

ООО «Хромос»

РУКОВОДСТВО

пользователя аппаратно-программного комплекса «Хромос ГХ-1000»
по подготовке и проведению хроматографического анализа спиртов в жидких
биологических средах

Дзержинск,
2013

СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие требования	5
1.1 Сущность метода	5
1.2 Средства измерений, вспомогательные устройства и реактивы, применяемые для проведения анализа	5
1.2.1 Средства измерений	5
1.2.2 Вспомогательные устройства	5
1.2.3 Реактивы	5
1.3 Требования безопасности	6
1.4 Требования к квалификации операторов	6
1.5 Условия выполнения измерений	6
2. Подготовка к проведению анализа	7
2.1 Приготовление растворов	7
2.2 Подготовка образцов для градуировки	7
2.3 Градуировка хроматографа	7
2.3.1 Создание метода	7
2.3.2 Подготовка хроматографа перед градуировкой	9
2.3.3 Запись и обработка градуировочной хроматограммы	9
2.4 Контроль качества измерений	11
3. Проведение анализа	12
4. Работа с приложением «Определение спиртов»	12

1. Общие требования

1.1 Сущность метода

Метод основан на превращении спиртов в алкилнитриты, более летучие, чем спирты, и последующем газохроматографическом анализе равновесной паровой фазы над жидкой пробой. Чувствительность метода для этилового спирта составляет 0,01%. Расчет концентрации производят после градуировки по методу внутреннего стандарта.

В настоящее время рекомендованы к использованию следующие методики и нормативные документы определения алкоголя в биологических жидкостях:

- Методические указания № 06-14/33-14 от 01.09.1988 (с изм. от 12.08.2003)
- Методическое письмо № 10-95/14-32 от 22.04.68 с Дополнениями от 12.08.71 и методические указания о повышении качества исследований при количественном определении этилового спирта в крови и моче (1977 г.)
- МВИ массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне (Москва, 2010 г.)

1.2 Средства измерений, вспомогательные устройства и реактивы, применяемые для проведения анализа

1.2.1 Средства измерений

Аппаратно-программный комплекс «Хромос ГХ-1000» с детектором по теплопроводности или пламенно-ионизационным детектором;

1.2.2 Вспомогательные устройства

- компьютер с операционной системой Windows XP или выше
- колонка металлическая насадочная, длиной 2-3м, внутренним диаметром 2-3мм, заполненная согласно рабочей методике выполнения измерений
- флакон «пенициллиновый» вместимостью 10см³ (ФО-10-НС-1А)
- пробки резиновые к флаконам
- алюминиевые колпачки к флаконам
- устройство для обжима колпачков ПОК-1 или зажим для флаконов (ПФ-2)
- контейнер с завинчивающей крышкой
- флаконы темного стекла с пробками для хранения реактивов
- шприц газоплотный (1-2мл)

1.2.3 Реактивы

- трихлоруксусная кислота (ТХУ), квалификации не ниже «ХЧ»
- нитрит натрия (NaNO₂), ГОСТ 19906-74, квалификации не ниже «ХЧ»
- метанол, ГОСТ 2222-95, марка А
- этанол, содержание основного вещества — не менее 95%
- пропанол-2, квалификации не ниже «ХЧ»

- стандартные образцы состава водных растворов этанола ВРЭ-1 ГСО 7969-2001
- стандартные образцы состава водных растворов этанола ВРЭ-2 ГСО 8789-2006
- стандартный образец состава водного раствора пропанола-1 ВРП-1 (ЭМ 07.18.001) с массовой концентрацией 1 мг/см³

Примечание. Допускается применение иных средств измерений, вспомогательного оборудования, реактивов, метрологические и технические характеристики которых не уступают указанным выше.

1.3 Требования безопасности

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

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

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

В связи с тем, что электрическое питание хроматографа осуществляется от сети переменного тока напряжением 220В, должны соблюдаться «Правила технической эксплуатации электроустановок потребителей и правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей», изд. Энергоатомиздат, 1986.

1.4 Требования к квалификации операторов

К пробоподготовке и выполнению измерений допускают специалистов в высшим или средним специальным образованием, опытом работы на газовом хроматографе, освоивших методику.

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

Градуировку хроматографа осуществляет врач клинической лабораторной диагностики или врач судебно-медицинский эксперт.

1.5 Условия выполнения измерений

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

- температура воздуха $(20 \pm 5)^{\circ}\text{C}$
- атмосферное давление (84-106) кПа
- относительная влажность воздуха не более 80%

2. Подготовка к проведению анализа

2.1 Приготовление растворов

Перед выполнением измерений проводят следующие работы:

- приготовление водного раствора ТХУ с массовой долей 50%
- приготовление водного раствора нитрита натрия с массовой долей 30%
- приготовление водного раствора смеси спиртов

Растворы готовят в соответствии с рабочей МВИ. Возможно использование для градуировки прибора государственных стандартных образцов состава ВРЭ-1, выпускаемых в ампулах, а для ежедневного контроля — ГСО состава ВРЭ-2, выпускаемого во флаконах.

