

MEASUREMENT UNCERTAINTY IN DETERMINATION OF BLOOD ALCOHOL CONCENTRATION

Dariusz ZUBA

Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: Factors affecting measurement uncertainty in two methods of determination of blood alcohol concentration for forensic purposes: gas chromatography with use of the headspace technique and the ADH enzymatic method (spectrophotometric method) were analysed in this paper. The heterogeneity of the analysed material contributes most to analytical error, comprising from about 45% to about 65% of the total measurement uncertainty, depending on the method. This observation is very important, because many of the methods of determination of precision do not take into consideration assessment of error linked to the heterogeneity of the material. The value of the measurement uncertainty was also determined on the basis of the error propagation law, amounting to 7.0% for the chromatographic method and 5.7% for the ADH enzymatic method. When we take into consideration that each positive result of alcohol concentration is calculated in the Institute of Forensic Research on the basis of two independent analyses by means of the GC method and two analyses by means of the ADH enzymatic method, the error of blood alcohol concentration determination amounts to 3.6%. These results were compared with the values of errors estimated on the basis of routine determination. The error amounted to 6.0% for the GC method and 3.4% for the ADH enzymatic method. The performed theoretical analysis and the experimental results indicate that an uncertainty of alcohol concentration determination equal to 0.05‰ for concentrations lower than 1.0‰ and equal to 5% for higher concentrations should be assumed. These assumptions enable us to take into account in the obtained results all of the errors that can occur during the carrying out of analyses.

KEY WORDS: Uncertainty; Error; Alcohol.

Problems of Forensic Sciences, vol. LIV, 2003, 113–136

Received 18 December 2003; accepted 23 December 2003

INTRODUCTION

The analysis of biological material for alcohol content is the most frequently performed analysis in forensic laboratories. Forensic laboratories of Police Voivodeship Commands, the Institute of Forensic Research and departments of forensic medicine perform a total of over 100 000 blood alcohol analyses a year. One should remember that according to Article 126 of the

Law of 20 June 1997 on Traffic Rules¹, testing to establish alcohol content in the body is performed using electronic devices measuring alcohol concentration in expired air, and a blood sample is collected only in strictly specified cases.

The basis of assessment of the tested person's sobriety is obviously blood alcohol concentration (or breath concentration), but knowledge of the magnitude of analytical error occurring during analysis is essential for correct interpretation of the obtained results. One should remember that each measurement of the physicochemical quantity is burdened with a certain error, which is called "random error". It is independent of the person performing the measurement, and therefore it is impossible to eliminate it. One should remember that it is not error committed "accidentally", but independent of the analyst. The necessity of assessment of the magnitude of analytical error is imposed by the ISO/IEC 17025:2000 norm "General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories"², which states in Section no 5.10.3 that information on uncertainty is needed in test reports when it is relevant to the validity or application of test results, when a client's instructions so require, or when the uncertainty affects compliance to a specification limit. In order to make readers aware of the presented problem, one should consider the case where the analytical result exceeds the threshold value slightly. In Poland, the sobriety thresholds were defined in the Law of 26 October 1982 on Education in Sobriety and Counteracting Alcoholism³. There, it was stated that "a state after use of alcohol" occurs when the blood alcohol concentration is between 0.2‰ and 0.5‰, and "a state of drunkenness" – when blood alcohol concentration is higher than 0.5‰. In a situation, for example, where the alcohol concentration determined analytically amounts to 0.53‰, a comparison with sobriety thresholds allows us to state that the tested person was "in a state of drunkenness". However, when a method which is used to determine this concentration is characterised by an error of e.g. 0.10‰, one should assume that the real alcohol concentration is situated in a range of 0.43‰–0.63‰, and the decision as to whether the person was "in a state after use of alcohol" or "in a state of drunkenness" is not so simple. Usually, according to the rule in dubio pro reo, the result is interpreted to the advantage of the tested person. This problem is even clearer for alcohol concentrations about 0.2‰, when selection of the concentration below the threshold value means that the tested blood is "free" of alcohol, and the tested person does not suffer the legal consequences. Interpretation

¹ Published in official journal of the Republic of Poland, consolidated version, *Journal of Laws* of 2003, No. 58, item 515.

² ISO/IEC 17025:2000 norm "General Requirements concerning the Competence of Testing and Calibration Laboratories".

³ Consolidated version, *Journal of Laws* of 2002, No. 147, item 1231.

of the (above) case with the blood alcohol concentration of 0.53‰ would be different if the analytical error amounted to, for example, 0.02‰. Then we should assume that the real alcohol concentration is situated in a range between 0.51‰–0.55‰, and thus the alcohol concentration corresponds to “a state of drunkenness”, even when we take the lowest value. We see that a correct interpretation of the result is possible only in a situation where the analytical error of the method is known. One should remember that this value should take into account not only the precision of the instrument which is used for the measurements, e.g. chromatograph or spectrophotometer, but also the error involved in the estimation of pipette volume, weighing, alcohol concentration in the standard solutions and the heterogeneity of the analysed material. The above mentioned ISO/IEC 17025:2000 norm states that “the laboratory should at least attempt to identify all of the components of uncertainty and make a responsible estimation, and should ensure that the form of reporting of the results does not give a wrong impression of the uncertainty. When estimating the uncertainty of measurement, all uncertainty components which are of importance in the given situation should be taken into account using appropriate methods of analysis”.

MATERIAL AND METHODS

Alcohol concentration in biological material is determined in the Institute of Forensic Research by two methods: gas chromatography and the ADH enzymatic method. In the GC method, the headspace technique is applied and an HS 40 autosampler is used. Separation is performed on a 0.2% Carbowax 1500/Graphpack-GC column, at 100°C, with nitrogen as the carrier gas. A flame-ionisation detector (FID) is used for detection of ethanol presence in the stream of carrier gas. The determination of the ethanol by means of the ADH enzymatic method is performed using an EPOLL-20 spectrophotometer. Measurements are taken after heating of a sample to 30°C in a thermostat.

The gravimetric method was applied in order to estimate the precision of pipettes and other analytical equipment. It was performed by measurement of water mass (or blood mass in appropriate cases) – collected using an appropriate device – on a SCALTEC SBC-22 analytical balance with accuracy of 0.01 mg. Data from validation were applied to estimation of precision of measurements using analytical devices, when dozens of measurements for the same standard solution were performed. The error of alcohol concentration in the standard solutions was read from analytical certificates supplied by Merck KgaA, Darmstadt, Germany. The measurement uncertainty was

estimated on the basis of the document “Quantifying uncertainty in analytical measurement”, edited by Eurachem⁴.

RESULTS AND DISCUSSION

The determination of measurement uncertainty in the gas chromatographic method

The analysis of biological material, especially blood, for alcohol content is performed most often in forensic laboratories using the headspace technique, which, by its very nature, prevents contamination of the chromatographic column, is easy to automate and, furthermore, usually has better repeatability than with direct injection. The great advantage of the headspace technique is almost complete elimination of matrix effects, and therefore it is applied in the analysis of internal organs. In this technique, the blood sample is not analysed directly, but analysis is performed using the gaseous phase located above the sample, which is placed in a closed vial. The system should be in a state of equilibrium.

The procedure for alcohol determination by means of the gas chromatographic method is as follows: 1.8 ml of tert-butanol (1,1-dimethylethanol) solution with a concentration of 0.2 g/l, which is used as an internal standard, is introduced into a 22-ml vial and then 0.2 ml of blood (or other biological material) is added. The vial is capped and placed in the autosampler of the gas chromatograph. Because a flame-ionisation detector (FID) is used in determinations, the size of the analytical signal, i.e. area under the peak or its height, is proportional to the alcohol concentration in the sample.

