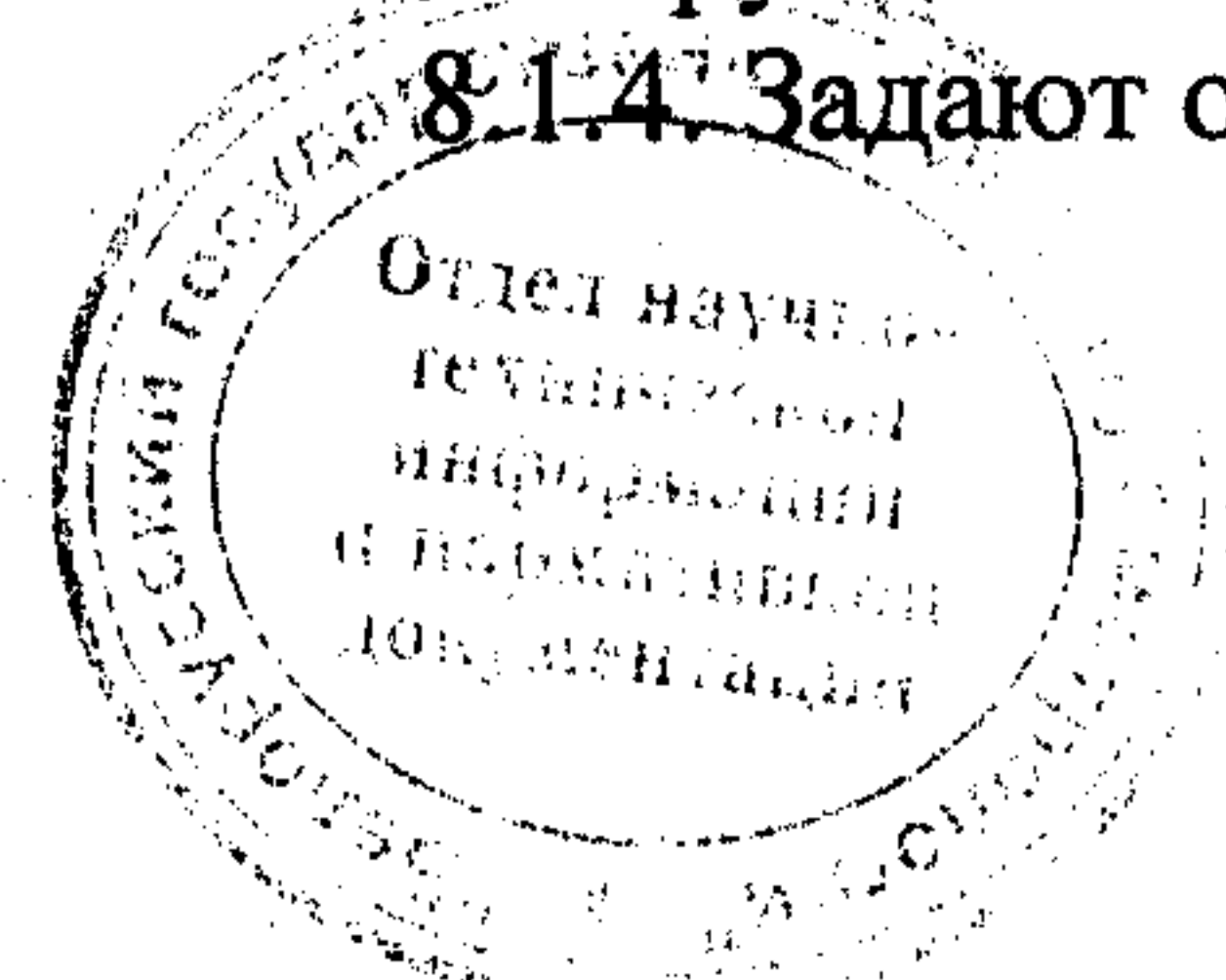


Таблица 2. Оптимальные условия анализа.

Температура термостата колонки:

Начальная температура	60 °С
Программирование температуры	Нет
Инжектор:	
Температура	70 °С
Объём вводимой пробы	0,5 мл
Детектор:	
Тип	Детектор по теплопроводности
Температура	100 °С
Газ-носитель	
Тип	Гелий
Расход через колонку при 60 °С	24 мл/мин

8.2. Оценивают эффективность колонки и корректируют условия анализа в соответствии с приложением 2.

8.3. Калибруют прибор в соответствии с приложением 4.

8.4. Выполняют контроль погрешности в соответствии с п.12. МВИ.

## 9. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений содержания этанола в жидких биологических средах выполняют следующие операции:

9.1. Измерение без внесения внутреннего стандарта (первое измерение).

9.1.1. Во флакон из-под пенициллина (в дальнейшем - просто флакон) вносят 0,5 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты, после чего - 0,5 мл исследуемой пробы. Флакон закрывают резиновой пробкой и фиксируют алюминиевым колпачком с помощью прибора для обжима флаконов, перемешивают.

9.1.2. После перемешивания за минуту до начала измерения во флакон шприцем вводят 0,3 мл 50% раствора нитрита натрия. Содержимое флакона встряхивают (30 маятникообразных движений) и оставляют на 1 минуту.

9.1.3. Из флакона шприцем путём прокола пробки отбирают 0,5 мл парогазовой фазы, вводят в хроматограф и начинают анализ, то есть переводят систему регистрации в режим сбора данных.

9.1.4. Регистрируют хроматограмму, расставляют пики, определяют площади под ними и записывают времена удерживания компонентов.

9.1.5. Визуальным сравнением измеренной хроматограммы с хроматограммой, приведенной в приложении 5, идентифицируют пики этилнитрита и пропилнитрита.

9.1.6. При отсутствии пика этилнитрита констатируют отсутствие этанола в пробе, иначе измеряют площадь пика этилнитрита (в дальнейшем  $S_{11}$ ).

9.1.7. При отсутствии пика пропилнитрита его площадь принимают равной 0, иначе измеряют его площадь (в дальнейшем  $S_{12}$ ).

9.2. Измерение с внутренним стандартом (второе измерение).

Второе измерение не проводится, если первое измерение не показало присутствие этанола в пробе.

9.2.1. Во флакон вносят 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты. В другом флаконе смешивается 2 мл исследуемой пробы и 2 мл 0,4% раствора пропанола. Из этого флакона отбирается 1 мл смеси и переносится во флакон с трихлоруксусной кислотой. Флакон закрывают резиновой пробкой и фиксируют алюминиевым колпачком с помощью прибора для обжима флаконов, перемешивают.

9.2.2. Выполняют п.п.9.1.2. - 9.1.5.

9.2.3. Измеряют площади пиков этилнитрита (в дальнейшем  $S_{21}$ ) и пропилнитрита (в дальнейшем  $S_{22}$ ).

Одесский национальный университет  
Институт биологии  
Лаборатория биохимии  
и молекулярной биологии

9.3. Рассчитывают концентрацию этанола по формуле 2 или 2а.

9.4. За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных измерений. Расхождение между результатами параллельных измерений при доверительной вероятности 0,95 не должны превышать  $1,96 \cdot \sigma_{cx} [\Delta]$ .

9.5. После проведения серии из 10-15 измерений, но не реже, чем через 1 час, и после окончания измерений устанавливают температуру термостата колонок 95°C на 15-20 мин. для удаления из колонки воды. После чего, при необходимости продолжения измерений, вновь устанавливают оптимальную температуру в термостате (60°C).

## 10. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Концентрация этилового спирта в исследуемой пробе, в ‰ определяется по формуле

$$C = \alpha \cdot f / \left[ \frac{S_{22}}{S_{21}} - \frac{S_{12}}{S_{11}} \right], \quad (2)$$

или по

$$C = \alpha \cdot f \cdot \frac{S_{21}}{S_{22}}, \quad (2a)$$

если  $S_{12} = 0$ .