2.2 Подготовка образцов для градуировки

В пенициллиновый флакон вносят $0,5\text{см}^3$ раствора ТХУ, $0,5\text{см}^3$ раствора смеси спиртов с известной концентрацией и $0,5\text{см}^3$ раствора внутреннего стандарта (пропанола-1). Флакон закрывают резиновой пробкой, фиксируют алюминиевым колпачком или помещают в контейнер с закручивающей крышкой. Непосредственно перед анализом во флакон шприцем вводят 0,35мл раствора нитрита натрия, снова встряхивают флакон в горизонтальной плоскости (маяtkообразным движением) в течение 3-5сек и оставляют в покое на $60\pm 5\text{с}$.

2.3 Градуировка хроматографа

2.3.1 Создание метода

Перед градуировкой необходимо создать «пустой» метод в программе «Хромос». Для этого выбрать в строке главного меню «Метод» → «Новый» (Рис.1)

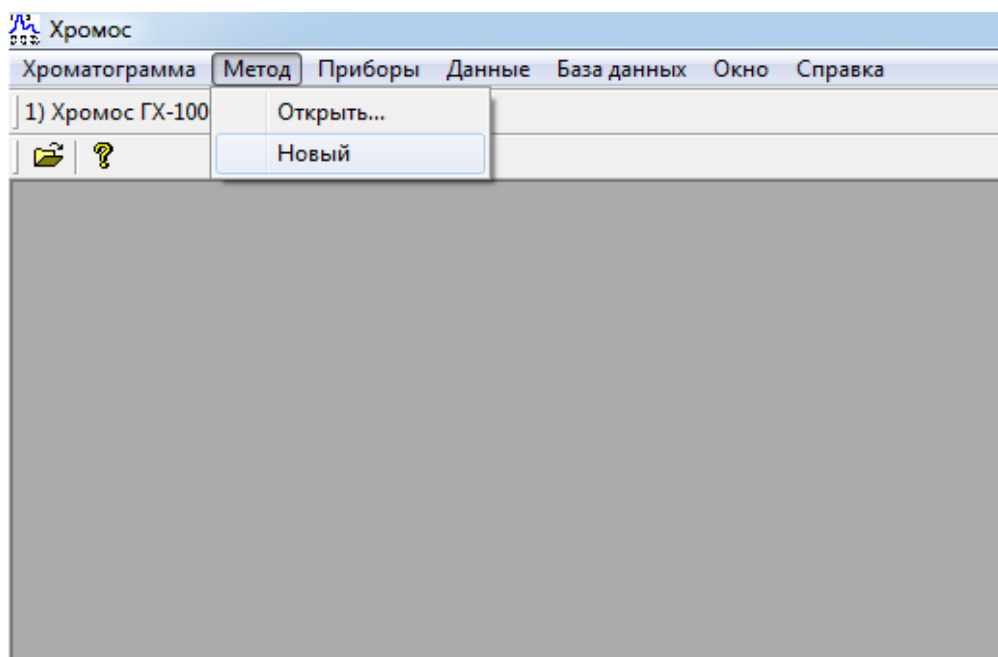


Рис. 1

В появившемся окне «Метод», закладка «Расчет», указать метод расчета — Внутренний стандарт (классический) и отклик — Площадь. (Рис.2)