Because of the fact that gas chromatography is not an absolute method, calibration using a given number of standard solutions should be performed in order to calculate alcohol concentration in the sample. The procedure of analysis of these solutions is analogous to the analysis of blood samples.

Thus, the factors influencing the uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method are:

V_S – the volume of blood sample collected for analysis,

V_{STD} – the volume of standard solution (or several standard solutions) collected for analysis,

V_{IS}^S – the volume of internal standard used in the analysis of the blood sample,

V_{IS}^{STD} – the volume of internal standard used in the analysis of the standard solution,

V_{Vial}^S – the volume of headspace vial used in the analysis of the blood sample,

⁴ <http://www.measurementuncertainty.org/>

- V_{Vial}^{STD} – the volume of headspace vial used in the analysis of the standard solution,
- R_s – the analytical signal (relative area under the peak) for ethanol in the analysis of the blood sample,
- R_{STD} – the analytical signal (relative area under the peak) for ethanol in the analysis of the standard solution,
- c_{STD} – the ethanol concentration in the standard solution (or several standard solutions).

In order to estimate the uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method, u_{GC} , a function combining alcohol concentration in the blood sample, c_s^0 , with the above mentioned variables should be presented:

$$c_s^0 = f(V_s, V_{STD}, V_{IS}^S, V_{IS}^{STD}, V_{Vial}^S, V_{Vial}^{STD}, R_s, R_{STD}, c_{STD}). \quad \{1\}$$

In order to do that, one should analyse the analytical process in detail. At the first stage, the blood sample is dissolved by the internal standard solution. Thus, the alcohol concentration in the obtained diluted blood sample amounts to:

$$c_s^L = c_s^0 \cdot \frac{V_s}{V_s + V_{IS}^S}; \quad \{2a\}$$

Similarly, for the standard solution:

$$c_{STD}^L = c_{STD} \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}}. \quad \{2b\}$$

Because the system is in equilibrium, one could write on the basis of Henry's law:

$$c_s^G = \frac{c_s^L}{K_H + \frac{V_s^G}{V_s^L}}, \quad \{3a\}$$

$$c_{STD}^G = \frac{c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{STD}^G}{V_{STD}^L}}, \quad \{3b\}$$

where: c_s^G and c_{STD}^G are the equilibrium alcohol concentrations in the blood sample and in the standard solution; V_s^G and V_{STD}^G – the volume of the gaseous phase in the headspace vial in the analysis of sample and standard; V_s^L and V_{STD}^L – the volume of liquid phase in the headspace vial in the analysis of sample and standard; K_H – Henry's constant for ethanol.

Because FID is a mass detector:

$$R_S = k_{FID} \cdot m_S^G = k_{FID} \cdot V_S^G \cdot c_S^G, \quad \{4a\}$$

$$R_{STD} = k_{FID} \cdot m_{STD}^G = k_{FID} \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G. \quad \{4b\}$$

From equation {4b}:

$$k_{FID} = \frac{R_{STD}}{V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G}. \quad \{5\}$$

When we combine equations {4a} and {5} we obtain:

$$R_S = \frac{R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^G}{V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G}; \quad \{6\}$$

$$R_S \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G = R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^G. \quad \{7\}$$

When we insert c_S^G and c_{STD}^G from equations {3a} and {3b} we obtain:

$$\frac{R_S \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{STD}^G}{V_{STD}^L}} = \frac{R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_S^G}{V_S^L}}. \quad \{8\}$$

Because $V_S^G = V_{Vial}^S - V_S^L$ and $V_{STD}^G = V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L$, equation {8} assumes the following form:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{(V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L)}{V_{STD}^L}} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S^L) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{(V_{Vial}^S - V_S^L)}{V_S^L}}; \quad \{9\}$$

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD}^L} - 1} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S^L) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S^L} - 1}. \quad \{10\}$$

Because $V_S^L = V_S + V_{IS}^S$ and $V_{STD}^L = V_{STD} + V_{IS}^{STD}$, equation {10} assumes the following form:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}} - 1} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S + V_{IS}^S} - 1}. \quad \{11\}$$

When we insert expressions for and from equations {2a} and {2b} we obtain:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}}{\left(K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}} - 1\right) \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD})} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^0}{\left(K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S + V_{IS}^S} - 1\right) \cdot (V_S + V_{IS}^S)} \quad \{12\}$$

When we transform the above equation we obtain:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}}{K_H \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD}) + V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^0}{K_H \cdot (V_S + V_{IS}^S) + V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S} \quad \{13\}$$

Thus:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD} \cdot (K_H \cdot (V_S + V_{IS}^S) + V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S)}{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot (K_H \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD}) + V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD})} \quad \{14\}$$

In cases where: $V_{Vial}^S = V_{Vial}^{STD}$ and $V_S = V_{STD}$ and $V_{IS}^S = V_{IS}^{STD}$, equation {14} assumes the very simple form:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot c_{STD}}{R_{STD}} \quad \{15\}$$

Equation {15} is the form commonly used in quantitative analysis. However, for determination of measurement uncertainty, it is necessary to know the relationship between c_S^0 and all original variables that could influence the measurement result.

The error of determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method, s_{GC} , could be calculated from the error propagation law. In this case, it could be written in the following form:

$$s_{GC}^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial c_S^0}{\partial X_i} \right)^2 \cdot \partial X_i, \quad \{16\}$$

where X_i stands for the variables: $V_S, V_{STD}, V_{IS}^S, V_{IS}^{STD}, V_{Vial}^S, V_{Vial}^{STD}, R_S, R_{STD}, c_{STD}$.

The volumes of the individual values were assumed in accordance with values used in routine analyses (see above); the values of analytical signals were assumed on the basis of alcohol determinations in standard solutions, prepared on a base of blood and water, with alcohol concentration of 1.0‰. The error of volume measurement was determined by means of the gravimetric method (details in “Material and methods” section), the error of the

analytical signal from validation data, and the error of alcohol concentration in the standard – from the analytical certificate.

The total standard deviation amounted to 0.035%. The measurement uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method was ascertained using the following equation:

$$u_{GC} = 2s_{GC} \cdot \quad \{17\}$$

The value of u_{GC} amounted to 0.070%. When we take into consideration that the analyses were performed with use of a standard with alcohol concentration of 1.0% one could assume that the relative measurement uncertainty amounted to 7.0%.

If we assume that the individual variables influencing uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method are independent, we can determine their participation in the total error. The values of these variables are shown in Table I.

TABLE I. THE CONTRIBUTION OF INDIVIDUAL VARIABLES INFLUENCING UNCERTAINTY OF DETERMINATION OF ALCOHOL CONCENTRATION BY MEANS OF THE GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

Variable	Contribution to measurement uncertainty [%]
The volume of blood sample	45.3
The volume of standard solution	2.1
The volume of internal standard used in the analysis of the blood sample	0.5
The volume of internal standard used in the analysis of the standard	0.5
The volume of the headspace vial used in the analysis of the blood sample	1.3
The volume of the headspace vial used in the analysis of the standard	1.3
The analytical signal for ethanol in the analysis of the blood sample	16.5
The analytical signal for ethanol in the analysis of the standard	15.6
The ethanol concentration in the standard solution	16.0
Henry's constant	0.9

From the data presented in Table I it is evident that the main factor that is responsible for the value of analytical error is the heterogeneity of the tested material. It causes the high contribution of the error of V_s value determination. Moreover, the uncertainty of determination of the analytical signal for sample and standard (R_s, R_{STD}) and, what may be surprising for some people, the error of alcohol concentration in the standard, c_{STD} , contribute significantly to the value of total uncertainty.

