

# QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETHANOL IN BIOLOGICAL FLUIDS BY MEANS OF GAS CHROMATOGRAPHY (GC) FOR DIAGNOSIS OF ACUTE INTOXICATION AND FOR EVIDENTIAL PURPOSES

Hanna BRYGIERT

*Regional Centre of Industrial Medicine, Toruń*

Bogusław BUSZEWSKI

*Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Toruń*

**ABSTRACT:** In the presented work an analytical method for the quantitative determination of ethyl alcohol in body fluids with the use of the GC technique was described. A statistical evaluation of selected analytical factors of this method was presented. The described analytical method proved to be useful both in laboratory diagnosis of acute intoxication and for evidential purposes.

**KEYWORDS:** Ethyl alcohol; Biological fluids; Gas chromatography; Acute intoxication; Evidential purposes; Method evaluation function.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XXXIX, 1999, 20–43*

*Received 4 January 1999; accepted 23 March 1999*

## INTRODUCTION

Ethanol is a strong metabolic toxin particularly strongly affecting the cells of the central nervous system. The kinetics of absorption and excretion as well as the metabolic transformation of ethanol are well known [5, 6, 8]. The number of acute poisonings with ethanol, which may cause rapid death, is increasing at an alarming rate [4]. During the treatment of people intoxicated with ethanol whose life is endangered, continuous screening of the level of this compound in blood ought to be carried out. In cases where acute intoxication with ethanol is suspected as well as in the differential diagnosis of states of unconsciousness, an obstacle to proper treatment can be the lack of facilities for carrying out a quick and reliable determination of ethyl alcohol in blood.

A state of inebriation is determined in Poland on the basis of the concentration of ethanol in blood and in exhaled air. Since 1995 testing for inebriation has been carried out by ten police laboratories designated by the Central Forensic Laboratory of the Police, Warsaw [1, 7].

Chemical and toxicological determination of the concentration of ethanol in blood can be performed using one of the following techniques [5]:

- gas chromatography (GC),
- an enzymatic method using alcohol dehydrogenation (ADH),
- a Widmark micro-chemical method.

In some laboratories a radiative energy attenuation (REA) method [10] is used for determination of ethanol in biological fluids (full blood, serum, plasma and urea). According to suggestions accepted at the Regional Conference on Alcoholology (Kraków-Przegorzały, 15–16 December 1992) [3], the Widmark method (which is non-specific) should be treated only as a screening method and each positive result should be confirmed with a technique of higher specificity, e.g. GC or ADH. Gas chromatography was chosen for the analysis of volatile organic compounds (including ethanol) because of its high selectivity, sensitivity, precision and accuracy, and also its speed and the low costs of analysis. For evidential purposes some modifications of this method, e.g. apparatus modernisation, are permissible, however the predominant condition of the usefulness of such an analytical method is that the total error should not exceed  $\pm 0,06\%$  in the required range of concentrations [3, 5].

Nowadays, the determination of ethanol in body fluids is one of the most often performed analyses in the case of people hospitalised because of acute exogenic intoxication. It might be possible that due to reforms of the national health service, a lack of financial resources will force physicians to limit this type of analysis. This could then create an increased risk to the lives of the patients.

The authors of this publication have had more than ten years' experience in the quantitative determination of ethanol for diagnosis of acute intoxication and evidential purposes: this has motivated them to describe the analytical procedure which has proved useful in both these cases.

## EXPERIMENTAL

### Modifications of the method

The method of alcohol analysis in blood and other body fluids by means of the gas chromatography technique, as was described in instruction [5], was modified by refilling the chromatographic column with Propak Q, 80–100 mesh instead of 20% Carbowax 1000 on Chromosorb W, 100–120 mesh, and changing the length of the column from 1.5 m to 1 m. Moreover, the temperature of the column was increased from 70°C to 120°C and a pre-column was added, which allowed a continuous mode of work of the system instead of the direct injection of samples of biological materials into the injector. The validation of analytical parameters of the method was performed.

### Principles of measurement

A version of the quantitative analysis with an internal standard was applied. Ethanol and 2-methylpropanol-2 (used as the internal standard) were separated in the chromatographic column filled by an active solid. The concentration of ethanol was calculated from the ratio of the ethanol peak area to that of the internal standard (2-methylpropanol-2). A calibration was performed in a working, linear, range of concentrations and then parameters of the linear regression describing the dependence between the relative area of the ethanol signal (i.e. the ratio of the area of the ethanol signal to the area of the internal standard signal) and the concentration of ethanol were calculated.

### Equipment and the conditions of measurements

A gas chromatograph N-504 (made by Mera-Elwro, Wrocław, Poland) with an FID detector and a microprocessor system of data processing (Akord, Gdańsk, Poland, version 3.0) were used. The chamber of the injector was modified by drilling in and placing a boron-silicon glass capillary (100 x 1.5 mm) inside, in front of the glass analytical column. The capillary was exchanged after every 10 injections of samples of biological materials. The temperature of the injector and detector were equal to 200°C. The inert gas argon of 99.9999% purity (producer: Multax, Warszawa, Poland) was used under pressure 0.22 MPa; the pressures of air and hydrogen (producer: Multax) were 0.16 and 0.175 MPa, respectively. The volume of samples was 1 µl. For sample preparation a DD-500 pipette dilutor (producer: Pol-Med, Warsaw, Poland) and Eppendorf-type vials (producer: Medlab, Warsaw, Poland) of 1.5 ml volume, allowing spinning of micro-samples, were used.

### Chemical reagents

The following chemical reagents were used in the course of measurements:

1. ethanol (purity 99.9%; producer: Experimental Department of Chemipan, Warsaw, Poland);
2. 2-methylpropanol-2 (p.a. grade; producer: Loba Chemie, Vienna, Austria);
3. acetaldehyde anhydrous (p.a. grade, producer: Flucka, Bühe, Germany);
4. ethyl ether (p.a. grade, producer: Polchemie, Prague, Czech Republic);
5. acetone (p.a. grade, producer: POCh, Gliwice, Poland);
6. ethyl acetate (p.a. grade, producer: POCh, Gliwice, Poland);
7. methanol (99.9% standard for chromatography, producer: Chemipan);
8. isopropanol (p.a. grade, producer: POCh, Gliwice, Poland);

9. Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3 (producer: Bio-Rad, München, Germany).

### Study of the selectivity of the method

Approximately 1‰ aqueous solutions of methanol, acetaldehyde, ethanol, acetone, ethyl ether, isopropanol and ethyl acetate were prepared in order to check the selectivity of the method. The solutions were mixed with the solution of the internal standard (aqueous solution of 2-metylopropanol-2 at 1000 mg/l concentration) and then values of the retention time of particular compounds were determined. The retention time of the internal standard was about 480 s in these conditions. Acetone, ethyl ether and isopropanol did not separate. The obtained results were collected in Table I and an example of a chromatographic picture of the mixture of methanol, acetaldehyde, ethanol, isopropanol and 2-metylopropanol-2 is shown in Figure 1. In order not to prolong the time of analysis (which is the critical parameter in the diagnosis of ethanol intoxication), separation of acetone, ethyl ether and isopropanol was not attempted.