где:

$f$  - фактор чувствительности, вычисленный в соответствии с приложением 4,

$S_{11}, S_{12}, S_{21}, S_{22}$  - определены в пунктах 9.1 и 9.2,

$\alpha$  - безразмерный коэффициент пересчёта: для крови равно 0,95, для мочи - 1,05, для слюны или других водных растворов - 1,0 приведённый в соответствии с [13.11].

## 11. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Результаты измерений оформляют протоколом, форма которого приведена в приложении 6.

## 12. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ

12.1. Контроль погрешности определения содержания этанола в биологических средах проводят каждый раз перед измерениями в соответствии с п. 4.11.1. МИ 2335-95. Средствами контроля служат аттестованные растворы этилового спирта по приложению 3 с концентрациями 0,1‰, 1‰ и 6‰. При расчёте коэффициент пересчёта принимают равным 1,0. Контрольное измерение признают удовлетворительным, если для всех растворов модуль разности измеренного и истинного значения концентрации не превосходит абсолютной погрешности измерения.

12.2. Если точность контрольных измерений признана неудовлетворительной, выясняют причины и устраняют их.

## 13. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

13.1. ГОСТ 8.010-90 Методики выполнения измерений.

13.2. МИ 2334 Смеси аттестованные. Общие требования к разработке.

13.3. МИ 2335 Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

13.4. МИ 2336 Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания.

13.5. ГОСТ 1770 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.

13.6. ГОСТ 17433 Промышленная чистота. Сжатый воздух. Классы загрязнённости.

13.7. ГОСТ 18481 Ареометры и цилиндры стеклянные.

13.8. ГОСТ 24104 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические

условия.

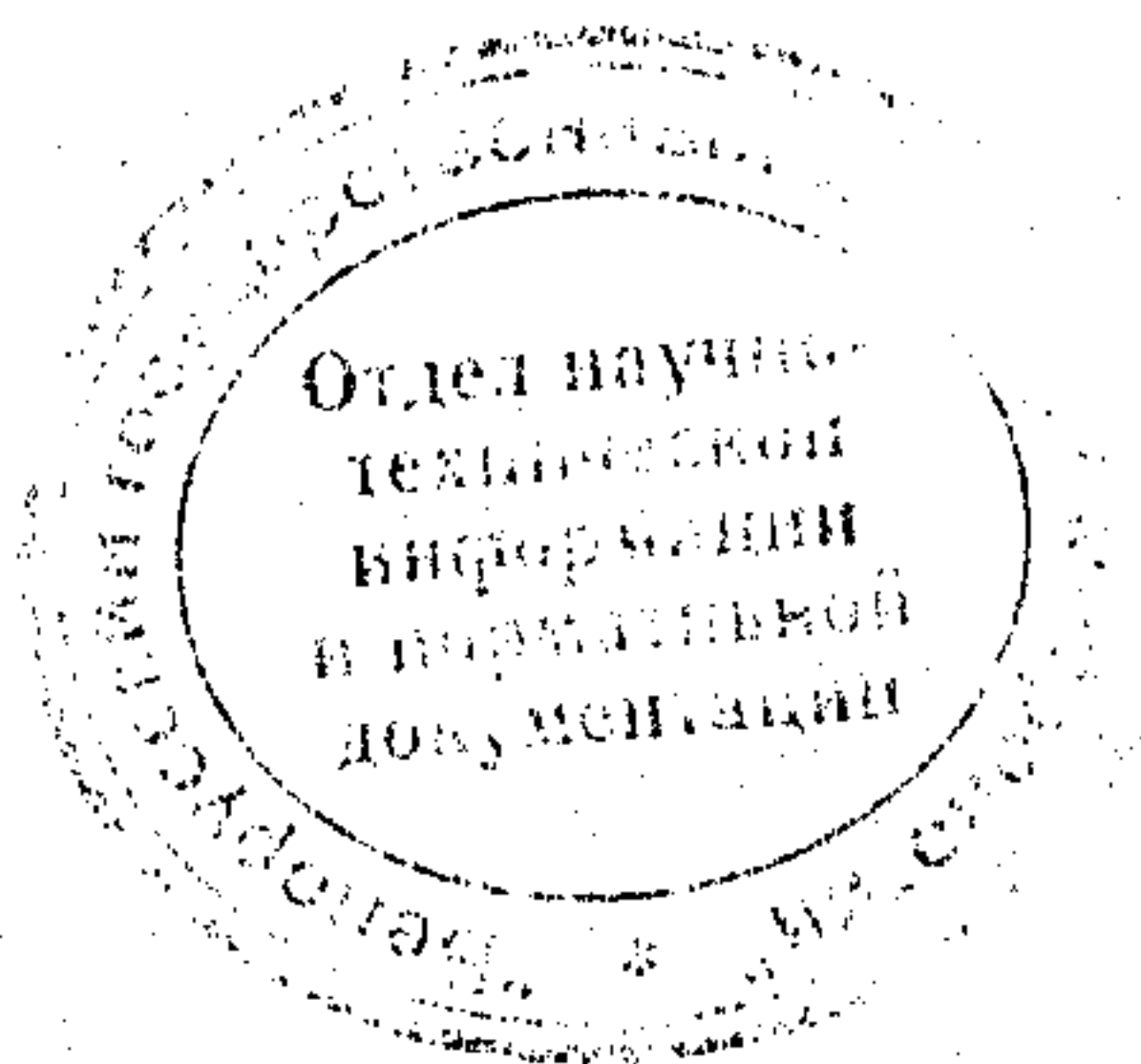
Сдел научн  
технической  
информации  
и нормативной  
документации

13.9. ГОСТ 29227 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

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

13.11. Методические указания. Медицинское освидетельствование для установления факта употребления алкоголя и состояния опьянения. Министерство здравоохранения СССР, 1988.

13.12. Государственная фармакопея СССР. Десятое издание. Таблицы для определения содержания этилового спирта в водно-спиртовых растворах. Стр. 1005-1014. М., Издательство "Медицина", 1968.





ПРИЛОЖЕНИЕ 1  
(ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ)

ПОДГОТОВКА КОЛОНКИ

Подготовка твёрдого носителя.

В качестве твёрдого носителя можно использовать любые вещества на основе кизельгура (целиты, хромосорб, хроматон, цветохром и т. п.) с размером частиц 0,20 - 0,25 мм, предварительно модифицированные слоем металлического серебра.

Модификация металлическим серебром проводится в следующем порядке: 0,2 г нитрата серебра растворяют в 0,5 мл воды и добавляют 25 мл этанола. Раствор переносят в круглодонную колбу со шлифом и к раствору добавляют 10 г твёрдого носителя. Колбу присоединяют к вакуумному насосу на 25-30 мин. Затем колбу помещают на водяную баню (80-90°C) и отгоняют 10-15 мл спирта. Колбу снимают с бани и отсоединяют от вакуумного насоса. При постоянном перемешивании в колбу вносят 5 мл 10% раствора аммиака. Колбу подсоединяют на 15-20 мин. к вакуумному насосу. После отключения насоса в колбу вносят 3 мл 40% раствора формальдегида, перемешивают и помещают на 5 мин. в водяную баню при постоянном перемешивании. Затем твёрдый носитель промывают декантацией горячей дистиллированной водой до нейтральной реакции, затем свежеприготовленным 1% раствором едкого калия, и раствору дают свободно стечь. После этого твёрдый носитель сушат при 90-95°C досуха, а затем прокаливают 3 часа при 150±5°C.

Приготовленный твёрдый носитель сохраняют в склянках с притёртой пробкой.

Примечание: перемешивание твёрдого носителя осуществляется только с помощью шейкера или вращением колбы, применение стеклянных палочек или мешалок недопустимо.