The determination of measurement uncertainty in the ADH enzymatic method

The ADH enzymatic method is an alternative method to gas chromatography and is particularly popular in clinical laboratories. In accordance with the recommendations of toxicological organisations, in forensic laboratories, because of their specificity, each result should be based on measurements made by means of two methods that are based on different physicochemical principles. In the ADH enzymatic method, selective absorption of electromagnetic radiation with a wavelength of 240 nm by the reduced form of NADH is applied; thus it is a spectrophotometric method. In the determination, the following reaction is used:



The equilibrium of the above reaction is shifted in the direction of alcohol formation, therefore, in order to ensure a quantitative reaction of substrates, a compound binding the reaction products is added to the reagent.

The procedure for alcohol determination by means of the ADH enzymatic method is as follows: in order to deproteinate the sample, 1.8 ml of trichloroacetic acid is added to 0.2 ml of blood sample (or other biological material). Then 0.1 ml of the supernatant is placed in a measurement cuvette and 1.5 ml of ADH reagent is added. The spectrophotometric measurement is performed after heating of sample to 30°C. The size of analytical signal, i.e. absorbance, is proportional to the alcohol concentration in a sample.

Because of the fact that spectrophotometry, similarly to gas chromatography, is not an absolute method, calibration should be performed in order to calculate alcohol concentration in the tested sample. The procedure for analysis of these solutions is analogous to the analysis of blood samples.

Thus, the factors influencing the uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the ADH enzymatic method are:

- V_S – the volume of blood sample collected for analysis,
- V_{STD} – the volume of standard solution (or several standard solutions) collected for analysis,
- V_{TCAA}^S – the volume of trichloroacetic acid solution used in the analysis of the blood sample,
- V_{TCAA}^{STD} – the volume of trichloroacetic acid solution used in the analysis of the standard,
- V_S^1 – the volume of supernatant collected for analysis (the deproteinated blood sample),

- V_{STD}^1 – the volume of standard solution collected for analysis after addition of trichloroacetic acid,
- V_{ADH}^S – the volume of ADH reagent used in the analysis of the blood sample,
- V_{ADH}^{STD} – the volume of ADH reagent used in the analysis of the standard solution,
- R_S – the analytical signal (absorbance) for ethanol in the analysis of the blood sample,
- R_{STD} – the analytical signal (absorbance) for ethanol in the analysis of the standard solution,
- l_S – the thickness of the measurement cuvette in the analysis of the blood sample,
- l_{STD} – the thickness of the measurement cuvette in the analysis of the standard solution,
- c_{STD} – the ethanol concentration in the standard solution (or several standard solutions).

In order to estimate the uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the ADH enzymatic method, u_{ADH} , the function linking alcohol concentration in blood sample, c_S^0 , with the above mentioned variables should be expressed:

$$c_S^0 = f(V_S, V_{STD}, V_{TCAA}^S, V_{TCAA}^{STD}, V_S^1, V_{STD}^1, V_{ADH}^S, V_{ADH}^{STD}, R_S, R_{STD}, l_S, l_{STD}, c_{STD}). \quad \{18\}$$

In order to carry this out, one should analyse the analytical process in detail. In the first stage, the blood sample is deproteinated using trichloroacetic acid. Thus, the alcohol concentration in the obtained blood sample amounts to:

$$c_S^1 = c_S^0 \cdot \frac{V_S}{V_S + V_{TCAA}^S}. \quad \{19a\}$$

Similarly for the standard solution:

$$c_{STD}^1 = c_{STD}^0 \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{TCAA}^{STD}}, \quad \{19b\}$$

where c_S^1 and c_{STD}^1 are the mean alcohol concentration in the blood sample and in the standard respectively after addition of trichloroacetic acid.

Then the prepared samples of blood and standard (V_S^1 and V_{STD}^1) are placed in the measurement cuvette and the ADH reagent is added in the

amounts of V_{ADH}^S and V_{ADH}^{STD} . Thus, the obtained ethanol concentrations amount to:

$$c_S^2 = c_S^1 \cdot \frac{V_S^1}{V_S^1 + V_{ADH}^S} = c_S^0 \cdot \frac{V_S}{V_S + V_{TCAA}^S} \cdot \frac{V_S^1}{V_S^1 + V_{ADH}^S}, \quad \{20a\}$$

$$c_{STD}^2 = c_{STD}^1 \cdot \frac{V_{STD}^1}{V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD}} = c_{STD}^0 \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{TCAA}^{STD}} \cdot \frac{V_{STD}^1}{V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD}}. \quad \{20b\}$$

From Lambert-Beer's law:

$$R_S = \varepsilon \cdot l_S \cdot c_S^2 \quad \{21a\}$$

$$R_S = \varepsilon \cdot l_{STD} \cdot c_{STD}^2 \quad \{21b\}$$

Dividing equation {21a} by {21b} we obtain:

$$\frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{\varepsilon \cdot l_S \cdot c_S^2}{\varepsilon \cdot l_{STD} \cdot c_{STD}^2} = \frac{l_S \cdot c_S^2}{l_{STD} \cdot c_{STD}^2}. \quad \{22\}$$

Inserting expressions from equations {20a} and {20b} instead of and:

$$\frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{l_S \cdot c_S^0}{l_{STD} \cdot c_{STD}^0} \cdot \frac{V_S \cdot (V_{STD} + V_{TCAA}^{STD})}{V_{STD} \cdot (V_S + V_{TCAA}^S)} \cdot \frac{V_S^1 \cdot (V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD})}{V_{STD}^1 \cdot (V_S^1 + V_{ADH}^S)}. \quad \{23\}$$

From equation {23}:

$$c_S^0 = \frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{l_S \cdot c_{STD}^0}{l_S} \cdot \frac{V_{STD} \cdot (V_S + V_{TCAA}^S)}{V_S \cdot (V_{STD} + V_{TCAA}^{STD})} \cdot \frac{V_{STD}^1 \cdot (V_S^1 + V_{ADH}^S)}{V_S^1 \cdot (V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD})}. \quad \{24\}$$

When $V_S = V_{STD}$ and $V_{TCAA}^S = V_{TCAA}^{STD}$ and $V_S^1 = V_{STD}^1$ and $V_{ADH}^S = V_{ADH}^{STD}$, equation {24} assumes the form:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot c_{STD}^0}{R_{STD}}, \quad \{25\}$$

which is similar to equation {15}. The difference between these equations results from different dimensions of the analytical signals.

Similarly to the gas chromatographic method, the error of determination of alcohol concentration by means of the ADH enzymatic method, , can be calculated from the error propagation law. In this case it can be written in the following form:

$$s_{ADH}^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial c_S^0}{\partial Y_i} \right)^2 \cdot \partial Y_i, \quad \{26\}$$

where: Y_i stand for variables: $V_S, V_{STD}, V_{TCAA}^S, V_{TCAA}^{STD}, V_S^1, V_{STD}^1, V_{ADH}^S, V_{ADH}^{STD}, R_S, R_{STD}, R_S, R_{STD}, I_S, I_{STD}, c_{STD}, c_{STD}$.

The volumes of the individual values were assumed in accordance with the values used in routine analyses (see above); the values of analytical signals were assumed on the basis of alcohol determinations in the standard solutions prepared on a base of blood and water, with alcohol concentration of 1.0‰. The error of volume measurement was determined by means of the gravimetric method (details in the “Material and methods” section), the error of the analytical signal from validation data, and the error of alcohol concentration in standard – from the analytical certificate.