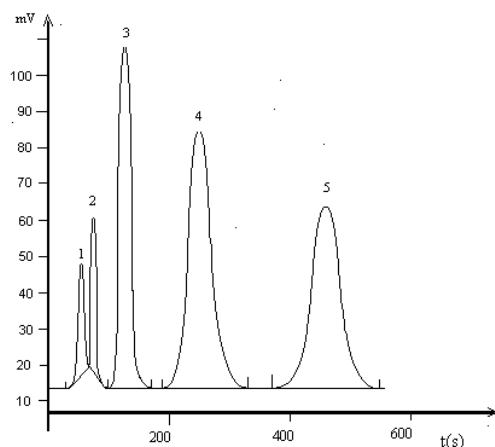


Fig. 1. Chromatogram of the mixture of methanol, acetaldehyde, ethanol, propanol-2 and 2 methylopropanol-2, at concentrations of about 1‰.

### Determination

Biological materials (full blood, serum, plasma and urine) and the standard solution were mixed in the ratio 1:1 with the solution of the internal standard. Each time about 1  $\mu$ l of the mixture was introduced into the injection chamber. After the measurement had been finished, the peak area of ethanol was divided by the peak area of the internal standard. The concen-

tration of ethanol was calculated from the calibration function equation. Integration of peak areas and other calculations were performed in an automatic manner using the electronic system of data processing. In cases where the result exceeded the calibration range, the measurement was repeated, after the sample had been diluted with water. The result was then multiplied by the dilution ratio. An internal quality check was performed using standards of ethanol, for which the matrix was serum (Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3). The obtained control results were placed in Shewhart's Cards (PN-ISO 8258, 1993).

TABLE I. VALUES OF THE RELATIVE RETENTION TIME  $t_R/t_{R,STANDARD}$  (THE INTERNAL STANDARD: 2-METYLOPROPANOL-2) AND THE STANDARD DEVIATION S FOR METHANOL, ACETALDEHYDE, ETHANOL, PROPANOL-2, ETHYL ETHER AND ETHYL ACETATE IN THE CONDITIONS OF ISOTHERMAL OPERATION OF THE COLUMN T = 120°C.

Peak number	Chemical compound	$t_R/t_{R,standard}$ mean n = 30	Standard deviation s (n = 30)
1	Methanol	0.114	0.0010
2	Acetaldehyde	0.154	0.0010
3	Ethanol	0.269	0.0010
	Acetone	0.461	0.0010
4	Propanol-2	0.538	0.0020
	Ethyl ether	0.668	0.0005
5	2-metylopropanol-2	1.000	
	Ethyl acetate	1.516	0.0017

### Basic calibration

A basic ethanol solution of about 30 mg/ml concentration was prepared for the calibration. Then, by appropriate dilution with water, working solutions of concentrations within the range of 0.2–3.0‰ were prepared. Measurement of each of these solutions was carried out, and then the parameters of the calibration curve were calculated. In Figure 2 shows an example of a calibration line, drawn on the basis of points from 28 series of ethanol determinations carried out at various times and by various analysts.

The calibration was verified by determination of ethanol concentration in the certified standards (Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3).

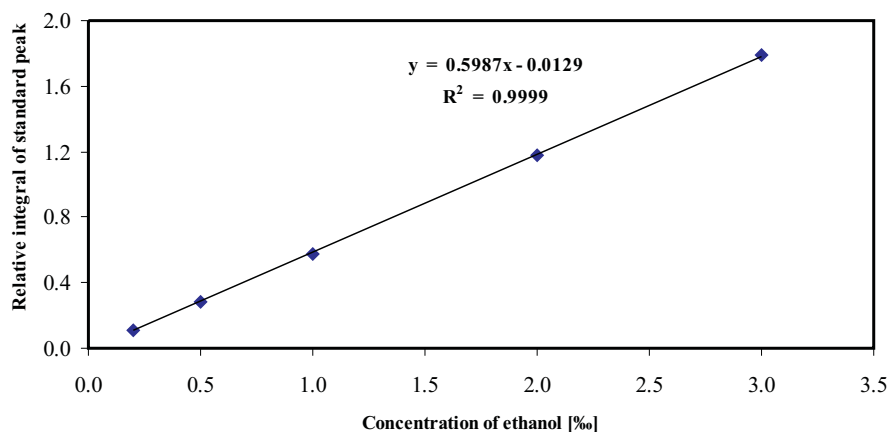


Fig. 2. Calibration curve for the method of determination of ethanol, 28 series of standards, the range of concentration 0.2–3.0‰,  $r = 0.99994$ .

### A statistical evaluation of the linear function of an analytical method [2]

#### *Symbols used*

The following symbols are used in this paper:

- $x_i$  – real value of the concentration of ethanol in the standard (‰);
- $\bar{x}$  – mean of the real values of ethanol concentrations;
- $\bar{y}_i$  – mean value of the obtained ethanol concentrations for certain real concentration of ethanol  $x_i$  (‰);
- $y_{ij}$  – a successive concentration of ethanol in the standard, predicted from a separate calibration curve (‰);
- $\bar{y}$  – mean ethanol concentration obtained in the experiment;
- $y_{reg}$  – ethanol concentration predicted from the regression equation:  

$$y_{reg} = 1.007786 x_i + (-0.01523);$$
- $m$  – number of ethanol concentrations ( $m = 5$ );
- $n$  – number of repetitions of determination of the same concentration of ethanol ( $n = 3$ );
- $i$  – successive concentration of ethanol in the standard solution (from 1 to 5);
- $j$  – successive repetition of certain concentrations of ethanol in a standard solution (from 1 to 3);
- $w_i$  – result  $y_{ij}$  independent from  $x_i$  concentration;

$l$  – number of successive results of a sample in ascending order (from 1 to 15);

$u_l$  – normalised variable in Kolmogorov test;

$\bar{w}$  – mean value of  $w_l$ ;

$S$  – standard deviation of  $w_l$  according the formula  $S = \sqrt{\frac{w_l \bar{w}^2}{14}}$ ;

$s_i^2$  – variation of the concentration  $x_i$ ;

$r$  – correlation coefficient for the linear regression equation describing the dependence of the predicted ethanol concentration  $y_{ij}$  on the real value of ethanol concentration in the standard solution  $x_i$ .

### **Testing of the linearity of the method**

#### Selection of the working range of the method

A prerequisite for forensic usefulness is maintaining the total error of determination of ethanol concentration below  $\pm 0.06\%$  within the working range [3, 5]. Prior to determination of the total error it was necessary to establish the working range of the method and test its linearity.

TABLE II. THREE SERIES OF DETERMINATIONS FOR ETHANOL STANDARDS IN THE SCALES 0.2–3.0 ‰.