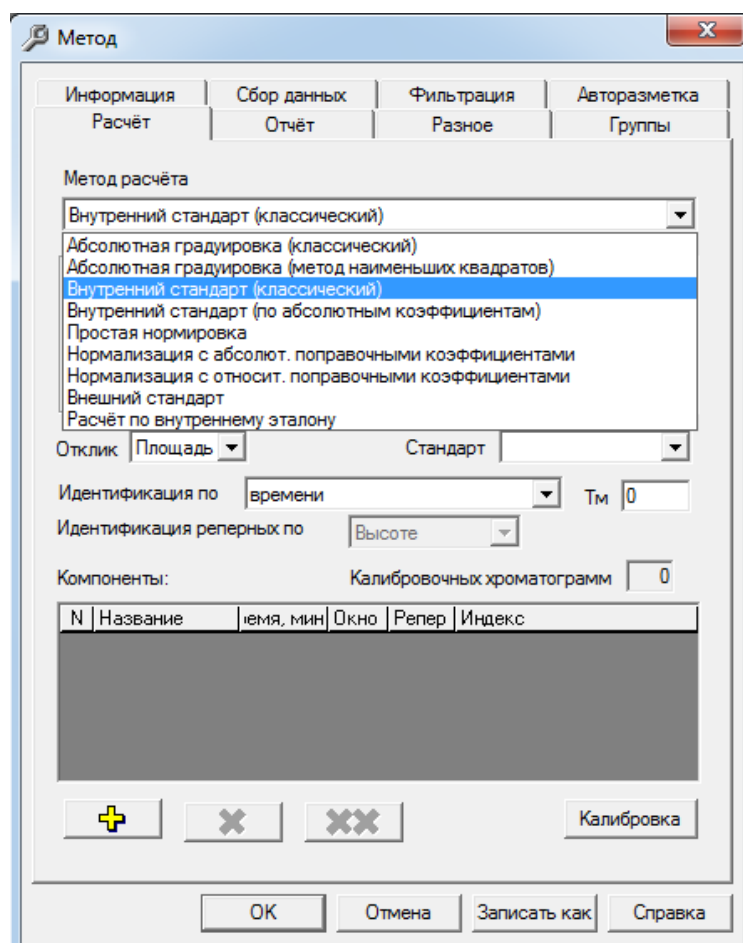


Рис.2

Нажать «OK», указать имя метода (например, спирты) и папку сохранения (обязательно Methods, иначе метод не отобразится в программе «Хромос») (Рис.3)

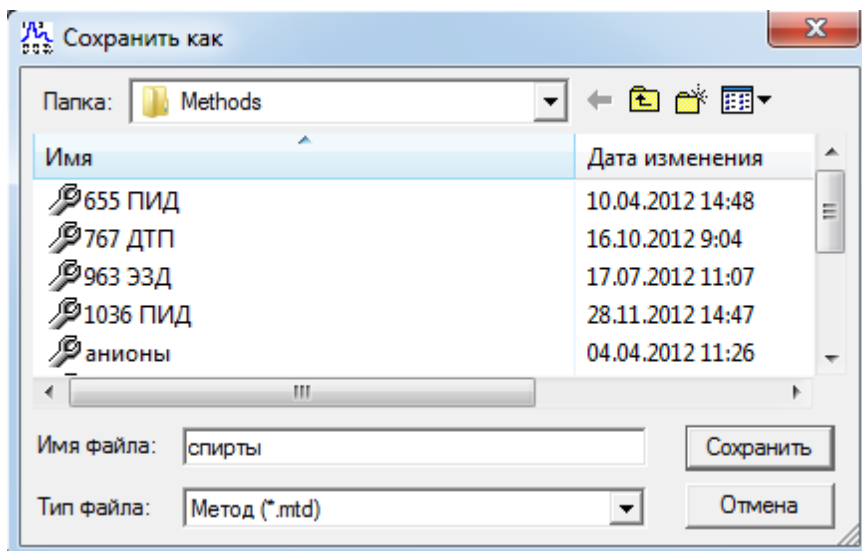


Рис.3

2.3.2 Подготовка хроматографа перед градуировкой

Перед включением хроматографа «Хромос ГХ-1000» необходимо ознакомиться с Руководством по эксплуатации на прибор и Руководством пользователя программным обеспечением «Хромос».

Открыть баллон с газом-носителем, включить компрессор, генератор водорода (если детектор - ПИД). Включить компьютер, хроматограф, запустить программу «Хромос». Установить связь между компьютером и хроматографом, нажав кнопку . Затем в установках прибора (кнопка ), внести температурные и газовые параметры по рабочей методике, напряжение моста ДТП и сохранить эти значения, отправив их в метод (кнопка «→ В метод»).

Рекомендуемые условия хроматографического анализа:

- температура термостата колонок 50-60 °С
- температура испарителя 100 °С
- температура детектора 100-150 °С
- расход газа-носителя (азот, гелий) 20-40 мл/мин
- расход водорода — 20 мл/мин (для ПИД)
- расход воздуха — 200 мл/мин (для ПИД)
- напряжение моста ДТП — 2-3 В (для ДТП)

Запустить канал на просмотр (кнопка ), увеличить, если нужно, время записи (кнопка ), дождаться выхода прибора на режим. При этом на хроматограмме не должно быть пиков и большого дрейфа нулевой линии.

2.3.3 Запись и обработка градуировочной хроматограммы

Приготовить градуировочный раствор по п. 2.2. Проколоть резиновую пробку флакона газоплотным шприцем, отобрать 0,5мл парогазовой фазы и немедленно ввести в испаритель. Запустить хроматограмму, нажав «Старт» на приборе.