The total standard deviation amounted to 0.028‰. The measurement uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the ADH enzymatic method was determined from the formula:

$$u_{ADH} = 2s_{ADH} \cdot \quad \{27\}$$

The value of amounted to 0.057‰. When we take into consideration that the analyses were performed with use of a standard with alcohol concentration of 1.0‰ one could assume that the relative measurement uncertainty amounted to 5.7%.

If we assume that the individual variables influencing uncertainty of determination of alcohol concentration by means of the ADH enzymatic method are independent, we can determine their participation in the total error value. The values for these variables are presented in Table II.

TABLE II. THE CONTRIBUTION OF INDIVIDUAL VARIABLES INFLUENCING UNCERTAINTY OF DETERMINATION OF ALCOHOL CONCENTRATION BY MEANS OF THE ADH ENZYMATIC METHOD

Variable	Contribution to measurement uncertainty [%]
The volume of blood sample	64.8
The volume of standard solution	3.2
The volume of trichloroacetic acid solution used in the analysis of blood	0.4
The volume of trichloroacetic acid solution used in the analysis of standard	0.4
The volume of supernatant collected for analysis	0.5
The volume of standard solution collected for analysis after addition of trichloroacetic acid	0.5
The volume of ADH reagent used in the analysis of the blood sample	4.4
The volume of ADH reagent used in the analysis of the standard	4.4
The analytical signal for ethanol in the analysis of blood	1.9
The analytical signal for ethanol in the analysis of the standard	1.9
Thickness of the measurement cuvette in the analysis of the blood sample	0.1
Thickness of the measurement cuvette in the analysis of the standard	0.1
The ethanol concentration in the standard solution	17.4

As the data collected in Table II show, the main factor which is responsible for the value of analytical error in the ADH enzymatic method – similarly

to the gas chromatographic method – is the heterogeneity of the tested material. It causes the high contribution of the error of V_S value determination. Moreover, the uncertainty of determination of alcohol concentration in the standard, c_{STD} , contributes significantly to the value of total uncertainty. In the ADH enzymatic method (spectrophotometric method), the values of error of the analytical signal determination for the sample and standard (R_S, R_{STD}) have a smaller influence on the value of total error.

Measurement uncertainty of alcohol determination

When we take into consideration that the final result of alcohol concentration is calculated on the basis of duplicated independent analysis by means of the GC method and duplicated independent analysis by means of the ADH enzymatic method, the error of determination of alcohol concentration can be calculated from the following formula:

$$s_{TOTAL} = \sqrt{\frac{2s_{GC}^2 + 2s_{ADH}^2}{n(n-1)}}, \quad \{28\}$$

where n is the number of measurements ($n = 4$).

The value of the standard deviation calculated on the basis of equation {28} amounted to 0.018 ‰. Thus, the measurement uncertainty of determination of alcohol concentration using the above procedure amounted to 0.036‰, (the relative measurement uncertainty – 3.6%).

Assessment of measurement error on the basis of routine determinations

The error of determination of blood alcohol concentration was also calculated on the basis of 204 randomly chosen “positive” results of alcohol concentrations, obtained at the turn of April and May 2003. As was mentioned above, each blood sample is analysed in duplicate by means of the GC method and in duplicate by means of the ADH enzymatic method. In a case of repeated measurements, their error could be determined on the basis of the following formula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (c_{1i} - c_{2i})^2}{2k}}, \quad \{29\}$$

where c_{1i} i c_{2i} are the first and second result of the i -th sample, and k is the number of samples ($k = 204$).

The standard deviation for the GC method amounted to 0.074 ‰. When we take into consideration that the mean alcohol concentration was 2.46‰, we can state that the value of relative error amounted to 3.0%. Taking into

account formula {17}, the value of measurement uncertainty for the gas chromatographic method amounts to 6.0%.

The mean error for the ADH enzymatic method amounted to 0.040‰. When we take into consideration that the mean alcohol concentration was 2.46‰, we can state that the value of relative error amounted to 1.6%. Taking into account formula {27}, the value of measurement uncertainty for the ADH enzymatic method amounts to 3.2%.

The standard deviation of alcohol concentration when applying the procedure used in the Institute of Forensic Research (two independent GC analyses and two independent ADH analyses), calculated on the basis of formula {28}, was 0.034‰, and the measurement uncertainty, 0.068‰. Taking into consideration that the mean alcohol concentration was 2.46‰, one should assume that the uncertainty of determination of alcohol concentration according to the above procedure amounts to 2.8%.

CONCLUSIONS

The performed studies allow us to estimate the measurement uncertainty in the determination of alcohol concentration by means of the gas chromatographic method and also the ADH enzymatic method, and to assess which factors contribute to the value of total error to the greatest extent.

The value of measurement uncertainty calculated on the basis of the error propagation law for the GC method amounted to 7.0%, and for the ADH method: 5.7%. The main factor influencing the error is the heterogeneity of the analysed material (45% and 65% for the GC and ADH method respectively) and the error of alcohol concentration in the standard solution. The measurement uncertainty estimated on the basis of routine determinations amounted to 6.0% for the GC method and 3.2% for the ADH method.

The measurement uncertainty in determination of alcohol concentration in accordance with the procedure used at the Institute of Forensic Research, i.e. two independent GC analyses and two independent ADH analyses, is lower than 4.0% (3.6% – when calculated from the error propagation law, and 2.8% – on the basis of routine determinations).

The performed theoretical analysis and the experimental results show that the uncertainty of alcohol concentration determination should be assumed to be 0.05‰ for concentrations lower than 1.0‰, and 5% for higher concentrations. This assumption allows us to take into account all of the errors that can occur during the performing of the analyses, in the obtained result.

NIEPEWNOŚĆ POMIAROWA WYZNACZANIA STĘŻENIA ALKOHOLU WE KRWI

Dariusz ZUBA

WPROWADZENIE

Badanie materiału biologicznego na zawartość alkoholu jest najczęściej wykonywaną analizą w laboratoriach sądowych. Każdego roku laboratoria kryminalistyczne komend wojewódzkich policji, Instytut Ekspertyz Sądowych oraz katedry i zakłady medycyny sądowej przeprowadzają łącznie ponad 100 tys. analiz krwi na zawartość alkoholu, a należy zaznaczyć, że w myśl art. 126 ustawy z dnia 20 czerwca 1997 r. Prawo o ruchu drogowym¹ badanie w celu ustalenia zawartości alkoholu w organizmie przeprowadza się przy użyciu urządzeń elektronicznych dokonujących pomiaru stężenia alkoholu w wydychanym powietrzu, a pobranie próbki krwi następuje tylko w ściśle określonych przypadkach.