Real value $x_i$ (‰)	Obtained results ‰			
	1st scale of standards $y_{i1}$	2nd scale of standards $y_{i2}$	3rd scale of standards $y_{i3}$	$y_{i\text{mean}}$
0.2	0.156	0.222	0.195	0.191
0.5	0.486	0.497	0.501	0.495
1.0	1.04	0.983	0.968	0.997
2.0	1.90	1.99	2.00	1.963
3.0	3.00	3.04	3.05	3.030

In order to establish the working range of the method five real values of concentration of ethanol were chosen: 0.2; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0‰ (these values of concentrations were claimed by the analyst). Three samples were prepared for each of these concentrations. Each consecutive day only one sample, among the 15 solutions prepared, was analysed. Each of the analysed samples was prepared from a new, freshly made, basic ethanol solution. Results of the analysis were predicted from the calibration curve which was plotted on the basis of a new basic solution of ethanol each time. Different persons

performed preparation of samples and calibration curves. The obtained results were collected in Table II. Mean values  $\bar{y}_i$  of the measurements were calculated according to the formula:

$$\bar{y}_i = \frac{y_{ij}}{n}. \quad \{1\}$$

Checking whether the obtained results reveal a normal distribution

The  $\lambda$ -Kolmogorov test [9] was used in order to check whether the obtained data reveal a normal distribution. The following null hypothesis  $H_0$  was assumed: the results belong to a normal distribution. For verification of the null hypothesis the following procedures were undertaken:

1. the results were made independent of concentration, obtaining a value  $w_l$  by dividing  $y_{ij}$  by the appropriate value of real concentration  $x_i$  according to the formula:

$$w_l = \frac{y_{ij}}{x_i} \quad \{2\}$$

and they were normalised according to the formula:

$$u_l = \frac{w_l - \bar{w}}{S}; \quad \{3\}$$

2. the result were put in increasing order;
3. the value of the theoretical cumulative distribution  $\Phi(u_i)$  was taken from a table of normal distribution;
4. the value of the expected cumulative distribution was calculated:

$$F = w_l = \frac{l}{n \cdot m}; \quad \{4\}$$

5. the largest value of the difference D between the theoretical and the expected cumulative distribution was found:

$$D = \max | u_l - F |; \quad \{5\}$$

6. this value was compared with the critical value of the  $\lambda$ -Kolmogorov distribution table at the significance level  $\alpha = 0.05$  and  $n = 15$ ,  $D_\alpha = 0.340$ . Since  $D = 0.1964 < D_\alpha = 0.340$ , there is no reason to reject the null hypothesis.

Testing of the homogeneity of variance within the selected working range

In order to verify the homogeneity of variance, the variance  $s_l^2$  of the lowest concentration 0.2‰ and variance  $s_s^2$  of the highest concentration 3.0‰ were calculated in the following manner:



$$s_i^2 = \frac{y_{ij} - \bar{y}_i}{n - 1} \quad \{6\}$$

and the following values were obtained:  $s_1^2 = 0.001101$  and  $s_5^2 = 0.000700$ .

The homogeneity of variance was checked by the test. The following null hypothesis was assumed  $H_0: s_1^2 = s_5^2$  and alternative hypothesis  $H_1: s_1^2 \neq s_5^2$ . The coefficient was calculated :

$$F_{obl} = \frac{s_1^2}{s_5^2} \quad \{7\}$$

$$F_{obl} = 0.001101/0.0007 = 1.57286.$$

The critical value  $F_{kryt}$  for significance level 0.01 and degrees of freedom  $f_{min} = n - 1 = 2$  and  $f_{max} = n - 1 = 2$  equals 99.00. Since  $1.57286 < 99.00$ , there was no reason to reject the null hypothesis, and so, the homogeneity of variance was proved. Thus, it was possible to proceed to the establishing of the correlation coefficient and linear regression parameters.

#### Determination of the correlation coefficient (r)

The correlation coefficient was calculated from data collected in Table III according to the formula:

$$r = \frac{m \sum x_i y_{ij} - \sum x_i \sum y_{ij}}{\sqrt{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{m \sum y_{ij}^2 - (\sum y_{ij})^2}} \quad \{8\}$$

The standard deviation of a single result  $s_1$  was calculated according to the formula:

$$s_i = \sqrt{\frac{y_{ij} - \bar{y}_i}{n - 1}} \quad \{9\}$$

The correlation coefficient  $r$  was equal to 0.99945, and so, it was assumed that the dependence of the measured concentration of ethanol  $y_{ij}$  on the real values of concentrations  $x_i$  was linear.

#### Determination of linear regression parameters

The slope parameter was calculated according to the formula:

$$a = \frac{m \sum x_i y_{ij} - \sum x_i \sum y_{ij}}{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \{10\}$$

TABLE III. INPUT DATA FOR CALCULATIONS OF THE PARAMETERS OF LINEAR REGRESSION AND THE LINEAR CORRELATION COEFFICIENT FOR THE FUNCTION OF THE MEASURED VALUES VS. THE REAL VALUES OF ETHANOL CONCENTRATIONS IN THE RANGE 0.2–3.0%.

No.	Real value $x_i$ [%]	Measured value $y_{ij}$ [%]	y mean	$y_{ij} - y_{sr}$	$s_i$	$x_i^2$	$x_i y_{ij}$	$y_{ij}^2$
1	0.2	0.156	0.19100	-0.03500	0.03318	0.04	0.0312	0.02434
2	0.2	0.222		0.03100		0.04	0.0444	0.04928
3	0.2	0.195		0.00400		0.04	0.0390	0.03803
4	0.5	0.486	0.49467	-0.00870	0.00777	0.25	0.2430	0.23620
5	0.5	0.497		0.00233		0.25	0.2485	0.24701
6	0.5	0.501		0.00633		0.25	0.2505	0.25100
7	1.0	1.040	0.99700	0.04300	0.03799	1.00	1.0400	1.08160
8	1.0	0.983		-0.01400		1.00	0.9830	0.96629
9	1.0	0.968		-0.02900		1.00	0.9680	0.93702
10	2.0	1.900	1.96333	-0.06330	0.05508	4.00	3.8000	3.61000
11	2.0	1.990		0.02667		4.00	3.9800	3.96010
12	2.0	2.000		0.03667		4.00	4.0000	4.00000
13	3.0	3.000	3.03000	-0.03000	0.02646	9.00	9.0000	9.00000
14	3.0	3.040		0.01000		9.00	9.1200	9.24160
15	3.0	3.050		0.02000		9.00	9.1500	9.30250
Total	20.1	20.028				42.87	42.8976	42.945

Its value was 1.007786. After that, according to the formula:

$$s_a = \sqrt{\frac{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{m^3} \frac{1 - r^2}{\bar{x}^2} \sum x_i^2} \quad \{11\}$$

the standard deviation of the slope parameter was calculated. The value  $s_a = 0.03987$  was obtained. The dependence of the obtained concentrations of ethanol  $y_{ij}$  as a theoretical function should be linear, with the slope  $a$  equal to 1 and Y-intercept  $b$  equal to zero. For that reason the null hypothesis of  $a$  being equal to 1 ( $H_0: a - 1 = 0$ ) as well as an alternative hypothesis of  $a$  being not equal to 1 ( $H_1: a - 1 \neq 0$ ) were assumed. The verification of the null hypothesis consists in calculation of the following statistics:

$$t_{obl} = \frac{a - 1}{s_a} \sqrt{n - m} \quad \{12\}$$

The value of  $t_{obl} = 0.75$  was obtained. The  $t_{kryt}$  taken from the t-Student distribution table for  $\alpha = 0.05$  and 14 degrees of freedom was 2.14, thus, there was no reason to reject the null hypothesis.