По окончании записи разметить пики вручную или подобрать авторазметку пиков (см. Руководство пользователя и Методические указания по авторазметке). Присвоить хроматограмме статус «градуировочной», поставив в паспорте «галочку» в поле «Градуировочная». Назвать пики в таблице компонентов под хроматограммой, ввести концентрации спиртов и внутреннего стандарта (пропанол). В верхней строке меню программы выбрать «Метод» → «+Точка градуировки» (Рис.4)

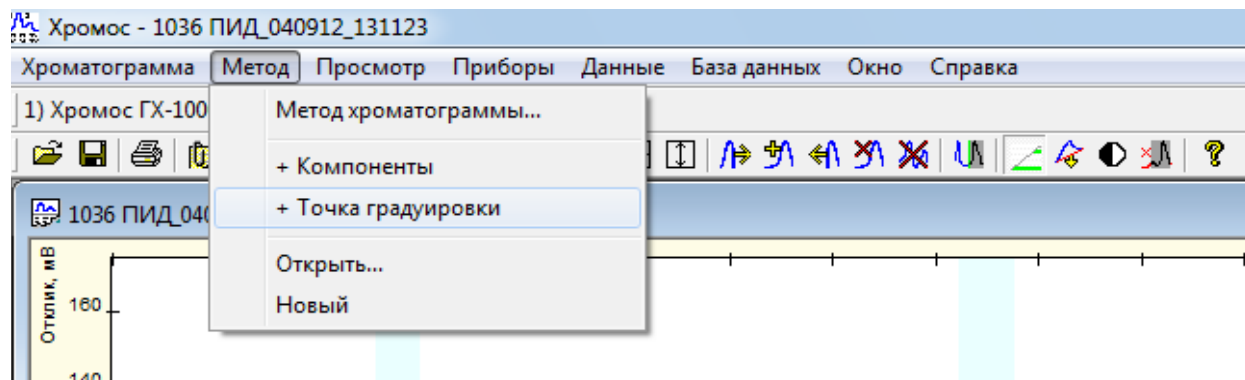


Рис. 4

В появившемся окне метода указать Стандарт — пропанол. В таблице компонентов появились названные компоненты с временами их удерживания. Чтобы расширить область определения компонента, необходимо в столбце «Окно» увеличить значение для выбранного компонента. (Рис.5)

Рис.5

Для просмотра градуировочных графиков нужно нажать кнопку «Градуировка». Для каждого компонента строится свой график и рассчитывается калибровочный коэффициент. Для стандарта коэффициент равен единице. (Рис.6)

Рис. 6

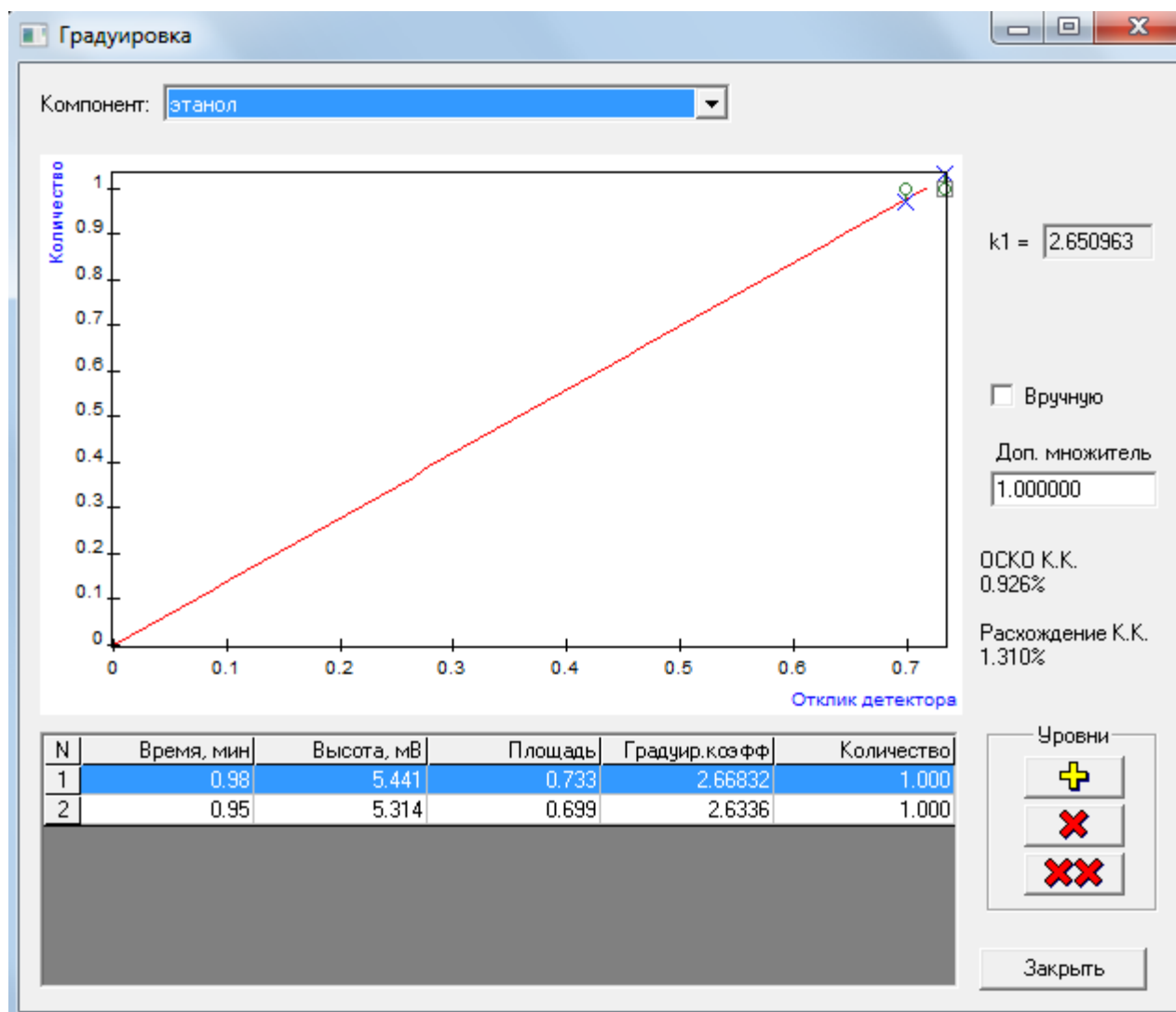
Градуировочный график строится по 3-5 точкам, используя точные растворы спиртов в воде с концентрациями, указанными в рабочей МВИ.