Podstawą oceny trzeźwości badanej osoby jest oczywiście stężenie alkoholu we krwi (lub wydychanym powietrzu), jednak dla właściwej interpretacji uzyskanych wyników konieczna jest znajomość wielkości błędu analitycznego występującego podczas analizy. Należy pamiętać, że każdy pomiar wielkości fizykochemicznej obarczony jest pewnym błędem określanym jako błąd przypadkowy, który jest niezależny od osoby dokonującej pomiar, a więc taki, którego nie można wyeliminować. Należy zaznaczyć, że nie chodzi tu o błędy popełniane „przez przypadek”, tylko niezależne od analityka. Konieczność określenia wielkości błędu analitycznego narzuca norma ISO/IEC 17025:2000 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”², w której w pkt. 5.10.3 stwierdzono, że informacja dotycząca niepewności jest niezbędna w sprawozdaniach z badań wówczas, gdy ma to znaczenie dla miarodajności wyników badania lub ich zastosowania, kiedy wymagane jest to w wytycznych klienta lub kiedy niepewność ma znaczenie dla zgodności z wyspecyfikowanymi wartościami granicznymi. Aby bardziej uzmysłowić przedstawiony problem, należy rozważyć przypadek, gdy wynik analityczny nieznacznie przekracza wielkość progową. W Polsce progi trzeźwości określono w ustawie z dnia 26 października 1982 roku o wychowaniu w trzeźwości i przeciwdziałaniu alkoholizmowi³, gdzie podano, że „stan po użyciu alkoholu” występuje, gdy stężenie alkoholu we krwi wynosi między 0,2 a 0,5‰, natomiast „stan nietrzeźwości” – dla stężeń alkoholu powyżej 0,5‰. W sytuacji, gdy wyznaczone analitycznie stężenie alkoholu wyniosło 0,53‰, to porównanie go z określonymi powyżej progami trzeźwości nakazywałoby stwierdzić, że badana osoba znajdowała się „w stanie nietrzeźwości”. Jeśli jednak metoda, którą wykorzystano do wyznaczenia tego stężenia charakteryzuje się błędem np. 0,10‰, to należy przyjąć, że rzeczywiste stężenie alkoholu mieści się

¹ Tekst jednolity: Dz. U. z 2003 r., nr 58, poz. 515.

² Norma europejska ISO/IEC 17025:2000 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”.

³ Tekst jednolity: Dz. U. z 2002 r., nr 147, poz. 1231.

w zakresie 0,43‰–0,63‰, a zatem określenie, czy dana osoba znajdowała się „w stanie po użyciu alkoholu” czy „w stanie nietrzeźwości”, nie jest tak jednoznaczne. Zwykle, zgodnie z zasadą *in dubio pro reo*, wynik interpretuje się „na korzyść” osoby badanej. Problem ten jest jeszcze bardziej wyraźny przy stężeniach alkoholu około 0,2‰, gdzie przyjęcie stężenia poniżej wartości progowej oznacza, że badana krew była „wolna” od alkoholu, a więc badana osoba nie ponosi żadnych konsekwencji prawnych. Interpretacja powyższego przypadku stężenia alkoholu we krwi równego 0,53‰ wyglądałaby inaczej, gdyby błąd analityczny wynosił np. 0,02‰. Wtedy należy przyjąć, że rzeczywiste stężenie alkoholu mieści się w zakresie 0,51–0,55‰, a zatem nawet przy przyjęciu najniższej z tych wartości stężenie alkoholu odpowiada „stanowi nietrzeźwości”. Właściwa interpretacja wyniku możliwa jest więc jedynie w przypadku znajomości błędu analitycznego metody. Należy jednocześnie pamiętać, że wielkość ta powinna uwzględniać nie tylko precyzję przyrządu, którym wykonujemy pomiar (np. chromatografu czy spektrofotometru), ale również błąd określania objętości pipet, błędy naważek, stężenia alkoholu w roztworach wzorcowych czy wreszcie niejednorodność badanego materiału. Wspomniana powyżej norma ISO/IEC 17025:2000 określa, że „laboratorium powinno starać się zidentyfikować wszystkie składniki niepewności i dokonać ich racjonalnego oszacowania oraz zapewnić, że sposób przedstawiania wyników nie daje błędnego wrażenia odnośnie do niepewności, a przy szacowaniu niepewności pomiaru powinny być wzięte pod uwagę wszystkie składniki niepewności, które są istotne w danej sytuacji, z uwzględnieniem odpowiednich metod analizy”.

MATERIAŁ I METODY

Stężenie alkoholu w materiale biologicznym wyznaczane jest w Instytucie Ekspertyz Sądowych dwiema metodami: chromatografii gazowej i enzymatycznej ADH. W metodzie GC wykorzystuje się technikę *headspace*, stosując autosampler HS 40. Rozdział dokonywany jest na kolumnie 0,2% Carbowax 1500 na Graphpack-GC w temperaturze 100°C z zastosowaniem azotu jako gazu nośnego. Do wykrycia obecności etanolu w strumieniu gazu nośnego wykorzystywany jest detektor płomienio-jonizacyjny (FID). Oznaczanie etanolu metodą enzymatyczną ADH prowadzone jest przy użyciu spektrofotometru EPOLL-20. Pomiar wykonywany jest po doprowadzeniu próbki do temperatury 30°C w termostacie.

Do wyznaczenia precyzji objętości pipet i innych przyrządów analitycznych wykorzystano metodę grawimetryczną poprzez pomiar masy wody (lub w odpowiednich przypadkach krwi) odmierzanej danym przyrządem za pomocą wagi analitycznej SCALTEC SBC-22 o dokładności 0,01 mg. Do wyznaczenia precyzji pomiarów za pomocą aparatów wykorzystano dane z walidacji, gdy wykonano kilkanaście pomiarów dla tego samego roztworu wzorcowego. Błąd stężenia alkoholu w jego roztworach wzorcowych odczytano z certyfikatów analitycznych dostarczanych przez dostawcę, firmę Merck KgaA (Darmstadt, Niemcy). Niepewność pomiarową oszacowano w oparciu o dokument „Quantifying uncertainty in analytical measurement”, wydany przez Eurachem⁴.

⁴ <http://www.measurementuncertainty.org>

WYNIKI I DYSKUSJA

Wyznaczenie niepewności pomiarowej w metodzie chromatografii gazowej

Analiza materiału biologicznego, w szczególności krwi, na zawartość alkoholu wykonywana jest najczęściej w laboratoriach sądowych z wykorzystaniem techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (*headspace analysis*), która z natury zapobiega zanieczyszczeniu kolumny chromatograficznej, jest łatwa do automatyzacji, a odtwarzalność jest zazwyczaj lepsza niż przy bezpośrednim nastrzyku. Dużą zaletą techniki *headspace* jest prawie kompletna eliminacja efektów matrycowych; dzięki temu znajduje ona zastosowanie w analizie narządów wewnętrznych. W technice tej analizie poddawana jest nie bezpośrednio próbka krwi, lecz faza gazowa znajdująca się nad próbką umieszczoną w zamkniętym naczyniu, a układ znajduje się w stanie równowagi.

Procedura oznaczenia alkoholu metodą chromatografii gazowej przebiega następująco: do naczynka o pojemności 22 ml wyprowadzane jest 1,8 ml roztworu tert-butanolu (1,1-dimetyloetanolu) o stężeniu 0,2 g/l, który pełni rolę wzorca wewnętrznego, a następnie dodaje się 0,2 ml próby krwi (lub innego materiału biologicznego). Naczynko jest kapslowane i umieszczane w autosamplerze chromatografu gazowego. Ponieważ w oznaczeniach stosowany jest detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), to wielkość sygnału analitycznego, tj. pole powierzchni pod pikiem lub jego wysokość, jest proporcjonalna do stężenia alkoholu w próbce. Ze względu na fakt, że chromatografia gazowa nie jest metodą absolutną, to aby wyznaczyć stężenie alkoholu w badanej próbce należy wykonać kalibrację, stosując określoną ilość roztworów wzorcowych. Procedura analizy tych roztworów jest analogiczna do analizy prób krwi.