The Y-intercept  $b$  was calculated according to the formula:

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad \{13\}$$

and  $b = -0.01523$  was obtained.

The standard deviation of Y-intercept was established from the formula:

$$s_b = \sqrt{\frac{m \sum x_i^2 - \sum x_i^2 \bar{x}}{m^2 - \sum x_i^2 \bar{x}^2} \cdot \frac{1 - r^2}{m}} \quad \{14\}$$

The calculated value  $s_b$  was equal to 0.25272. From  $b$  and  $s_b$  values the significance of the Y-intercept was tested:  $t_{obl} = |b| / s_b = |-0.01523| / 0.25272 = 0.06026$ .

Because  $t_{obl} = 0.06026 < t_{kryt} = 3.18$ , thus the Y-intercept was not significant and in some calculations it could be omitted.

The dependence:  $y$  (predicted value) =  $f$  (true value) =  $ax + b$  is presented in Figure 3.

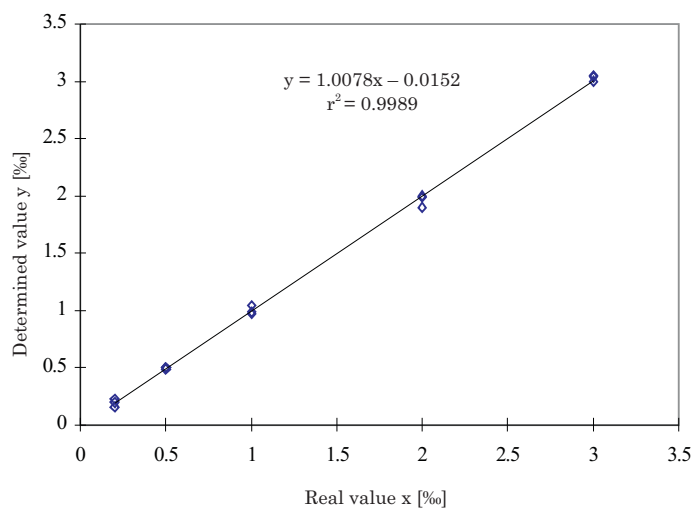


Fig. 3. Diagram of the dependence of determined values  $y$  vs. the real value  $x$  of ethanol concentrations from the range 0.2–3.0%, 3 series,  $r = 0.99945$ .

### Calculations of the variability coefficient of the method

The standard error of the predicted  $y$  value,  $s_y$ , was calculated according to the formula:

$$s_y = \sqrt{\frac{y_{ij}^2 - y_{reg}^2}{n} - \frac{2 y_i y_{reg}}{n}}. \quad \{15\}$$

A value of  $s_y = 0.0265$  was obtained.

When the standard error of the predicted  $y$  value was known, then the standard deviation of the method calculated from the formula:  $s_m = s_y / a$ ;  $s_m = 0.0265 / 1.007786 = 0.02630$ .

The variability coefficient was found to be:  $v_m = s_y \cdot 100\% / (a \cdot x) = 1.96\%$ .

### Determination of the systematic error $\delta_y$ and the total error of the method $(RMSE)^{1/2}$

The calculation of systematic error was based on the Y-intercept and the slope coefficient for the line which describes the dependence of the predicted values of concentrations on their real value. This error, described by the symbol  $\delta_y$ , results from the Y-intercept  $b$  error, i.e. the error of the point of the line intercepting the OY axis, as well as from the proportional error  $(a - 1)$ . It is given by the formula:

$$\delta_y = a - 1 \cdot x + b. \quad \{16\}$$

The relative mean square error  $(RMSE)^{1/2}$  is a good estimator of the total error of an analytical method and it consists of both the statistical error  $s_i$  and systematic error  $\delta_y$ .

The mean square error is given by the formula:

$$MSE = s_i^2 + \delta_y^2, \quad \{17\}$$

thus

$$RMSE = \frac{MSE}{x_i^2}, \quad \{18\}$$

and

$$RMSE^{1/2} = \frac{MSE^{1/2}}{x_i}, \quad \{19\}$$

where  $x_i$  is the real concentration of ethanol; claimed by the analyst.

Data required for calculating the relative mean square error  $(RMSE)^{1/2}$  were collected in Table IV.

The dependence of  $(RMSE)^{1/2}$  on the real values of concentration of ethanol  $x_i$  was presented in Figure 4. This diagram illustrates the total error of the presented analytical method. In the diagram also  $(RMSE)^{1/2}_{ideal}$  (calculated with the assumption that the systematic error is equal to zero) was presented.

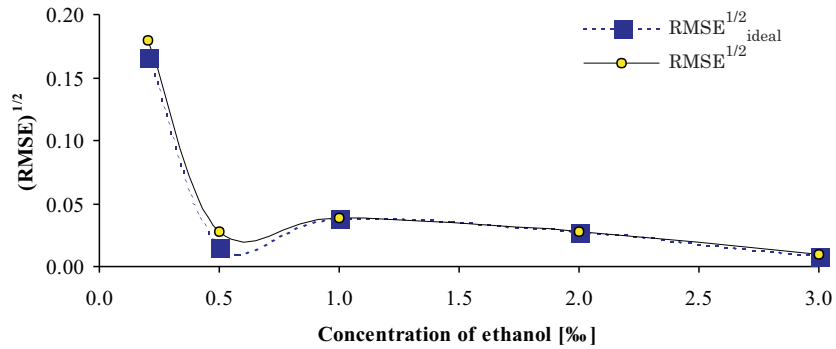


Fig. 4. Diagram of the dependence of the total error  $(RMSE)^{1/2}$  of the method of ethanol determination in the function of the concentration of ethanol in the range of 0.2–3.0‰.

TABLE IV. DATA FOR CALCULATING THE TOTAL ERROR OF THE METHOD OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETHANOL IN THE RANGE OF CONCENTRATION 0.2–3.0‰.

$x_i$ [‰]	$s_i$	$\delta_y$	$MSE$	$RMSE$	$(RMSE)^{1/2}$	Total error* [‰]
0.2000	0.0332	– 0.0136	0.0013	0.0322	0.1795	0.0359
0.5000	0.0078	– 0.0113	0.0002	0.0008	0.0275	0.0138
1.0000	0.0380	– 0.0074	0.0015	0.0015	0.0387	0.0387
2.0000	0.0551	0.0004	0.0030	0.0008	0.0276	0.0552
3.0000	0.0265	0.0082	0.0008	0.0001	0.0092	0.0276

\*Total error [‰] =  $(RMSE)^{1/2} \cdot x_i$

## DISSCUSION

When establishing what chemical compounds could be the cause of the low selectivity of a method of ethanol determination in the concentration range 0.2–3.0‰, data from the literature were utilised [5, 11].

The presented method allowed us to separate ethanol from acetaldehyde, methanol, acetone, ethyl ether, isopropanol, ethyl acetate, and higher alcohols (Figure 1, Table I).

The selectivity of the method was found to be suitable for the diagnosis of acute intoxication as well as for forensic purposes [3]. The graph of the total error of the presented method nearly overlapped with the  $(RMSE)^{1/2}_{ideal}$  graph in the function of the concentration of ethanol and for each of the concentrations in the 0.2–3.0‰ range the total error was smaller than 0.06‰ (Figure 4, Table IV).