Нанесение неподвижной фазы.

В фарфоровой чашке для выпаривания растворяют 1 г полиэтиленгликоля-1500 в 20 мл перегнанного хлороформа и в раствор вносят 10 г подготовленного твёрдого носителя. Содержимое перемешивают покачиванием в течение 8-10 мин. и чашку помещают на водяную баню с температурой 60-65°C при постоянном перемешивании до полного удаления растворителя и отсутствия запаха хлороформа.

Подготовку твёрдого носителя и нанесение неподвижной фазы можно проводить с использованием ротационного испарителя.

Заполнение и кондиционирование колонок.

Перед кондиционированием с помощью бюретки с дистиллированной водой измеряют объём колонки или рассчитывают его по формуле:

$$V = \frac{\pi \cdot D^2 L}{4},$$

где:

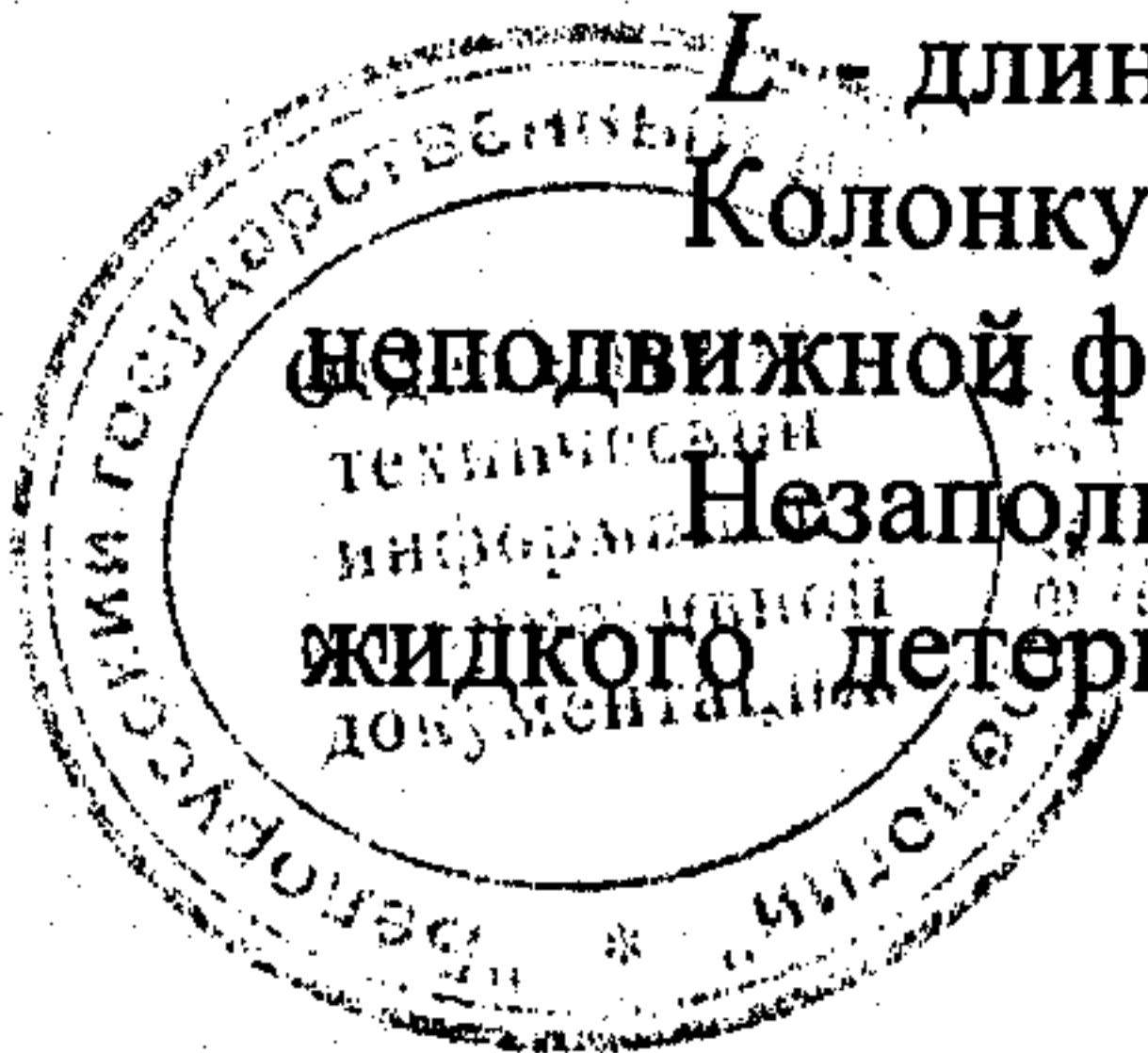
$V$  - объём колонки,

$D$  - диаметр колонки,

$L$  - длина колонки.

Колонку снабжают биркой с указанием объёма колонки, наименования твёрдого носителя, неподвижной фазы и даты заполнения.

Незаполненные хроматографические колонки предварительно промывают раствором жидкого детергента, ополаскивают дистиллированной водой, промывают спиртом, эфиром и