Zmiennymi wpływającymi na niepewność wyznaczenie stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej są zatem:

- V_S – objętość próby krwi pobranej do badań,
- V_{STD} – objętość roztworu wzorcowego (lub kilku roztworów wzorcowych) pobrana do analizy,
- V_{IS}^S – objętość roztworu wzorca wewnętrznego użyta przy analizie próby krwi,
- V_{IS}^{STD} – objętość roztworu wzorca wewnętrznego użyta przy analizie roztworu wzorcowego,
- V_{Vial}^S – objętość naczynka do analizy *headspace* użyta przy analizie próby krwi,
- V_{Vial}^{STD} – objętość naczynka do analizy *headspace* użyta przy analizie roztworu wzorcowego,
- R_S – sygnał analityczny (względne pole powierzchni pod pikiem) dla etanolu przy analizie próby krwi,
- R_{STD} – sygnał analityczny (względne pole powierzchni pod pikiem) dla etanolu przy analizie roztworu wzorcowego,
- c_{STD} – stężenie etanolu w roztworze wzorcowym (lub kilku roztworów wzorcowych).

Aby oszacować niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej, u_{GC} , należy przedstawić funkcję wiążącą stężenie alkoholu w próbce krwi, c_S^0 , z wymienionymi powyżej zmiennymi:

$$c_S^0 = f(V_S, V_{STD}, V_{IS}^S, V_{IS}^{STD}, V_{Vial}^S, V_{Vial}^{STD}, R_S, R_{STD}, c_{STD}). \quad \{1\}$$

Aby tego dokonać, należy szczegółowo przeanalizować proces analityczny. W pierwszym etapie próbka krwi jest rozcieńczana roztworem wzorca wewnętrznego. Stężenie alkoholu w otrzymanej rozcieńczonej próbce krwi wynosi zatem:

$$c_S^L = c_S^0 \cdot \frac{V_S}{V_S + V_{IS}^S}; \quad \{2a\}$$

analogicznie dla roztworu wzorca:

$$c_{STD}^L = c_{STD} \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}}. \quad \{2b\}$$

Ponieważ układ jest w równowadze, to z prawa Henry'ego możemy zapisać, że:

$$c_S^G = \frac{c_S^L}{K_H + \frac{V_S^L}{V_S^G}}, \quad \{3a\}$$

$$c_{STD}^G = \frac{c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{STD}^L}{V_{STD}^G}}, \quad \{3b\}$$

gdzie: c_S^G i c_{STD}^G oznaczają równowagowe stężenia alkoholu w próbce krwi i roztworu wzorcowego, V_S^G i V_{STD}^G – objętość fazy gazowej w naczynku *headspace* przy analizie próbki i wzorca, V_S^L i V_{STD}^L – objętość fazy ciekłej w naczynku *headspace* przy analizie próbki i wzorca, K_H – stała Henry'ego dla etanolu.

Ponieważ FID jest detektorem masowym, zatem:

$$R_S = k_{FID} \cdot m_S^G = k_{FID} \cdot V_S^G \cdot c_S^G, \quad \{4a\}$$

$$R_{STD} = k_{FID} \cdot m_{STD}^G = k_{FID} \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G. \quad \{4b\}$$

Z równania {4b} wynika że:

$$k_{FID} = \frac{R_{STD}}{V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G}. \quad \{5\}$$

Łącząc równania {4a} i {5} otrzymujemy:

$$R_S = \frac{R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^G}{V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G}; \quad \{6\}$$

$$R_S \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^G = R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^G. \quad \{7\}$$

Wstawiając c_S^G oraz c_{STD}^G z równań {3a} i {3b}, otrzymujemy:

$$\frac{R_S \cdot V_{STD}^G \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{STD}^L}{V_{STD}^G}} = \frac{R_{STD} \cdot V_S^G \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_S^L}{V_S^G}}. \quad \{8\}$$

Ponieważ $V_S^G = V_{Vial}^S - V_S^L$ oraz $V_{STD}^G = V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L$, to równanie {8} przybiera postać:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{(V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L)}{V_{STD}^L}} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S^L) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{(V_{Vial}^S - V_S^L)}{V_S^L}}; \quad \{9\}$$

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD}^L) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD}^L} - 1} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S^L) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S^L} - 1}. \quad \{10\}$$

Ponieważ $V_S^L = V_S + V_{IS}^S$ oraz $V_{STD}^L = V_{STD} + V_{IS}^{STD}$, to równanie {10} przybiera postać:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}} - 1} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^L}{K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S + V_{IS}^S} - 1}. \quad \{11\}$$

Wstawiając wyrażenia na c_S^L oraz c_{STD}^L z równań {2a} i {2b}, otrzymujemy:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}}{\left(K_H + \frac{V_{Vial}^{STD}}{V_{STD} + V_{IS}^{STD}} - 1\right) \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD})} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^0}{\left(K_H + \frac{V_{Vial}^S}{V_S + V_{IS}^S} - 1\right) \cdot (V_S + V_{IS}^S)}. \quad \{12\}$$

Przekształcając powyższe równanie, otrzymujemy:

$$\frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD}}{K_H \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD}) + V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}} = \frac{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot c_S^0}{K_H \cdot (V_S + V_{IS}^S) + V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S}. \quad \{13\}$$

Zatem:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot (V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD}) \cdot c_{STD} \cdot (K_H \cdot (V_S + V_{IS}^S) + V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S)}{R_{STD} \cdot (V_{Vial}^S - V_S - V_{IS}^S) \cdot (K_H \cdot (V_{STD} + V_{IS}^{STD}) + V_{Vial}^{STD} - V_{STD} - V_{IS}^{STD})}. \quad \{14\}$$

W przypadku, gdy $V_{Vial}^S = V_{Vial}^{STD}$ oraz $V_S = V_{STD}$ oraz $V_{IS}^S = V_{IS}^{STD}$, równanie {14} przyjmuje bardzo prostą postać:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot c_{STD}}{R_{STD}}. \quad \{15\}$$

Równanie {15} ma postać powszechnie stosowaną w analizie ilościowej. Dla wyznaczenia niepewności pomiarowej konieczna jest jednak znajomość zależności c_S^0 od wszystkich zmiennych pierwotnych mogących wpłynąć na wynik pomiaru.

Błąd wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej, s_{GC} , obliczyć można z prawa propagacji błędów. W tym przypadku będzie miało ono postać:

$$s_{GC}^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial c_S^0}{\partial X_i} \right)^2 \cdot \partial X_i, \quad \{16\}$$

gdzie X_i oznacza zmienne: $V_S, V_{STD}, V_{IS}^S, V_{IS}^{STD}, V_{Vial}^S, V_{Vial}^{STD}, R_S, R_{STD}, c_{STD}$.

Wartości objętości poszczególnych wartości przyjęto zgodnie z wartościami stosowanymi w analizach rutynowych (patrz powyżej), wartości sygnałów analitycznych przyjęto na podstawie oznaczeń alkoholu w roztworach wzorcowych, przygotowanych na bazie krwi i wody, w których stężenie alkoholu wynosiło 1,0‰. Błąd pomiaru objętości wyznaczono metodą grawimetryczną (szczegóły w rozdziale „Ma-

teriał i metody”), błąd sygnału analitycznego z danych walidacyjnych, natomiast błąd stężenia alkoholu we wzorcu z certyfikatu analitycznego.

Całkowite odchylenie standardowe wynosiło 0,035%. Niepewność pomiarowa wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej wyznaczona została z wzoru:

$$u_{GC} = 2s_{GC} . \quad \{17\}$$

Wartość u_{GC} wyniosła 0,070%. Biorąc pod uwagę, że analizy wykonano z użyciem wzorców o stężeniu alkoholu wynoszącym 1,0‰, można przyjąć, że względna niepewność pomiarowa wynosiła 7,0%.

Zakładając, że poszczególne zmienne wpływające na niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej są niezależne, można wyznaczyć ich udział w całkowitej wartości błędu. Wartości te przedstawiono w tabeli I.