Градуировка выполняется каждый раз после установки, настройки и ремонта хроматографа, замены колонки или после длительного перерыва в измерениях (более 1 недели), а также в случае, когда контроль качества измерений признан неудовлетворительным.

2.4 Контроль качества измерений

Перед анализом, в начале смены, рекомендуется проводить контроль качества процедуры измерений. Средством контроля служит 1,0‰ - 2‰ раствор этилового спирта с добавлением внутреннего стандарта. Контрольное измерение признают удовлетворительным, если модуль разности измеренного и истинного значения концентрации не превосходит 0,11‰ для раствора этилового спирта с концентрацией 1,0‰.

Если результат контроля качества процедуры измерений признан неудовлетворительным, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.



3. Проведение анализа

Приготовить пробу, согласно рабочей методике (см. п.2.2 Руководства). Проколоть резиновую пробку флакона газоплотным шприцем, отобрать 0,5мл парогазовой фазы и немедленно ввести в испаритель. Запустить хроматограмму, нажав «Старт» на приборе. В паспорте указать массу пробы — 100 и массу стандарта (концентрация пропанола).

Шприц для внесения газовой фазы должен быть сухим и герметичным (желательно с отверстием в игле сбоку, чтобы шприц не забивался). В промежутках между анализами его следует держать на воздухе без поршня для удаления следов анализируемой пробы.

Для исключения наличия в пробе пропанола первый анализ каждого образца проводят без добавления внутреннего стандарта. При обнаружении пика пропанола дальнейший анализ не проводят. При отсутствии пика пропанола и пика этанола делают заключение об отсутствии этанола. При отсутствии пика пропанола и обнаружении пика этанола повторяют анализ, но с внесением внутреннего стандарта (пропанола).

По окончании записи, концентрации спиртов в образце рассчитываются автоматически.

Окончательный результат измерения концентрации этанола в крови следует умножить на коэффициент (коррелирующий фактор), равный 0,82.

Результаты измерения концентрации этанола в водных растворах, слюне и моче принимаются без коэффициентов.

Коэффициенты могут быть другими, в зависимости от используемой методики.

За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений (по рабочей методике).

В конце рабочей смены, в случае изменения времени выхода спиртов или значительном увеличении давления перед колонкой проводят ее кондиционирование. Для этого устанавливают температуру термостата колонок на 10-20°C выше рабочей температуры (но не более максимальной температуры колонки) на несколько часов для удаления из колонки воды.

Периодически требуется промывать лайнер в испарителе от остатков пробы. Для этого с выключенного прибора следует снять лайнер, замочить его в водном растворе перекиси водорода, промыть дистиллированной водой, просушить и поставить на место.

4. Работа с приложением «Определение спиртов»

Совместно с программой «Хромос» есть возможность рассчитывать хроматограммы с помощью приложения «Определение спиртов». Это приложение учитывает коэффициент (коррелирующий фактор), зависящий от биологической среды (кровь, моча, слюна), позволяет сразу получать среднее арифметическое параллельных измерений, а также находить необходимый анализ по дате.

Приложение устанавливается с диска.