Thus, it has been established that within the considered range of ethanol concentrations the process of analysis was biased with the total error of the value not exceeding  $\pm 0.06\%$ .

The significant progress which has been achieved in the field of equipment being applied for GC method, i.e. the possibility of simultaneous use of two high performance capillary columns, gives an opportunity for a quick and reliable diagnosis of the cause of acute intoxication by various volatile chemical compounds. For determination of ethanol in body fluids for forensic purposes modern analytical equipment should be applied where possible; and this really does happen, increasingly frequently, in Poland [1].

However, due to the modest public finances set aside for the saving of life, one should also look for some effective solutions. In the presented work a suggestion of such a solution was put forward.

## CONCLUSIONS

1. The described analytical method is sufficiently selective for determination of ethanol in the presence of acetaldehyde, methanol, acetone, ethyl ether, isopropanol, ethyl acetate, and higher alcohols.
2. The presented analytical process, being simple, not time-consuming and fulfilling the requirement of total error not exceeding 0.06‰ in the considered range of concentration 0.2–3.00‰, can be applied not only for diagnosis of acute intoxications but also for forensic purposes.

### Acknowledgements:

The Authors wish to thank Mr. K. Normantowicz and Mr. T. Szymański for the helpful discussion and constructive criticism.

## References:

1. Błaszyk J. B., Krawczyk W., Wejman D., Organizacja badań alkoholu we krwi w policyjnych laboratoriach kryminalistycznych, *Problemy Kryminalistyki* 1997, nr 218, s. 59–60.
2. Dobecki M., Zapewnienie jakości analiz chemicznych, IMP, Łódź 1998.
3. Głazek A., Zmiany kryteriów i zasad opiniowania w sprawach alkoholowych, *Prokuratura i Prawo* 1995, nr 2, s. 99–109.
4. Janica J., Morfologiczne aspekty ostrego zatrucia etanolem (oze), *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminalistyki* 1990, t. 40, s. 76–80.
5. Jakliński A., Nasiłowski W., Markiewicz J., Zarys sądowo-lekarskiej toksykologii alkoholu etylowego, PZWL, Warszawa 1978.
6. Nitecki J., Groszek B., An analysis to evaluate the factors which influence the clinical picture in ethyl alcohol intoxication, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminalistyki* 1991, t. 41, s. 248–253.
7. Olszewski M., Tomaszewska-Gantz M., Ocena przydatności chromatogramów gazowych do oznaczania etanolu we krwi metodą *head space*, *Problemy Kryminalistyki* 1997, nr 213, s. 50–52.
8. Ostre zatrucia, vol. 1, Rozpuszczalniki organiczne, IMP, Łódź 1994.
9. Sęk S., Zastosowania metod statystycznych w badaniach klinicznych i eksperymentalnych, CMKP, Warszawa 1978.
10. TDx/FLx Assays, Abbott GmbH, Wiesbaden 1996.
11. Wachowiak R., Przybylski Z., Straub T., Równoczesna analiza chromatograficzna alkoholu etylowego i innych trucizn lotnych w materiale biologicznym, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminalistyki* 1990, vol. 40, s. 91–97.

## OZNACZANIE ETANOLU W PŁYNACH USTROJOWYCH METODĄ GC DLA POTRZEB DIAGNOSTYKI OSTRYCH ZATRUĆ ORAZ DO CELÓW DOWODOWYCH

Hanna BRYGIERT, Bogusław BUSZEWSKI

### WSTĘP

Etanol jest silną trucizną metaboliczną szczególnie silnie oddziałującą na komórki ośrodkowego układu nerwowego. Kinetyka wchłaniania i wydalania oraz przemiana metaboliczna etanolu są dobrze znane [5, 6, 8]. Liczba ostrych zatruc etanolem, które mogą spowodować gwałtowny zgon, niepokojąco narasta [4]. Z powodu poważnego bezpośredniego zagrożenia życia podczas ratowania osób zatrutych etanolem należy prowadzić ciągle monitorowanie poziomu tego związku we krwi. Przeszkodą w prawidłowym postępowaniu przy podejrzeniu o ostre zatrucie etanolem oraz w diagnostyce różnicowej stanów nieprzytomności bywa brak możliwości szybkiego i dostatecznie wiarygodnego oznaczenia stężenia alkoholu etylowego we krwi.

Stan nietrzeźwości w Polsce określany jest na podstawie stężenia etanolu we krwi lub w wydychanym powietrzu. Kontrola stanu trzeźwości w Polsce jest od 1995 r. prowadzona przez 10 kryminalistycznych laboratoriów policyjnych desygnowanych przez Komendę Główną Policji [1, 7].

Chemiczno-toksykologiczne oznaczanie stężenia etanolu w płynach ustrojowych można przeprowadzić używając trzech następujących podstawowych technik [5]:

- chromatografii gazowej (GC),
- metody enzymatycznej ADH (dehydrogenazy alkoholowej),
- mikrometod<sup>1</sup> chemiczn<sup>1</sup> Widmarka.

W niektórych laboratoriach medycznych do ilościowego oznaczania etanolu w płynach biologicznych (krew pełna, surowica, osocze, mocz) stosuje się technikę REA (ang. radiative energy attenuation) [10]. Zgodnie z zaleceniami przyjętymi podczas Krajowej Konferencji Alkoholologów (Kraków-Przegorzały, 15–16 grudnia 1992 r.) [3], metodę Widmarka (niespecyficzną) należy traktować jako metodę przesiewową i każdy wynik dodatni potwierdzić metodą o większej selektywności (np. GC, ADH). Metoda chromatografii gazowej w przypadku analizy lotnych związków organicznych, w tym etanolu, jest metodą z wyboru ze względu na selektywność, czułość, precyzję i dokładność, a także na krótki czas i niski koszt analizy. Dla celów dowodowych w obrębie tych metod dopuszczalne jest stosowanie modyfikacji wynikających np. z unowocześnienia aparatury, przy czym warunkiem decydującym o postępowaniu analitycznym jest utrzymanie błędu całkowitego poniżej  $\pm 0,06\%$  w użytecznym zakresie stężeń [3, 5].

Oznaczanie etanolu w płynach ustrojowych jest obecnie jednym z najczęściej wykonywanych badań u osób hospitalizowanych z powodu podejrzenia ostrego zatrucia egzogenego. Wydaje się, że reforma finansowania ochrony zdrowia z powodu braku dostatecznej ilości środków finansowych może zmusić lekarzy w szpitalach do zaniechania wykonywania tych badań. To z kolei przyczynić się może do stworzenia zagrożenia życia pacjentów.



Przeszło 10-letnia praktyka autorów niniejszej pracy w zakresie ilościowego oznaczania alkoholu etylowego, zarówno dla potrzeb diagnostyki ostrych zatruc, jak i do celów dowodowych, skłoniła ich do zaprezentowania procedury analitycznej, którą można stosować w obu tych dziedzinach.

## CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### Modyfikacja metody

Metodę opisaną w instrukcji do oznaczania alkoholu we krwi i innych płynach ustrojowych metodą chromatografii gazowej [5] zmodyfikowano zmieniając wypełnienie kolumny chromatograficznej (Propak Q, 80–100 mesh w miejsce 20% Carbowaxu 1000 na Chromosorbie W, 100–120 mesh) oraz jej długość z 1,5 m do 1 m. Równocześnie podwyższono temperaturę kolumny z 70°C do 120°C oraz wprowadzono prekolumnę umożliwiającą nieprzerwaną pracę układu mimo nastrzykiwania bezpośrednio do dozownika prób materiału biologicznego. Dokonano walidacji parametrów analitycznych metody.

### Zasada pomiaru

Zastosowano wersję analizy ilościowej ze wzorcem wewnętrznym. Etanol oraz 2-metylopropanol-2 (wzorec wewnętrzny) ulegają rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej wypełnionej aktywnym ciałem stałym. Stężenie etanolu oblicza się ze stosunku powierzchni piku etanolu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego (2-metylopropanolu-2). Kalibracji dokonuje się w roboczym, prostoliniowym zakresie stężenia i oblicza parametry równania prostej regresji opisującej zależność względnej powierzchni piku wzorca etanolu (czyli stosunku powierzchni piku etanolu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego) w funkcji jego stężenia.

### Sprzęt i warunki pomiaru

Do pomiarów użyto chromatograf gazowy N-504 (producent Mera-Elwro, Wrocław, Polska) z detektorem FID i mikroprocesorowym systemem przetwarzania danych (producent AKORD, Gdańsk, Polska) w wersji 3,0. Komorę dozownika zmodyfikowano rozwiercając ją i umieszczając w niej przed szklaną kolumną analityczną kapilarę o wymiarach (100 x 1,5 mm) wykonaną ze szkła borokrzemowego. Kapilarę tę wymienia się po 10 nastrzykach prób zawierających materiał biologiczny. Temperatura dozownika i detektora wynosiła 200°C. Jako gaz nośny zastosowano argon o czystości 99,9999 (producent: Multax, Warszawa, Polska) pod ciśnieniem 0,22 MPa; ciśnienia powietrza i wodoru (producent: Multax) wynosiły odpowiednio 0,16 oraz 0,175 MPa. Objętość próbki była równa 1 µl. Do preparacji próbek stosowano pipetę dilutor DD-500 (producent: Pol-Med, Warszawa, Polska) oraz probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml umożliwiające wirowanie mikropróbek (producent: Medlab, Warszawa, Polska).

### Odczynniki

Do pomiarów stosowano następujące odczynniki:

1. etanol (czystość 99,9%; producent: Zakład Doświadczalny Chemipan, Warszawa, Polska);
2. 2-metylopropanol-2 (o czystości pa; producent: Loba Chemie, Wiedeń, Austria);
3. aldehyd octowy bezwodny (o czystości pa, producent: Flucka, Bühe, Niemcy);
4. eter etylowy (czda, producent: Polchemie, Praga, Czechy);
5. aceton (czda, producent: POCh, Gliwice, Polska);
6. octan etylu (czda, producent: POCh, Gliwice, Polska);
7. alkohol metylowy (99,9% standard do chromatografii, producent: Chemipan);
8. izopropanol (czda, producent: POCh);
9. Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3 (producent: Bio-Rad, Monachium, Niemcy).

### Badanie selektywności

Do zbadania selektywności metody sporządzono wodne roztwory metanolu, aldehydu octowego, etanolu, acetonu, eteru etylowego, propanolu-2 i octanu etylu o stężeniu ok. 1%. Roztwory te zmieszano z roztworem wzorca wewnętrznego (wodny roztwór 2-metylopropanolu-2 o stężeniu 1000 mg/l) i wyznaczono czas retencji poszczególnych związków. Czas retencji wzorca wewnętrznego wynosił w podanych warunkach około 480 s. Aceton, eter etylowy i propanol-2 w podanych warunkach nie rozdzielają się. Wyniki zebrano w tabeli I, a przykładowy chromatogram mieszaniny metanolu, aldehydu octowego, etanolu, propanolu-2 oraz 2-metylopropanolu-2 przedstawiono na rycinie 1. Aby nie wydłużać czasu analizy (w diagnostyce zatruciu alkoholem etylowym krótki czas analizy jest elementem krytycznym), celowo nie podejmowano próby rozdzielenia acetonu od propanolu-2 i eteru etylowego.

### Wykonanie oznaczenia

Materiał biologiczny (krew pełna, osocze, surowica, mocz) lub roztwór wzorca mieszano w stosunku 1:1 z roztworem wzorca wewnętrznego i ok. 1 µl tej mieszaniny wprowadzono do komory nastrzykowej. Po zakończeniu pomiaru dzielono powierzchnię pików pochodzącego od etanolu przez powierzchnię pików pochodzącego od wzorca wewnętrznego. Stężenie etanolu obliczano, korzystając z parametrów równania prostej kalibracji. Całkowanie powierzchni pików oraz obliczenia dokonywano automatycznie dzięki elektronicznemu systemowi przetwarzania danych. W przypadku, gdy wynik wykraczał poza zakres kalibracji, badanie powtarzano, rozcieńczając próbę wodą. Wynik mnożono wówczas przez liczbę wyrażającą stopień rozcieńczenia. Wewnętrzną kontrolę jakości prowadzono w oparciu o wzorce etanolu, dla których matrycą była surowica (Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3). Wyniki kontrolne nanoszono na karty Shewharta (PN-ISO 8258, 1993).

### Kalibrowanie podstawowe

Do kalibracji sporządzono roztwór podstawowy etanolu o stężeniu ok. 30 mg/ml. Następnie, odpowiednio rozcieńczając ten roztwór wodą, sporządzono roztwory robo-

cze o stężeniach w zakresie 0,2–3,0‰. Wykonano pomiar każdego z tych roztworów i obliczono parametry krzywej wzorcowej. Na rycinie 2 przedstawiono przykładową prostą kalibracyjną poprowadzoną w oparciu o punkty z 28 serii oznaczeń wzorców sporządzonych w różnym czasie i przez różnych analityków.

Kalibrację weryfikowano, oznaczając stężenie etanolu w certyfikowanych wzorcach (Liquichek™ Serum Alcohol Control, level 1, 2 and 3).