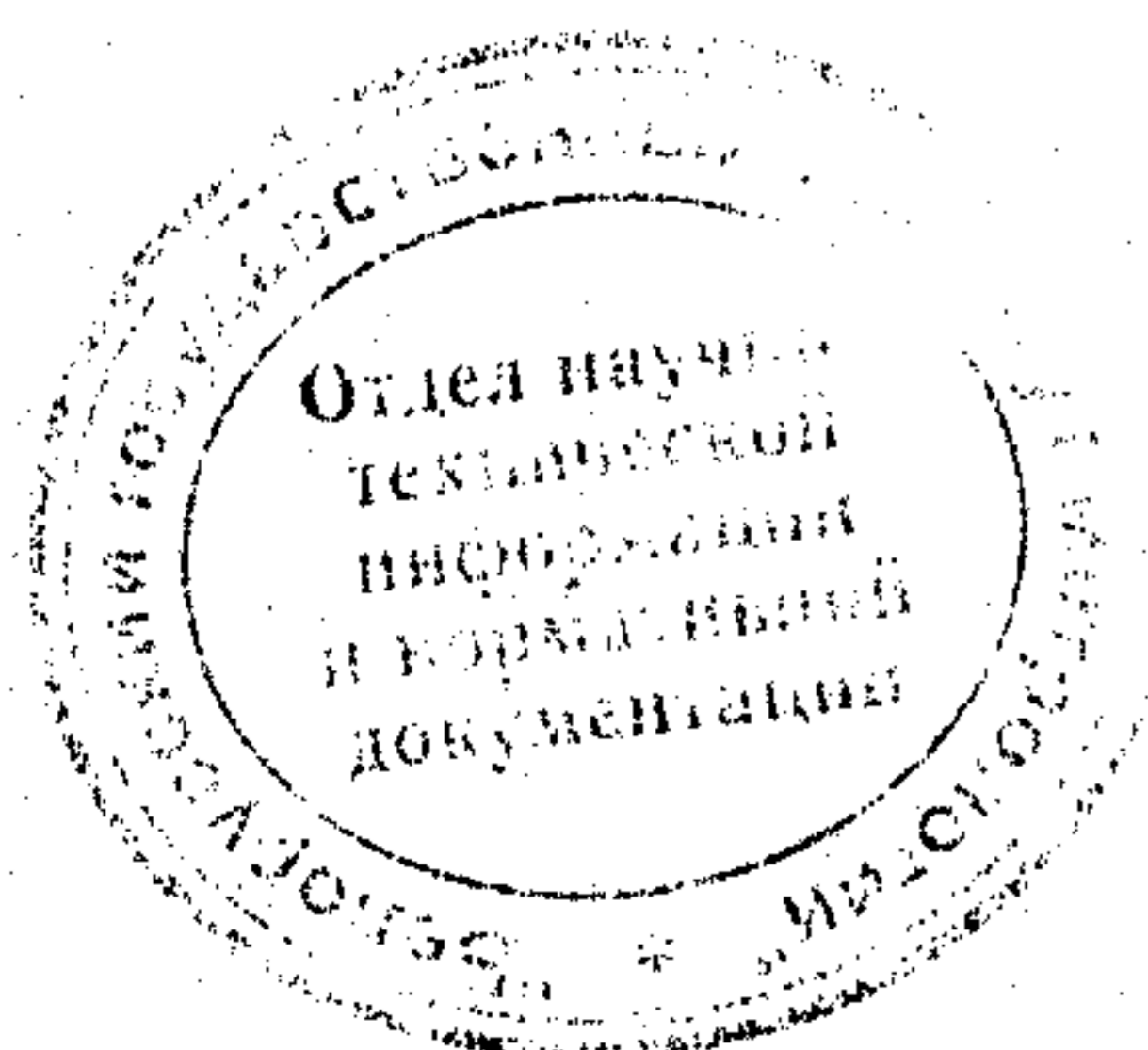


хлороформом перегнанным (соблюдать порядок промывки), продувают воздухом и прокаливают в сушильном шкафу при 200-250°C в токе инертного газа в течении 2 часов.

Новые колонки необходимо после прокаливания установить в прибор, включить газ-носитель и проверить герметичность соединений.

Заполняют колонку "под иглу" точно измеренным количеством наполнителя (твёрдый носитель с нанесённой неподвижной фазой). Заполненную колонку подсоединяют к блоку ввода пробы, оставляя свободным второй конец, устанавливают поток газа-носителя 24 мл/мин., проверяют герметичность и термостатируют, повышая температуру от 50°C до 95°C ступенчато - на 10°C каждый час. После чего устанавливают температуру 90°C и кондиционируют 24 часа. Только после кондиционирования отключают термостат, охлаждают до комнатной температуры и подсоединяют колонку к детектору.

Подготовленная по описанной выше методике колонка работоспособна более одного года при условии соблюдения температурного режима (не выше 95°C) и чистоты газа-носителя. Необходимо также избегать перегрузки колонок большим количеством исследуемой пробы (не более 1 см<sup>3</sup> парогазовой фазы или 5 мкл жидкой пробы).



ПРИЛОЖЕНИЕ 2  
(ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ)

ПРОВЕРКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОЛОНКИ

Проверка эффективности колонки производится с помощью контрольных растворов этилового спирта и пропанола. В качестве контрольных растворов (стандартов) используют 1% водный раствор этанола и 0,4% водный раствор пропанола, приготовленные в соответствии с приложением 3.

Во флакон из-под пенициллина, содержащий 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты вносят 0,5 мл 0,4% раствора пропанола и 0,5 мл 1% этанола, флакон закрывают стандартной пробкой, которую фиксируют приспособлением для обжима колпачков на флаконах. Содержимое флакона перемешивают, и во флакон шприцем вводят 0,3 мл раствора нитрита натрия. Флакон энергично встряхивают (30 маятникообразных движений) и оставляют на 1 минуту. После чего из флакона шприцем путём прокола пробки отбирают 0,5 см<sup>3</sup> парогазовой фазы, которую вводят в прибор.

На хроматограмме измеряют время выхода и ширину на половине высоты пиков и вычисляют критерий разделения по формуле:

$$K = \frac{t_2 - t_1}{b_1 + b_2}, \quad \text{или} \quad R = \frac{K}{0,8495},$$

где

$t$  - время удерживания пика,

$b$  - ширина пика на половине высоты,

индексы 1 и 2 относятся к пикам этил- и пропилнитрита соответственно.

Значение  $R$  должно быть не менее 1,06 ( $K$  не менее 0,9 соответственно). Если это условие не выполняется, то необходимо вариацией температуры термостата колонок и скорости потока газа-носителя повысить эффективность.

Эффективность колонок оценивают величинами "число теоретических тарелок" (ЧТТ -  $N$ ) или "высота, эквивалентная теоретической тарелке" (ВЭТТ -  $H$ ) для пика этилнитрита:

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t}{b}\right)^2, \quad H = \frac{L}{N};$$

где  $L$  - длина колонки.

Величина ЧТТ для колонок ПЭГ-1500 длиной 2 м должна быть не менее 250 (ВЭТТ не более 8 мм соответственно).

В процессе работы необходимо периодически один раз в неделю проверять эффективность колонок по приведённой выше методике.



ПРИЛОЖЕНИЕ 3  
(ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ)

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ  
РЕАКТИВОВ И КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая методика регламентирует приготовление растворов нитрита натрия, трихлоруксусной кислоты и этанола, аттестованных на массовую концентрацию и пропанола, аттестованных на объёмную концентрацию.

2. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При приготовлении реактивов и контрольных растворов устанавливают следующие метрологические характеристики концентраций веществ:

значение аттестованной характеристики  $X$ ,

границы абсолютной погрешности  $\Delta_x$  значения аттестованной характеристики при доверительной вероятности 0,95.

Таблица 1

Наименование аттестованной характеристики	$X$	$\Delta_x$ не более
Содержание нитрита натрия, г/л	298,5	$\pm 1,6$
Содержание трихлоруксусной кислоты, г/л	498	$\pm 3$
Объёмная концентрация пропанола, об %	0,398	$\pm 0,007$
Массовая концентрация этанола в 1% растворе, мас %	1,000	$\pm 0,017$
Содержание этанола в контрольных растворах, ‰	0,100	$\pm 0,002$
	0,300	$\pm 0,007$
	1,00	$\pm 0,02$
	2,00	$\pm 0,04$
	4,00	$\pm 0,07$
	6,00	$\pm 0,11$

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

При приготовлении реактивов и контрольных растворов используют средства измерения, вспомогательные устройства, реактивы и материалы из перечня п.3. МВИ.

4. ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

4.1. Температура окружающей среды на момент приготовления смеси должна составлять  $20 \pm 2$  °С.

4.2. Приготовление раствора нитрита натрия.

На весах взвешивают 30 г. нитрита натрия. Переносят в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до 100 мл.

4.3. Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты.