Для использования приложения «Определение спиртов» необходимо выполнить в программе «Хромос» следующие операции:

1. Выбрать в строке меню пункт «Хроматограмма».
2. В выпавшем списке выбрать «Опции».
3. В открывшемся окне «Опции» открыть закладку «Пути».
4. В строке «Создавать папку для сохранения» выбрать из выпадающего списка позицию «Год, месяц» (Рис. 7)

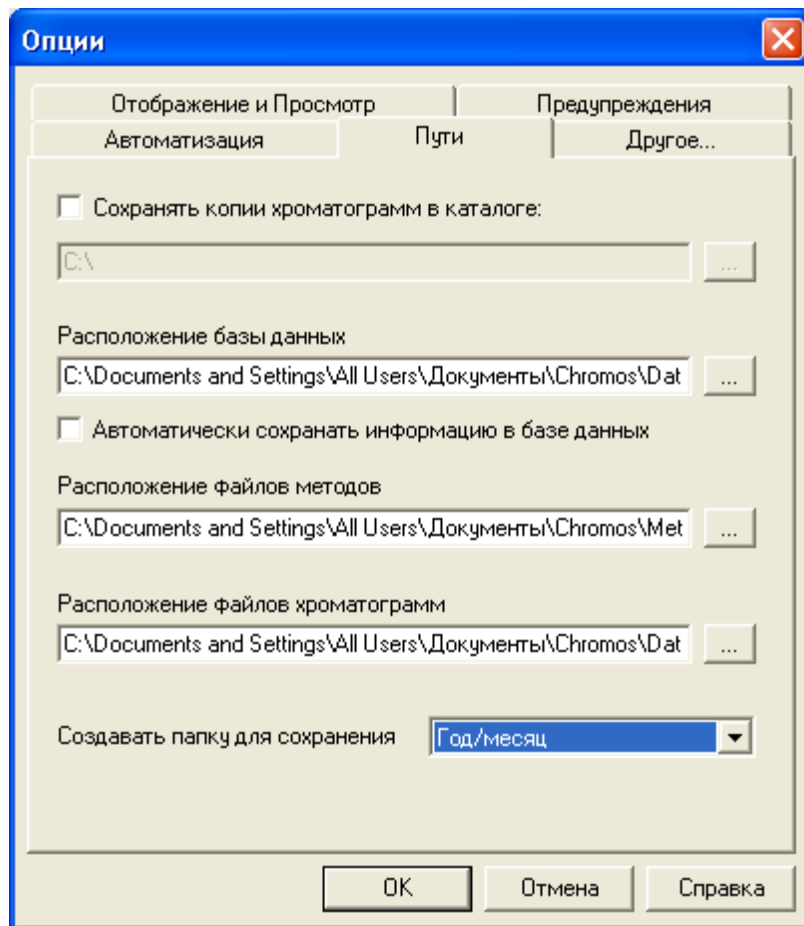
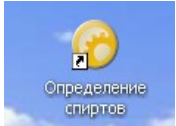


Рис.7

Затем следует настроить приложение «Определение спиртов» следующим образом:

1. Открыть приложение, щелкнув на рабочем столе по ярлыку  и кнопкой  открыть окно настроек. (Рис.8)
2. В строке «Основные компоненты» через запятую записать имена анализируемых компонентов.
3. В строке «Рабочий метод» записать название метода. В строке «Стандарт» указать «пропанол». Написание всех этих наименований должно точно соответствовать написанию в программе «Хромос».
4. Указать, по какому отклику - Высоте или Площади, идет расчет концентраций.
5. Занести пороговые значения для «отрицательных» проб. Граничные значения различны для живого и для трупного материала, поэтому в строку

- «поиск живого по названию пробы» занести ключевое слово.
- В строке «Список ключевых слов», через запятую, записать ключевые слова для анализируемых материалов. Занести значения дополнительного множителя (разный, в частности, для крови и мочи). Результат анализа в приложении выводится с учётом этого множителя.
 - Выполнить команду «Сохранить». На этом настройка приложения завершена.

Настройка

Рабочий метод: спирты

Основные компоненты: этанол, метанол

Стандарт: пропанол

Список ключевых слов: кровь, моча, гематома

Выводить в таблице: Площадь

Дополнительный множитель

0.82 если в названии пробы есть кровь, гематома

1.0 если ключевые слова не найдены

Пороговые значения для "отрицательных" проб

живой 0.15 остальные 0.3

поиск живого в названии пробы по живой

Сохранить Отмена

Рис.8

Внимание! Ошибки в заполнении настройки не позволят работать приложению.