Jak wynika z danych zawartych w tabeli I, głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wartość błędu analitycznego jest niejednorodność materiału badawczego, co rzutuje na duży udział błędu wyznaczenia wartości V_S . Ponadto znaczny udział ma niepewność wyznaczenia sygnału analitycznego dla próbki i wzorca (R_S, R_{STD}) oraz, co może niektórym wydać się zaskakujące, błąd stężenia alkoholu we wzorcu c_{STD} .

Wyznaczenie niepewności pomiarowej w metodzie enzymatycznej ADH

Metoda enzymatyczna ADH jest metodą alternatywną do chromatografii gazowej i szczególnie popularną w laboratoriach klinicznych. Zgodnie z zaleceniami organizacji toksykologicznych, w laboratoriach sądowych, ze względu na ich specyfikę, każdy wynik powinien być oparty na pomiarach uzyskanych za pomocą dwóch metod różniących się podstawami fizykochemicznymi. W metodzie enzymatycznej ADH wykorzystuje się selektywną absorpcję promieniowania elektromagnetycznego o długości fali 240 nm przez zredukowaną formę NADH, jest to zatem metoda spektrofotometryczna. W oznaczeniu wykorzystywana jest reakcja:



Równowaga powyższej reakcji przesunięta jest w kierunku tworzenia alkoholu, dlatego, aby zapewnić ilościowe przereagowanie substratów do odczynnika dodawany jest związek wiążący produkty reakcji.

Procedura oznaczenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH przebiega następująco: do 0,2 ml próby krwi (lub innego materiału biologicznego) dodaje się 1,8 ml kwasu trójchlorooctowego w celu odbiałczenia próbki. Następnie do kuwety pomiarowej pobiera się 0,1 ml supernatantu i dodaje 1,5 ml odczynnika ADH. Po doprowadzeniu próbki do temperatury 30°C dokonuje się pomiaru spektrofotometrycznego. Wielkość sygnału analitycznego, tj. absorbancji, jest proporcjonalna do stężenia alkoholu w próbce. Ze względu na fakt, że spektrofotometria, podobnie jak chromatografia gazowa, nie jest metodą absolutną, to aby wyznaczyć stężenie alkoholu w badanej próbce należy wykonać kalibrację. Procedura analizy tych roztworów jest analogiczna do analizy prób krwi.

Zmiennymi wpływającymi na niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH są zatem:

- V_S – objętość próby krwi pobranej do badań,
 V_{STD} – objętość roztworu wzorcowego (lub kilku roztworów wzorcowych) pobrana do analizy,
 V_{TCAA}^S – objętość roztworu kwasu trójchlorooctowego użyta przy analizie próby krwi,
 V_{TCAA}^{STD} – objętość roztworu kwasu trójchlorooctowego użyta przy analizie wzorca,
 V_S^1 – objętość supernatantu pobrana do badań (odbiałzonej próby krwi),
 V_{STD}^1 – objętość roztworu wzorcowego pobrana do analizy po dodaniu kwasu trójchlorooctowego,
 V_{ADH}^S – objętość odczynnika ADH użyta przy analizie próby krwi,
 V_{ADH}^{STD} – objętość odczynnika ADH użyta przy analizie roztworu wzorcowego,
 R_S – sygnał analityczny (absorbancja) dla etanolu przy analizie próby krwi,
 R_{STD} – sygnał analityczny (absorbancja) dla etanolu przy analizie roztworu wzorcowego,
 l_S – grubość kuwety pomiarowej przy analizie próby krwi,
 l_{STD} – grubość kuwety pomiarowej przy analizie roztworu wzorcowego,
 c_{STD} – stężenie etanolu w roztworze wzorcowym (lub kilku roztworów wzorcowych).

Aby oszacować niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH, u_{ADH} , należy przedstawić funkcję wiążącą stężenie alkoholu w próbce krwi, c_S^0 , ze wymienionymi powyżej zmiennymi:

$$c_S^0 = f(V_S, V_{STD}, V_{TCAA}^S, V_{TCAA}^{STD}, V_S^1, V_{STD}^1, V_{ADH}^S, V_{ADH}^{STD}, R_S, R_{STD}, l_S, l_{STD}, c_{STD}). \quad \{18\}$$

W tym celu należy szczegółowo przeanalizować proces analityczny. W pierwszym etapie próbka krwi jest odbiałzana za pomocą kwasu trójchlorooctowego. Stężenie alkoholu w otrzymanej próbce wynosi zatem:

$$c_S^1 = c_S^0 \cdot \frac{V_S}{V_S + V_{TCAA}^S}. \quad \{19a\}$$

Analogicznie dla roztworu wzorca:

$$c_{STD}^1 = c_{STD}^0 \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{TCAA}^{STD}}, \quad \{19b\}$$

gdzie c_S^1 i c_{STD}^1 oznaczają stężenia etanolu w próbce krwi i wzorca po dodaniu kwasu trójchlorooctowego.

Następnie tak przygotowane próbki krwi i wzorca (V_S^1 i V_{STD}^1) umieszczane są w kuwecie pomiarowej i dodawany jest odczynnik ADH w ilości V_{ADH}^S i V_{ADH}^{STD} . Zatem uzyskane stężenia etanolu będą wynosić:

$$c_S^2 = c_S^1 \cdot \frac{V_S^1}{V_S^1 + V_{ADH}^S} = c_S^0 \cdot \frac{V_S}{V_S + V_{TCAA}^S} \cdot \frac{V_S^1}{V_S^1 + V_{ADH}^S}, \quad \{20a\}$$

$$c_{STD}^2 = c_{STD}^1 \cdot \frac{V_{STD}^1}{V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD}} = c_{STD}^1 \cdot \frac{V_{STD}}{V_{STD} + V_{TCAA}} \cdot \frac{V_{STD}^1}{V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD}} \quad \{20b\}$$

Z prawa Lamberta-Beera wynika, że:

$$R_S = \varepsilon \cdot l_S \cdot c_S^2, \quad \{21a\}$$

$$R_S = \varepsilon \cdot l_{STD} \cdot c_{STD}^2. \quad \{21b\}$$

Dzieląc równanie {21a} przez {21b}, otrzymujemy:

$$\frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{\varepsilon \cdot l_S \cdot c_S^2}{\varepsilon \cdot l_{STD} \cdot c_{STD}^2} = \frac{l_S \cdot c_S^2}{l_{STD} \cdot c_{STD}^2}. \quad \{22\}$$

Wstawiając zamiast c_S^2 i c_{STD}^2 wyrażenia z równań {20a} i {20b}:

$$\frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{l_S \cdot c_S^0}{l_{STD} \cdot c_{STD}} \cdot \frac{V_S \cdot (V_{STD} + V_{TCAA}^{STD})}{V_{STD} \cdot (V_S + V_{TCAA}^S)} \cdot \frac{V_S^1 \cdot (V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD})}{V_{STD}^1 \cdot (V_S^1 + V_{ADH}^S)}. \quad \{23\}$$

Z równania {23} wynika, że:

$$c_S^0 = \frac{R_S}{R_{STD}} = \frac{l_S \cdot c_{STD}}{l_S} \cdot \frac{V_{STD} \cdot (V_S + V_{TCAA}^S)}{V_S \cdot (V_{STD} + V_{TCAA}^{STD})} \cdot \frac{V_{STD}^1 \cdot (V_S^1 + V_{ADH}^S)}{V_S^1 \cdot (V_{STD}^1 + V_{ADH}^{STD})}. \quad \{24\}$$

Gdy $V_S = V_{STD}$, $V_{TCAA}^S = V_{TCAA}^{STD}$, $V_S^1 = V_{STD}^1$, $V_{ADH}^S = V_{ADH}^{STD}$ oraz $l_S = l_{STD}$, to równanie {24} przyjmuje postać:

$$c_S^0 = \frac{R_S \cdot c_{STD}}{R_{STD}}, \quad \{25\}$$

która jest zgodna z równaniem {15}. Różnica między tymi równaniami wynika z innego wymiaru sygnałów analitycznych.