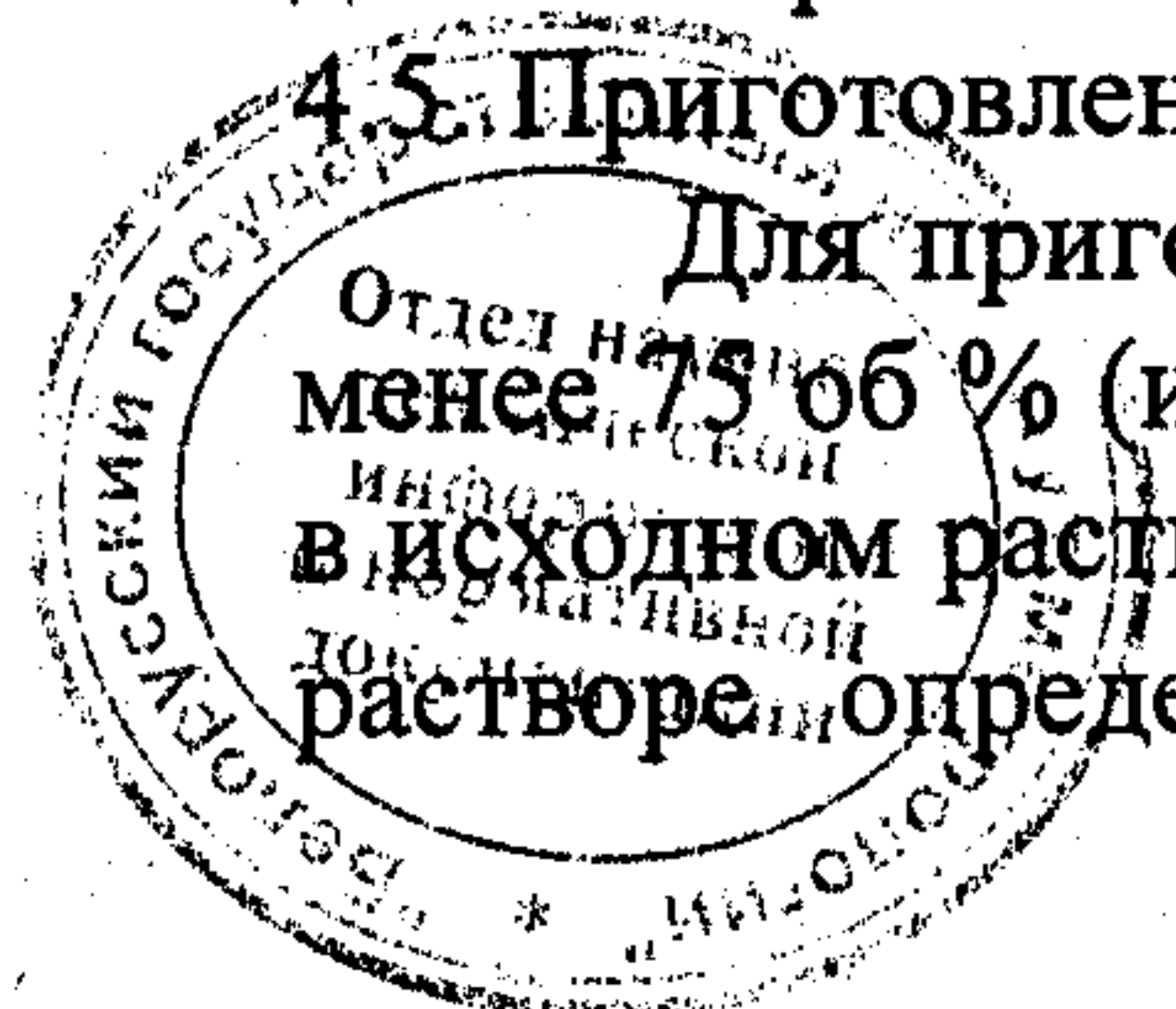
На весах взвешивают 50 г. трихлоруксусной кислоты. Переносят в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до 100 мл.

4.4. Приготовление раствора пропанола.

Пипеткой объёмом 1 мл переносят 0,4 мл пропанола в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

4.5. Приготовление 1% раствора этанола.

Для приготовления раствора берут этиловый спирт с объёмной концентрацией этанола не менее 75 об % (исходный раствор). Далее ареометром измеряют объёмную концентрацию этанола в исходном растворе  $X_0$ . Из таблиц [п.13.12 МВИ] по объёмной концентрации этанола в исходном растворе определяют массовую концентрацию  $C_0$  и плотность раствора  $\rho_0$ . По массовой



концентрации  $C_1 = 1\%$  определяют плотность 1% раствора этанола  $\rho_1 = 0,9964$ . Рассчитывают объём исходного раствора  $V_0$ , необходимый для приготовления 1% раствора этанола в объёме  $V_1 = 500$  мл по формуле:

$$V_0 = V_1 \cdot \frac{\rho_1 C_1}{\rho_0 C_0} \quad (1)$$

Используя пипетку вместимостью 10 мл, переносят рассчитанный объём  $V_0$  исходного раствора в колбу и доводят дистиллированной водой до 500 мл.

4.6. Приготовление 0,1%, 0,3%, 1%, 2%, 4% и 6% растворов этанола.

Для приготовления растворов в соответствии с нижеприведённой таблицей указанной пипеткой переносят указанный объём 1% раствора этанола по п.4.5. в мерную колбу ёмкостью 50 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Таблица 2

Приготавливаемая концентрация, ‰	Объём исходного раствора, мл	Ёмкость пипетки, мл
0,1	0,5	1
0,3	1,5	2
1	5	5
2	10	10
4	20	10*
6	30	10**

\* Раствор переносят в два приёма по 10 мл каждый.

\*\* Раствор переносят в три приёма по 10 мл каждый.

## 5. РАСЧЁТ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

### 5.1. Расчёт характеристик раствора нитрита натрия

5.1.1. Аттестованное значение концентрации нитрита натрия рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{M \cdot \mu}{V}, \quad (2)$$

где

$M = 30,0$  г - масса реактива, определённая взвешиванием,

$\mu = 0,995$  - массовая доля основного вещества в реактиве,

$V = 100,0$  мл - объём приготовленного раствора.

Аттестованное значение концентрации нитрита натрия в растворе равно 298,5 г/л.

5.1.2. Абсолютную погрешность аттестованного значения концентрации нитрита натрия в растворе рассчитывают по формуле:

$$\Delta C = C \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta \mu}{\mu}\right)^2 + \left(\frac{\Delta M}{M}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V}{V}\right)^2}, \quad (3)$$

где

$\Delta \mu = 0,005$  – абсолютная погрешность массовой доли основного вещества в реактиве,

$\Delta M = 0,75$  мг – абсолютная погрешность взвешивания реактива,

$\Delta V = 0,2$  мл – абсолютная погрешность измерения объёма раствора мерной колбой.

Абсолютная погрешность аттестованного значения концентрации нитрита натрия в растворе не превышает 1,6 г/л.

### 5.2. Расчёт характеристик раствора трихлоруксусной кислоты

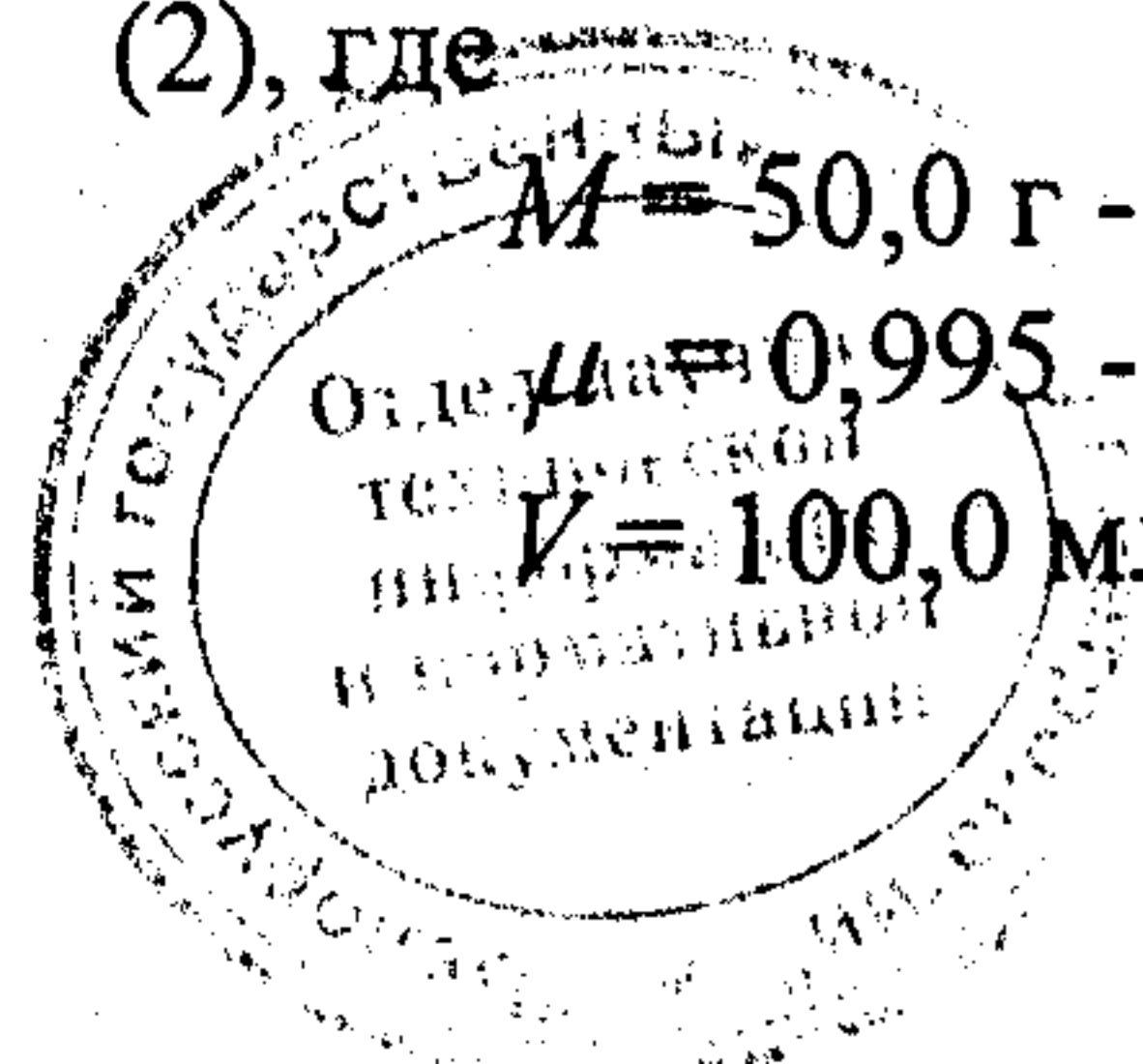
5.2.1. Аттестованное значение концентрации трихлоруксусной кислоты рассчитывают по формуле