При использовании приложения «Определение спиртов» следует определенным образом заполнять паспорт (Рис.9):

- «Пункт отбора» (вносится фамилия оператора).
- «Проба» (Вносится номер пробы, одно из ключевых слов из списка анализируемых материалов, ключевое слово для опознания живого. Номер и ключевые слова разделяются пробелом. Эти наименования должны полностью соответствовать записанным в настройках приложения.).
- «Масса пробы».
- «Масса стандарта».

Внимание! Ошибки в заполнении паспорта не позволят работать приложению.

Паспорт

АНАЛИЗ: колонки_061211_103916
 Файл: C:\Users\Public\Documents\Chromos\Data\колонки\колонки_061211_103916.stg
 Дата: 06.12.11 10:39:16 Номер 0

ПРОБА: 256 кровь живой
 Масса пробы: 100 Масса стандарта: 1

Дата и время отбора: 6.12.2011 0:0:0 Виала: 1 Номер в серии: 2
 Пункт отбора: Иванова Точка отбора:

МЕТОД: спирты
 Продолж.: 0003814697 мин ☐ Градуировочная
 Оператор: Детектор: ДТД
 Колонка: №1389 Номер: 0
 Диаметр: 3 мм Длина: 2 мм Зерно: 0 м

Газовые параметры: ГН = 40 мл/мин P = 1,178 кгс/см²
 Температурные параметры: Ткол = 70°C Тисп = 150°C Тдет = 120°C

Комментарий Газовый -> жидкостный OK Отмена Справка

Рис.9

По окончании анализа сохранить хроматограмму. Командой  в приложении выводится строка данного анализа. (Рис.10)

Для единичного анализа значения концентрации компонента за скобками и в скобках равны.

Если искомый компонент не обнаружен (концентрация ниже порога «отрицательной» пробы), возле фамилии оператора появляется зелёная метка, делается вывод об отсутствии компонента и отрицательный результат заносится в протокол.

Определение спиртов в крови, моче и слюне

Дата: 06.12.2011 Компонент: метанол

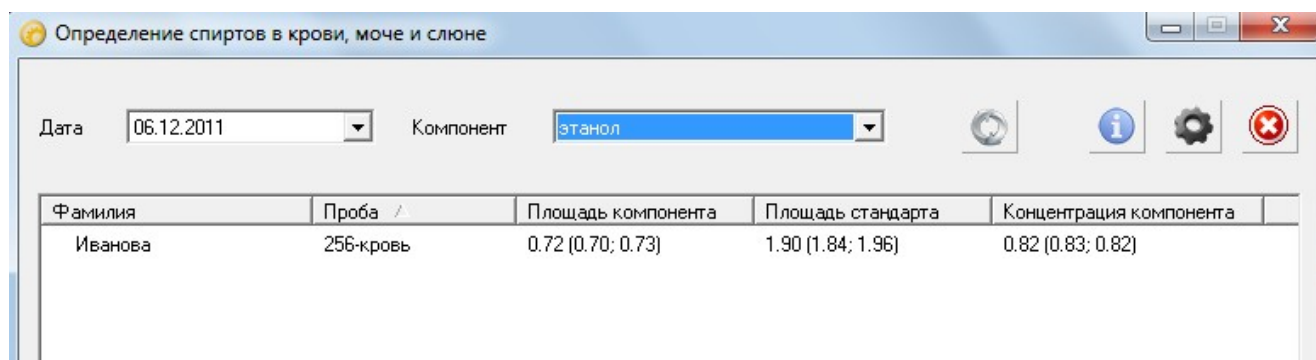
Фамилия	Проба /	Площадь компонента	Площадь стандарта	Концентрация компонента
Иванова	256-кровь	1.91 (1.91)	1.84 (1.84)	0.81 (0.81)

Рис.10

При положительном результате анализ повторяется для получения параллельного результата. При этом параллельная проба в строке «проба» паспорта должна иметь то же имя.



По окончании анализа хроматограмма сохраняется. Командой  в приложении выводится строка данного анализа. В скобках указываются концентрации полученные в каждом отдельном анализе, а за скобки выносятся средний результат. При нормальной сходимости концентраций в обоих анализах результат заносится в протокол. (Рис.11)