Analogicznie do metody chromatografii gazowej, błąd wyznaczenia stężenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH, s_{ADH} , obliczyć można z prawa propagacji błędów. W tym przypadku będzie miało ono postać:

$$s_{ADH}^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial c_S^0}{\partial Y_i} \right)^2 \cdot \partial Y_i, \quad \{26\}$$

gdzie Y_i oznacza zmienne: $V_S, V_{STD}, V_{TCAA}^S, V_{TCAA}^{STD}, V_S^1, V_{STD}^1, V_{ADH}^S, V_{ADH}^{STD}, R_S, R_{STD}, I_S, I_{STD}, c_{STD}$.

Wartości objętości poszczególnych wartości przyjęto zgodnie z wartościami stosowanymi w analizach rutynowych (patrz powyżej), a wartości sygnałów analitycznych przyjęto na podstawie oznaczeń alkoholu w roztworach wzorcowych przygotowanych na bazie krwi i wody, w których stężenie alkoholu wynosiło 1,0‰. Błąd pomiaru objętości wyznaczono metodą grawimetryczną (szczegóły w rozdziale „Materiał i metody”), błąd sygnału analitycznego z danych walidacyjnych, natomiast błąd stężenia alkoholu we wzorcu z certyfikatu analitycznego.

Całkowite odchylenie standardowe wynosiło 0,028‰. Niepewność pomiarowa wyznaczenia stężenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH wyznaczona została ze wzoru:

$$u_{ADH} = 2s_{ADH}. \quad \{27\}$$

Wartość u_{ADH} wyniosła 0,057‰. Biorąc pod uwagę, że analizy wykonano z użyciem wzorców o stężeniu alkoholu wynoszącym 1,0‰, można przyjąć, że względna niepewność pomiarowa wyniosła 5,7%.

Zakładając, że poszczególne zmienne wpływające na niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu metodą enzymatyczną ADH są niezależne, można wyznaczyć ich udział w całkowitej wartości błędu. Wartości te przedstawiono w tabeli II.

Jak wynika z danych zawartych w tabeli II, głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wartość błędu analitycznego w metodzie enzymatycznej ADH, podobnie jak w metodzie chromatografii gazowej, jest niejednorodność materiału badawczego, co rzutuje na duży udział błędu wyznaczenia wartości V_s . Ponadto znaczny udział ma niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu we roztworze wzorcowym c_{STD} . W metodzie enzymatycznej ADH (spektrofotometrycznej) mniejszy wpływ na wartość błędu ma niepewność wyznaczenia sygnału analitycznego dla próbki i wzorca (R_s, R_{STD}).

Niepewność pomiarowa oznaczania alkoholu

Biorąc pod uwagę, że końcowy wynik stężenia alkoholu obliczany jest w oparciu o dwukrotną niezależną analizę metodą GC i dwukrotną niezależną analizę metodą enzymatyczną ADH, błąd wyznaczenia stężenia alkoholu można obliczyć z następującego wzoru:

$$s_{TOTAL} = \sqrt{\frac{2s_{GC}^2 + 2s_{ADH}^2}{n(n-1)}}, \quad \{28\}$$

gdzie n oznacza liczbę pomiarów ($n = 4$).

Obliczone na podstawie wzoru {28} odchylenie standardowe wyniosło 0,018‰. Niepewność pomiarowa wyznaczenia stężenia alkoholu przy zastosowaniu powyższej procedury wynosi zatem 0,036‰, czyli 3,6%.

Oszacowania błędu pomiarowego w oparciu o rutynowe oznaczenia

Błąd wyznaczenia stężenia alkoholu we krwi wyznaczono również w oparciu o losowo wybrane 204 „pozytywne” wyniki stężenia alkoholu uzyskane na przełomie kwietnia i maja 2003 roku. Jak wspomniano powyżej, każda próba krwi analizowana jest dwukrotnie metodą GC i dwukrotnie metodą enzymatyczną ADH. W przypadku powtórzonych pomiarów, ich błąd może być wyznaczony w oparciu o następujący wzór:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (c_{1i} - c_{2i})^2}{2k}}, \quad \{29\}$$

gdzie c_{1i} i c_{2i} oznaczają pierwszy i drugi wynik analizy i -tej próbki, natomiast k oznacza liczbę próbek ($k = 204$).

Odchylenie standardowe dla metody GC wyniosło 0,074‰, co po uwzględnieniu, że średnie stężenie alkoholu wynosiło 2,46‰ oznacza, że wartość błędu względnego wynosiła 3,0%. Biorąc pod uwagę wzór {17}, wartość niepewności pomiarowej dla metody chromatografii gazowej wynosi 6,0%.

Dla metody enzymatycznej ADH średni błąd wyniósł 0,040‰. Uwzględniając, że średnie stężenie alkoholu wynosiło 2,46‰, to wartość błędu analitycznego była

równa 1,6%. Biorąc pod uwagę wzór {27}, wartość niepewności pomiarowej dla metody enzymatycznej ADH wynosi 3,2%.

Odchylenie standardowe stężenia alkoholu przy zastosowaniu procedury stosowanej w Instytucie Ekspertyz Sądowych (2 niezależne analizy GC i 2 niezależne analizy ADH) obliczone na podstawie wzoru {28} wyniosło 0,034‰, zaś niepewność pomiarowa 0,068‰. Uwzględniając, że średnie stężenie alkoholu w analizowanych próbkach krwi wyniosło 2,46‰, to należy przyjąć, że niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu zgodnie z powyższą procedurą wynosi 2,8%.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwoliły na oszacowanie niepewności pomiarowej wyznaczenia stężenia alkoholu metodą chromatografii gazowej oraz metodą enzymatyczną ADH, a także ocenę, które zmienne mają największy udział w całkowitej wartości błędu.

Obliczona na podstawie prawa propagacji błędu wartość niepewności pomiarowej dla metody GC wyniosła 7,0%, zaś dla metody ADH 5,7%. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za błąd jest niejednorodność materiału poddanego badaniu (odpowiednio 45% i 65% dla metody GC i ADH) oraz błąd wyznaczenia stężenia w roztworach wzorcowych. Niepewność pomiarowa wyznaczona na podstawie wyników oznaczeń rutynowych wyniosła dla metody GC 6,0%, natomiast dla metody ADH 3,2%.

Niepewność wyznaczenia stężenia alkoholu zgodnie z procedurą stosowaną w Instytucie Ekspertyz Sądowych, tj. 2 niezależne analizy GC i 2 niezależne analizy ADH, wynosi poniżej 4% (3,6% – licząc z prawa propagacji błędu oraz 2,8% – na podstawie oznaczeń rutynowych).

Przeprowadzona analiza teoretyczna oraz wyniki doświadczalne wskazują, że przyjęcie niepewności wyznaczenia stężenia alkoholu jako 0,05‰ dla stężeń poniżej 1,0‰, natomiast dla wyższych stężeń 5%, pozwoli na uwzględnienie w otrzymanym wyniku wszystkich błędów, jakie mogą wystąpić podczas przeprowadzania analiz.