(2), где

$M = 50,0$  г - масса реактива, определённая взвешиванием,

$\mu = 0,995$  - массовая доля основного вещества в реактиве,

$V = 100,0$  мл - объём приготовленного раствора.



Аттестованное значение концентрации нитрита натрия в растворе равно 498 г/л.

5.2.2. Абсолютную погрешность аттестованного значения концентрации трихлоруксусной кислоты в растворе рассчитывают по формуле (3), где

$\Delta\mu = 0,005$  – абсолютная погрешность массовой доли основного вещества в реактиве,

$\Delta M = 0,75$  мг – абсолютная погрешность взвешивания реактива,

$\Delta V = 0,2$  мл – абсолютная погрешность измерения объема раствора мерной колбой.

Абсолютная погрешность аттестованного значения концентрации трихлоруксусной кислоты в растворе не превышает 3 г/л.

5.3. Расчёт характеристик раствора пропанола

5.3.1. Аттестованное значение концентрации пропанола в растворе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot \chi}{V_2}, \quad (4)$$

где

$V_1 = 0,4$  мл - объём пропанола, отбираемого для приготовления раствора,

$\chi = 0,995$  - объёмная доля основного вещества в реактиве,

$V_2 = 100,0$  мл - объём приготовленного раствора.

Аттестованное значение концентрации пропанола в растворе равно 0,398 об. %.

5.3.2. Абсолютную погрешность аттестованного значения концентрации пропанола в растворе рассчитывают по формуле:

$$\Delta X = X \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta\chi}{\chi}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_2}{V_2}\right)^2}, \quad (5)$$

где

$\Delta\chi = 0,005$  – абсолютная погрешность объёмной доли основного вещества в реактиве,

$\Delta V_1 = 0,006$  мл – абсолютная погрешность отбора реактива пипеткой,

$\Delta V_2 = 0,20$  мл – абсолютная погрешность измерения объема раствора мерной колбой.

Абсолютная погрешность аттестованного значения концентрации пропанола в растворе не превышает 0,007 об. %.

5.4. Расчёт характеристик 1% раствора этанола

5.4.1. Аттестованное значение концентрации 1% раствора этанола  $C_1$  выражается из формулы (1):

$$C_1 = C_0 \cdot \frac{V_0 \rho_0}{V_1 \rho_1} \quad (6)$$

где

$C_0$  - массовая концентрация этанола в исходном растворе, определяемая из таблицы,

$V_0$  - объём исходного раствора, отбираемого для приготовления 1% раствора, рассчитываемый по формуле (1),

$V_1 = 500$  мл - объём приготовленного раствора,

$\rho_0$  - плотность исходного раствора, определяемая из таблицы,

$\rho_1$  - плотность приготовленного раствора, определяемая из таблицы.

5.4.2. Абсолютную погрешность аттестованного значения концентрации 1% раствора этанола рассчитывают по формуле:

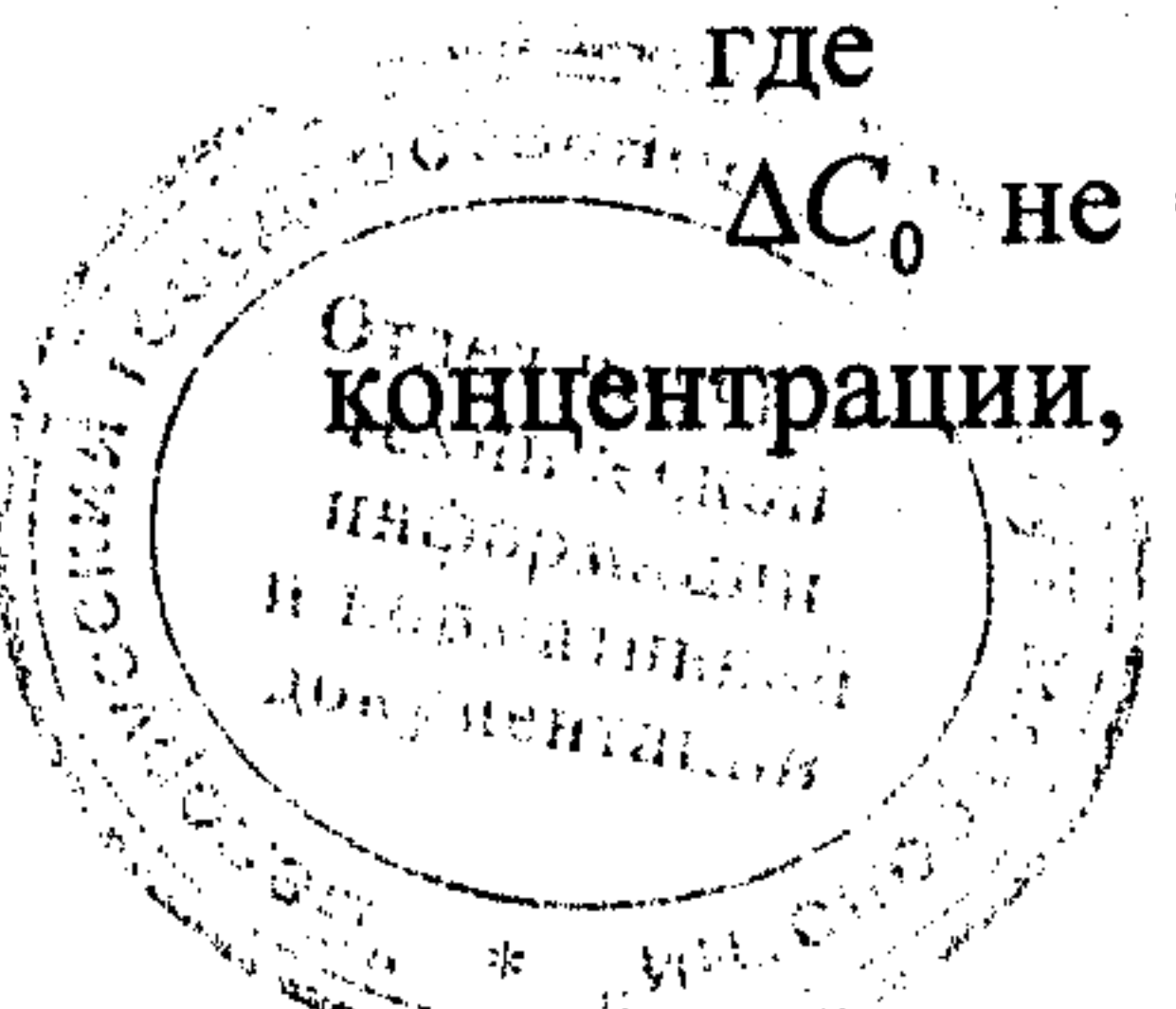
$$\Delta C_1 = C_1 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta C_0}{C_0}\right)_T^2 + \left(\frac{dC}{dX}\Big|_{X_0} \cdot \frac{\Delta X_0}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_0}{V_0}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \rho_0}{\rho_0}\right)_T^2 + \left(\frac{d\rho}{dX}\Big|_{X_0} \cdot \frac{\Delta X_0}{\rho_0}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \rho_1}{\rho_1}\right)_T^2}, \quad (7)$$