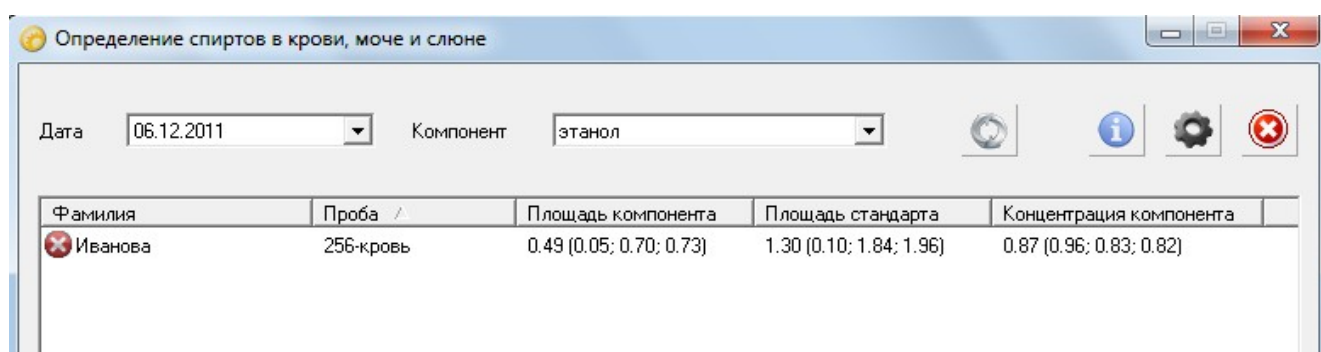


Фамилия	Проба /	Площадь компонента	Площадь стандарта	Концентрация компонента
Иванова	256-кровь	0.72 (0.70; 0.73)	1.90 (1.84; 1.96)	0.82 (0.83; 0.82)

Рис.11

При отсутствии сходимости (например, из-за ошибки в пробоподготовке или вводе пробы) анализ повторяется снова, аналогично второму.

При этом перед фамилией оператора появляется красная метка, в скобках заключено три значения по каждому анализу. (Рис.12)



Фамилия	Проба /	Площадь компонента	Площадь стандарта	Концентрация компонента
 Иванова	256-кровь	0.49 (0.05; 0.70; 0.73)	1.30 (0.10; 1.84; 1.96)	0.87 (0.96; 0.83; 0.82)

Рис.12

Для получения среднего значения по двум анализам необходимо исключить выпавший результат. Для этого помечается мышкой строка анализа и выполняется команда . В выпавшем окне помечается галочкой неверная концентрация и выполняется команда «Удалить». (Рис.13)

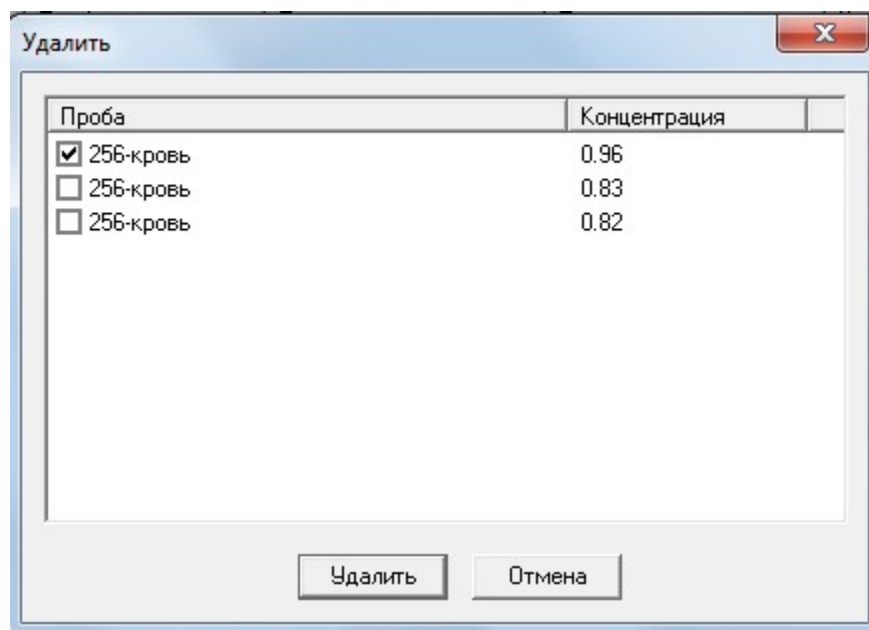


Рис.13

После этого данная концентрация удаляется из приложения, а хроматограмма удаляется в корзину. Результат заносится в протокол.

Анализ следующей пробы должен отличаться заданной в паспорте строкой «Проба». В приложении он выводится следующей строкой в таблице приложения.

Количество строк в таблице приложения равно числу анализов за сутки. Ориентироваться можно по номеру пробы.

По умолчанию приложение работает с анализами текущих суток, однако можно вывести на экран результаты за любую дату, выбрав её в выпадающем в строке «Дата» календаре, если хроматограммы сохраняются в памяти компьютера.

На экран выводится результат только по одному компоненту, например этанолу. Вывести результат по другим компонентам можно, выбрав его имя из выпадающего в строке «Компонент» списке, если он выбран в настройке.

Примечание! Приложение работает с сохранёнными в памяти хроматограммами, поэтому, если по окончании анализа разметка хроматограммы подвергалась коррекции, необходимо выполнить команду «Сохранить» в программе «Хромос».