## Statystyczna ocena funkcji liniowej metody analitycznej [2]

### Notacja

W dalszej części pracy zastosowano następującą jednolitą notację:

$x_i$  – wartość prawdziwa stężenia etanolu we wzorcu (‰);

$\bar{x}$  – średnia arytmetyczna ze stężeń prawdziwych etanolu;

$\bar{y}_i$  – średnia arytmetyczna z uzyskanego stężenia etanolu dla danego stężenia prawdziwego  $x_i$  (‰);

$y_{ij}$  – kolejne stężenie etanolu we wzorcu odczytane z oddzielnej krzywej kalibracyjnej (‰);

$\bar{y}$  – średnia arytmetyczna ze stężeń etanolu uzyskanych w eksperymencie;

$y_{reg}$  – stężenie etanolu wyznaczone z równania regresji:  $y_{reg} = 1.007786 x_i + (-0,01523)$ ;

$m$  – liczba stężeń etanolu ( $m = 5$ );

$n$  – liczba powtórzeń oznaczeń dla danego stężenia etanolu ( $n = 3$ );

$I$  – kolejne stężenie wzorca etanolu (od 1 do 5);

$j$  – kolejne powtórzenie danego stężenia wzorca etanolu (od 1 do 3);

$w_i$  – wynik  $y_{ij}$  uniezależniony od stężenia  $x_i$ ;

$l$  – liczba porządkowa kolejnych wyników próby ułożonych w kolejności rosnącej (od 1 do 15);

$u_l$  – zmienna znormalizowana w teście Kołmogorowa;

$\bar{w}$  – średnia arytmetyczna wartości  $w_l$ ;

$S$  – odchylenie standardowe wartości  $w_l$  wg wzoru:  $S = \sqrt{\frac{w_l \bar{w}^2}{14}}$ ;

$s_i^2$  – wariancja dla stężenia  $x_i$ ;

$r$  – współczynnik korelacji dla równania prostej regresji opisującej zależność stężenia oznaczonego  $y_{ij}$  od stężenia prawdziwego  $x_i$ .

### Badanie liniowości metody

#### Dobór zakresu roboczego metody

Warunkiem decydującym o przydatności postępowania analitycznego stosowanego do celów dowodowych jest utrzymanie całkowitego błędu pomiaru w zakresie  $\pm 0,06\%$  roboczym zakresie stężeń etanolu [3, 5]. Przed wyznaczeniem błędu całkowitego należało zatem ustalić zakres roboczy i zbadać liniowość metody.

W celu ustalenia zakresu roboczego wybrano 5 wartości stężeń prawdziwych (o zadeklarowanej przez analityka zawartości etanolu): 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0‰. Dla każdego stężenia prawdziwego sporządzono po 3 próby. Jednego dnia oznaczano tylko 1 próbę spośród 15 przewidzianych do zbadania. Każdą z tych prób przygotowano

z innego roztworu podstawowego etanolu. Wyniki oznaczeń odczytywano z krzywej kalibracyjnej, którą każdorazowo przygotowano z nowego roztworu podstawowego. Przygotowanie prób i krzywej kalibracyjnej było prowadzone przez różne osoby. Wyniki oznaczeń zebrano w tabeli II. Średnie  $\bar{y}_i$  z pomiarów obliczono według wzoru:

$$\bar{y}_i = \frac{y_{ij}}{n}. \quad \{1\}$$

#### Sprawdzenie, czy wyniki należą do rozkładu normalnego

W celu sprawdzenia, czy wyniki należą do rozkładu normalnego, posłużono się testem zgodności  $\lambda$ -Kolmogorowa dla małych prób [9]. Postawiono hipotezę zerową  $H_0$ ; wyniki należą do rozkładu normalnego. W celu zweryfikowania tej hipotezy:

1. uniezależniono wyniki od stężenia uzyskując wartość  $w_l$  wynikającą z podzielenia wartości  $y_{ij}$  przez odpowiadającą jej wartość stężenia prawdziwego  $x_i$  wg wzoru:

$$w_l = \frac{y_{ij}}{x_i} \quad \{2\}$$

a następnie znormalizowano je wg wzoru:

$$u_l = \frac{w_l - \bar{w}}{S}; \quad \{3\}$$

2. uporządkowano wyniki w ciąg rosnący;
3. odczytano z tablicy rozkładu normalnego wartości dystrybuanty teoretycznej  $\Phi(u_i)$ ;
4. obliczono wartości dystrybuanty empirycznej:

$$F w_l = \frac{l}{n m}; \quad \{4\}$$

5. znaleziono największą wartość bezwzględną różnicy  $D$  pomiędzy dystrybuantą teoretyczną a empiryczną:

$$D = \max | u_l - F x_i |; \quad \{5\}$$

6. Wartość tę porównano z wartością krytyczną podaną w tablicy rozkładu  $\lambda$ -Kolmogorowa przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  dla  $n = 15$ ,  $D_\alpha = 0,340$ . Skoro  $D = 0,1964 < D_\alpha = 0,340$ , to brak jest podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej.

#### Sprawdzenie jednorodności wariancji dla wybranego zakresu roboczego

W celu sprawdzenia jednorodności wariancji wyznaczono wariancje  $s_i^2$  dla najniższego stężenia 0,2‰ i  $s_s^2$  dla najwyższego stężenia 3,0‰ według wzoru:

$$s_i^2 = \frac{y_{ij} - \bar{y}_i}{n - 1} \quad \{6\}$$

i otrzymano  $s_7^2 = 0,001101$  i  $s_5^2 = 0,000700$ .

Aby upewnić się co do jednorodności wariancji, zastosowano test F-Snedecora. Postawiono hipotezę zerową  $H_0: s_7^2 = s_5^2$  oraz hipotezę alternatywną  $H_1: s_7^2 \neq s_5^2$ . Obliczono współczynnik:

$$F_{obl} = \frac{s_1^2}{s_5^2} \quad \{7\}$$

$$F_{obl} = 0,001101/0,0007 = 1,57286.$$

Wartość krytyczna  $F_{kryt}$  dla poziomu istotności 0,01 i ilości stopni swobody  $f_{min} = n - 1 = 2$  oraz  $f_{max} = n - 1 = 2$  wynosi 99,00. Ponieważ  $1,57286 < 99,00$ , zatem nie było podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej i uznano, że wariancje są jednorodne. Można więc było przejść do wyznaczania współczynnika korelacji oraz parametrów równania prostej regresji.

#### Wyznaczanie współczynnika korelacji liniowej ( $r$ )

Współczynnik korelacji liniowej obliczono na podstawie danych z tabeli III w oparciu o wzór:

$$r = \frac{m \sum x_i y_{ij} - \sum x_i \sum y_{ij}}{\sqrt{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{m \sum y_{ij}^2 - (\sum y_{ij})^2}} \quad \{8\}$$

Odchylenie standardowe  $s_i$  pojedynczego pomiaru obliczono według wzoru:

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum y_{ij}^2 - \frac{(\sum y_{ij})^2}{n}}{n - 1}} \quad \{9\}$$

Współczynnik korelacji  $r$  był równy 0,99945, można było więc przyjąć, że w badanym zakresie stężeń zależność stężeń oznaczonych etanolu  $y_{ij}$  od stężeń prawdziwych  $x_i$  ma charakter liniowy.