где

$\Delta C_0$  не более 0,05 мас % - абсолютная погрешность таблицы при определении массовой

концентрации,

информации  
и лаборатория  
документации



$\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X_0}$  не более 1,8 - первая производная зависимости массовой концентрации от объёмной,

определяемая из таблицы [п.13.12 МВИ],

$\Delta X_0 = 0,5$  об % - абсолютная погрешность измерения объёмной концентрации исходного раствора ареометром для спирта,

$\Delta V_0 = 0,05$  мл - абсолютная погрешность отбора пипеткой исходного раствора,

$\Delta V_1 = 0,50$  мл - абсолютная погрешность измерения объёма раствора мерной колбой,

$\Delta \rho_0 = 0,0001$  - абсолютная погрешность определения плотности исходного раствора из таблицы [п.13.12 МВИ].

$\left. \frac{d\rho}{dX} \right|_{X_0}$  не более 0,007 г/(см<sup>3</sup>·%) - первая производная зависимости плотности от объёмной

концентрации, определяемая из таблицы [п.13.12 МВИ],

$\Delta \rho_1 = 0,0001$  - абсолютная погрешность определения плотности 1% раствора из таблицы [п.13.12 МВИ].

Абсолютная погрешность аттестованного значения концентрации этанола в растворе не превышает 0,017 мас %.

#### 5.5. Расчёт характеристик 0,1‰, 0,3‰, 1‰, 2‰, 4‰, 6‰ растворов этанола

5.5.1. Аттестованное значение концентрации этанола  $C$  в растворах рассчитывают по формуле:

$$C = C_1 \cdot \frac{V_1}{V_2} \quad (8)$$

где

$C_1 = 1\%$  - концентрация исходного раствора по п.4.5. текущего приложения,

$V_1$  - объём исходного раствора по таблице 2,

$V_2 = 50$  мл - объём приготавливаемого раствора.

5.5.2. Абсолютную погрешность  $\Delta C$  аттестованного значения концентрации растворов этанола рассчитывают по формуле:

$$\Delta C = C \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta C_1}{C_1}\right)^2 + N \cdot \left(\frac{\Delta V_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_2}{V_2}\right)^2} \quad (9)$$

где

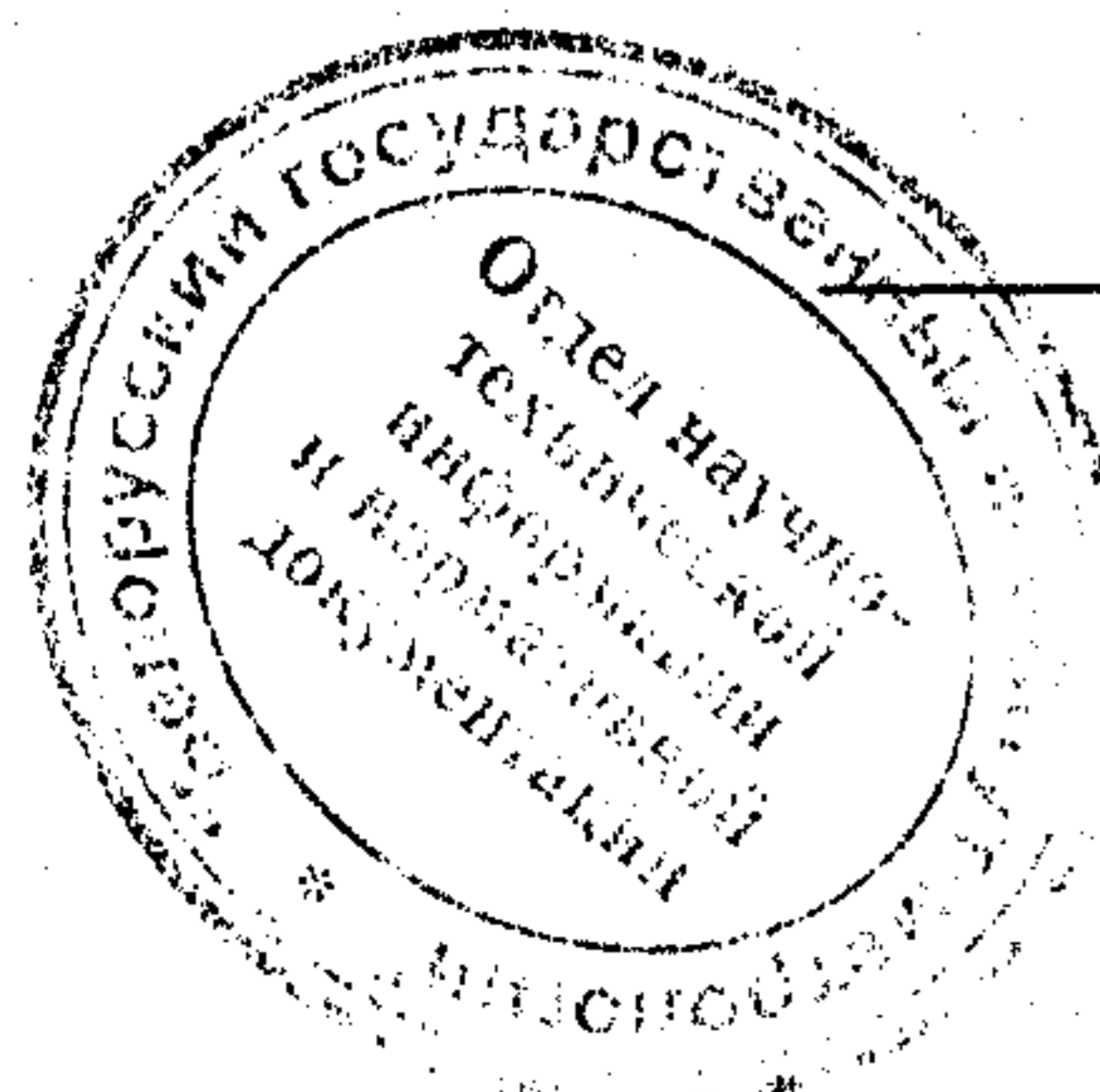
$\Delta C_1$  - абсолютная погрешность концентрации исходного раствора по п.5.4.,

$\Delta V_1$  - абсолютная погрешность измерения объёма исходного раствора по таблице 3,

$\Delta V_2 = 0,20$  мл - абсолютная погрешность измерения объёма раствора мерной колбой,

$N$  - количество операций внесения исходного раствора в колбу - равно 2 для 4 ‰ раствора, 3 для 6 ‰ раствора и 1 для остальных растворов.

Приготавливаемая концентрация, ‰	Погрешность измерения пипеткой, мл	Погрешность концентрации, не более, ‰
0,1	0,01	0,002
0,3	0,02	0,007
1	0,05	0,02
2	0,1	0,04
4	0,1	0,07
6	0,1	0,11



## 6. ТРЕБОВАНИЯ К МАРКИРОВКЕ

На склянки с аттестованными растворами должны быть наклеены этикетки с указанием наименования раствора, его концентрации и даты приготовления.

## 7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

7.1. Раствор нитрита натрия хранят в склянке из тёмного стекла с притёртой пробкой при температуре от 0°C до 5°C. Срок хранения 1 месяц.

7.2. Раствор трихлоруксусной кислоты хранят в склянке из тёмного стекла с притёртой пробкой при температуре от 0°C до 5°C. Срок хранения 1 месяц.

7.3. Раствор пропанола хранят в склянке с притёртой пробкой при температуре от 0°C до 5°C. Срок хранения до 5 суток.

7.4. Растворы этанола хранят в склянках с притёртой пробкой при температуре от 0°C до 5°C. Срок хранения до 5 суток.





ПРИЛОЖЕНИЕ 4  
(ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ)

ПРОВЕДЕНИЕ КАЛИБРОВКИ

Калибровка выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта хроматографа, замены колонки, или после длительного перерыва в измерениях (более 1 недели), а также, в случае, когда контроль погрешности измерения по п.12. МВИ признан неудовлетворительным.

Калибровка выполняется по методу внутреннего стандарта, используя для расчёта отношение площадей пика этилнитрита к пику пропилнитрита.

Для определения фактора чувствительности используются эталонные растворы этанола с концентрациями 1,0‰; 2,0‰; 4,0‰; 6,0‰ по приложению 3 МВИ, которые подвергаются газохроматографическому исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы в соответствии с п.9.2. МВИ.

Для каждой концентрации проводят 3 измерения.

Фактор чувствительности вычисляется по формуле:

$$f = \frac{\sum_{i=1}^N C_i \cdot \sum_{j=1}^M \frac{S_{2ij}}{S_{1ij}}}{N \cdot M},$$

где:

$N$  - количество эталонных растворов разной концентрации ( $N=4$ ).

$M$  - количество измерений каждого раствора ( $M=3$ ).

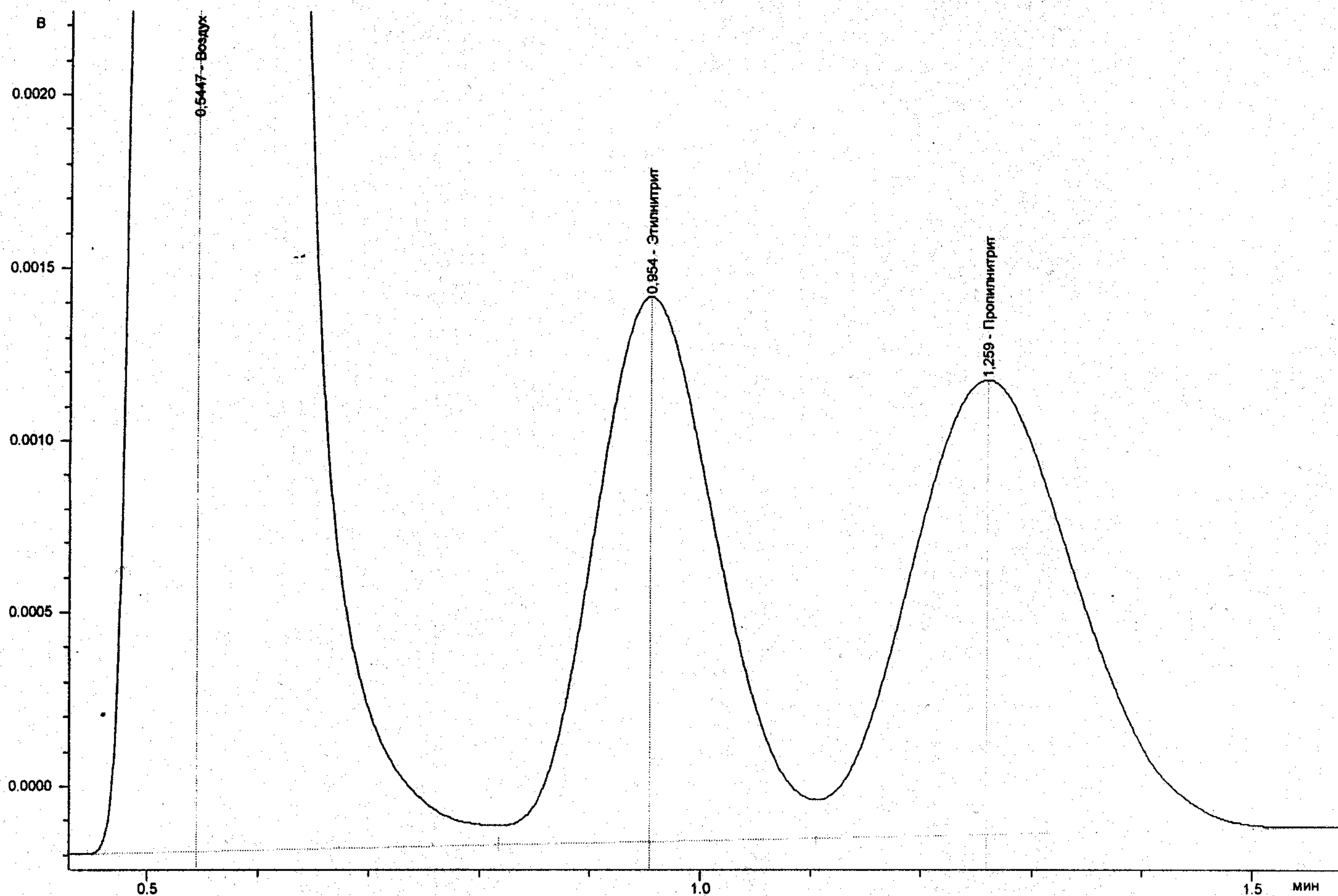
$C_i$  - концентрация этанола в  $i$ -том эталонном растворе (1,0‰; 2,0‰; 4,0‰; 6,0‰),

$S_{1ij}, S_{2ij}$  - площадь под пиком этилнитрита и пропилнитрита соответственно на хроматограмме  $j$ -го измерения  $i$ -го раствора.



ПРИЛОЖЕНИЕ 5  
(ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ)

ПРИМЕР ХРОМАТОГРАММЫ И ПОРЯДОК ВЫХОДА КОМПОНЕНТОВ



Имя пика	Время выхода, мин
Этилнитрит	0,95
Пропилнитрит	1,26

Хроматограмма получена в соответствии с п. 9.2 МВИ. При проведении измерения времена выхода компонентов могут отличаться от указанных при сохранении порядка выхода.



ПРИЛОЖЕНИЕ 6  
(РЕКОМЕНДУЕМОЕ)

ФОРМА ПРОТОКОЛА АНАЛИЗА

\_\_\_\_\_  
Название организации

\_\_\_\_\_  
Лаборатория

Протокол анализа содержания этилового спирта в \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

1. Измерения выполнены в соответствии с МВИ \_\_\_\_\_ "Методика газохроматографического определения этилового спирта в жидких биологических средах".
2. Качественный анализ пробы (без добавления внутреннего стандарта)

\_\_\_\_\_  
Хроматограммы пробы без добавления внутреннего стандарта

3. Количественный анализ (с добавлением внутреннего стандарта)

\_\_\_\_\_  
Хроматограммы пробы со внутренним стандартом

4. Результаты измерений

Название вещества	Время выхода, мин	Концентрация	Границы абс. погрешности
Этанол	...	... %	± ... %
Пропанол (внутр. стандарт)	...	... об. %	± 0,007 об. %

Анализ провёл \_\_\_\_\_