#### Wyznaczanie współczynników równania prostej regresji

Współczynnik nachylenia prostej  $a$  wyznaczono ze wzoru:

$$a = \frac{m \sum x_i y_{ij} - \sum x_i \sum y_{ij}}{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \{10\}$$

Jego wartość była równa 1,007786. Następnie ze wzoru:

$$s_a = \sqrt{\frac{m \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{m^3} \frac{1 - r^2}{\bar{x}^2} \sum x_i^2} \quad \{11\}$$

obliczono odchylenie standardowe współczynnika nachylenia. Uzyskano wartość  $s_a = 0,03987$ . Wykres uzyskanych wartości stężenia etanolu  $y_{ij}$  jako funkcja teoretyczna powinien być liniowy ze współczynnikiem nachylenia  $a$  równym jedności i współczynnikiem przesunięcia  $b$  równym zero. Należało zatem postawić hipotezę zerową o równości współczynnika  $a$  z jednością ( $H_0: a - 1 = 0$ ) i hipotezę alternatywną o braku tej równości ( $H_1: a - 1 \neq 0$ ). Weryfikacja hipotezy zerowej polegała na obliczeniu statystyki

$$t_{obl} = \frac{a - 1}{s_a} \sqrt{n - m} \quad \{12\}$$

Uzyskano wartość  $t_{obl} = 0,75$ . Ponieważ  $t_{kryt}$  odczytane z tablic rozkładu t-Studenta dla  $\alpha = 0,05$  oraz 14 stopni swobody wynosi 2,14, zatem nie istniały podstawy do odrzucenia hipotezy zerowej.

Do obliczania współczynnika przesunięcia  $b$  zastosowano równanie:

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad \{13\}$$

i obliczono  $b = -0,01523$ .

Odchylenie standardowe współczynnika przesunięcia wyznaczono ze wzoru:

$$s_a = \sqrt{\frac{m \sum x_i^2 - \sum x_i^2 - 1 r^2}{m^2 - \sum x_i^2 - m \bar{x}^2}} \quad \{14\}$$

Obliczona wartość  $s_b = 0,25272$ . Na podstawie wartości  $b$  i  $s_b$  zbadano istotność współczynnika przesunięcia:  $t_{obl} = |b| / s_b = |-0,01523| / 0,25272 = 0,06026$ . Ponieważ  $t_{obl} = 0,06026 < t_{kryt} = 3,18$ , zatem współczynnik przesunięcia nie był istotny i w niektórych obliczeniach należało go pominąć.

Zależność:  $y$  (wartość oznaczona) =  $fx$  (wartość prawdziwa) =  $ax + b$ . Przedstawiła ją na rycinie 3.

#### Obliczenie współczynnika zmienności metody

Resztowe odchylenie standardowe  $s_y$  obliczono według wzoru:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_{iss}^2 - \frac{y_{reg}^2}{n} - 2 \sum y_i y_{reg}}{n - 2}} \quad \{15\}$$

Otrzymano wartość  $s_y = 0,0265$ .

Znając wartość resztowego odchylenia standardowego, odchylenie standardowe metody wyznaczono ze wzoru  $s_m = s_y / a$ :  $s_m = 0,0265 / 1,007786 = 0,02630$ .

Obliczono współczynnik zmienności  $v_m = s_y \cdot 100\% / (a \cdot x) = 1,96\%$ .

#### **Wyznaczanie błędu systematycznego $\delta_y$ i całkowitego metody $(RMSE)^{1/2}$**

Błąd systematyczny określa się w oparciu o współczynnik przesunięcia i współczynnik nachylenia prostej opisującej zależność wartości zmierzonej od prawdziwej. Oznacza się go symbolem  $\delta_y$  i jest on wynikiem błędu punktu zerowego  $b$  czyli błędu punktu przecięcia prostej z osią OY i błędu proporcjonalnego  $(a - 1)$ . Wyraża się go równaniem:

$$\delta_y = a - 1 \cdot x + b \quad \{16\}$$

Metoda  $(RMSE)^{1/2}$  (ang. relative mean square error) dobrze charakteryzuje błąd całkowity metody, na który składa się błąd przypadkowy  $s_i$  oraz błąd systematyczny  $\delta_y$ .

Średni błąd kwadratowy (MSE, ang. mean square error) dany jest wzorem

$$s_i^2 = \frac{\delta_y^2}{2} \quad \{17\}$$

a więc

$$RMSE = \frac{MSE}{x_i^2}, \quad \{18\}$$

zaś

$$RMSE^{1/2} = \frac{MSE^{1/2}}{x_i}, \quad \{19\}$$

gdzie  $x_i$  to stężenie prawdziwe etanolu deklarowane przez analityka.

W tabeli IV zebrano dane potrzebne do obliczenia błędu całkowitego metody ( $RMSE$ )<sup>1/2</sup>.

Na rycinie 4 przedstawiono wykres ( $RMSE$ )<sup>1/2</sup> w funkcji prawdziwego stężenia  $x_i$ .

Wykres ten ilustruje błąd całkowity metody. Na wykresie zaznaczono również ( $RMSE$ )<sup>1/2</sup><sub>ideal</sub> (liczony przy założeniu, że błąd systematyczny metody równy jest zeru).

#### DYSKUSJA

Przy ustalaniu, jakie związki chemiczne mogą być przyczyną braku selektywności metody oznaczania etanolu w płynach biologicznych w zakresie 0,2–3,0‰, uwzględniono dane z piśmiennictwa [5, 11]. Przedstawiona metoda pozwala na rozdzielenie etanolu od aldehydu octowego, metanolu, acetonu, eteru etylowego, izopropanolu, octanu etylu i wyższych alkoholi (rycina 1, tabela I). Jej selektywność jest wystarczająca dla diagnostyki ostrego zatrucia alkoholem etylowym, spełnia także kryteria stawiane jednej z dwóch metod wymaganych do celów dowodowych [3]. Wykres błędu całkowitego prezentowanej metody w funkcji stężenia nieomal pokrywa się z wykresem ( $RMSE$ )<sup>1/2</sup><sub>ideal</sub> i dla każdego stężenia w zakresie 0,2–3,0‰ błąd całkowity jest mniejszy niż 0,06‰ (rycina 4, tabela IV).

Można uznać, że w stosowanym zakresie stężeń etanolu opisane postępowanie analityczne nie jest obciążone błędem całkowitym większym od ±0,06‰.

Znaczny postęp, jaki dokonał się w dziedzinie aparatury używanej przy metodzie GC (t.j. możliwość zastosowania jednocześnie dwóch różnych kolumn kapilarnych o dużej sprawności rozdzielczej) daje szansę na szybką i wiarygodną diagnostykę przyczyny ostrego zatrucia różnymi związkami lotnymi. Do oznaczania etanolu w płynach biologicznych do celów dowodowych powinien być w miarę możliwości używany sprzęt nowoczesny i taki rzeczywiście jest coraz częściej stosowany w Polsce [1].

Jednak wobec skromnych publicznych środków finansowych przeznaczanych na ratowanie życia, należy poszukiwać także racjonalnych rozwiązań. Niniejsza praca stanowi właśnie propozycję takiego rozwiązania.

#### WNIOSKI

1. Opisana metoda analityczna jest wystarczająco selektywna do oznaczania stężenia etanolu w obecności aldehydu octowego, metanolu, acetonu, eteru etylowego, izopropanolu, octanu etylu oraz wyższych alkoholi.
2. Przedstawione postępowanie analityczne, z uwagi na prostotę wykonania, krótki czas analizy oraz spełnienie wymogu uzyskiwania błędu całkowitego

poniżej 0,06‰ w roboczym zakresie stężeń 0,2– 3,0‰, może być stosowane zarówno w diagnostyce ostrych zatruc, jak również do celów dowodowych.

**Podziękowania:**

Autorzy pragną podziękować Panom K. Normantowiczowi i T. Szymańskiemu za pomocną dyskusję i cenne uwagi.