

POTVRĐIVANJE MOGUĆNOSTI MERENJA I ETALONIRANJA MASENOG UDELA ETANOLA U VODI DIREKCIJE ZA MERE I DRAGOCENE METALE

Sofija Vuković, Jelena Bebić, Luka Gažević

Ključne reči: etaloniranje, rastvori etanola u vodi, HSGC-FID

KRATAK SADRŽAJ

Sertifikovani referentni materijali - rastvori etanola u vodi proizvode se u Direkciji za mere i dragocene metale dugi niz godina. Koriste se u zakonskoj metrologiji u Republici Srbiji za ispitivanje, podešavanje i overavanje etilometara. Gravimetrijski pripisana i sertifikovana vrednost koncentracije rastvora potvrđuje se gasnom hromatografijom, što je ujedno i metoda kvantifikacije ovih rastvora.

U ovom radu su predstavljeni rezultati međulaboratorijskog dopunskog poređenja EURAMET.QM-S14 u kome je učestvovala Laboratorija za referentne materijale i merenja u hemiji DMDM. Poređenje je obuhvatalo određivanje etanola u vodenim rastvorima u opsegu od 0,1 mg/g do 8 mg/g. Na osnovu uspešnog učešća DMDM u međulaboratorijskom poređenju, u 2023. godini su objavljene nove mogućnosti etaloniranja i merenja (CMC) u bazi BIPM-a, u oblasti organskih analiza u okviru metrologije u hemiji. Ovo poređenje realizovano je u sklopu evropskog istraživačkog EMPIR projekta 16RPT02 "ALCOREF".

CONFIRMATION OF THE DIRECTORATE OF MEASURES AND PRECIOUS METALS CAPABILITY FOR MEASURING AND CALIBRATION OF THE MASS FRACTION OF ETHANOL IN WATER

Sofija Vuković, Jelena Bebić, Luka Gažević

Keywords: calibration, ethanol in water solutions, HSGC-FID

ABSTRACT

Certified reference materials - ethanol in water solutions have been produced by the Directorate of Measures and Precious Metals for many years. They are used in legal

metrology in the Republic of Serbia for the testing, calibration (adjustment) , and verification of breath alcohol analyzers. Gravimetrically assigned and certified concentration value of the solutions is confirmed by gas chromatography, which is also the method for quantifying of these solutions.

In this paper the results of the interlaboratory supplementary comparison EURAMET.QM-S14 are presented, which the Laboratory for Reference Materials and Measurements in Chemistry DMDM participated in. The comparison included the determination of ethanol in aqueous solutions in the range from 0.1 mg/g to 8 mg/g. Based on the successful participation of DMDM in the interlaboratory comparison, in 2023, new calibration and measurement capabilities (CMC) were published at the BIPM database in the category of organic analysis within the metrology in chemistry. This comparison was conducted as part of the European research EMPIR project 16RPT02 "ALCOREF".

Acknowledgements of funding

These major results regarding the calibration of ethanol in aqueous solutions at DMDM are part of a project that has received funding from the EMPIR programme, 16RPT02 ALCOREF - Certified forensic reference materials, co-financed by the Participating States and from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme.



UVOD

Etanol je široko rasprostranjen, a najrasprostranjeniji je u alkoholnim pićima. Njihovom konzumacijom, on dospeva u ljudski organizam i njegova koncentracija može se odrediti u krvi ili ljudskom izdahu. Najzastupljenije merilo za određivanje koncentracije etanola u ljudskom izdahu je etilometar. To je merilo koje pripada zakonskoj metrologiji u Republici Srbiji i zbog toga je ključno da analiza sadržaja alkohola u izdahu bude pouzdana. Overavanjem etilometara garantuje se tačnost i pouzdanost merenja [1]. U svrhu overavanja etilometra, kao i njihove kalibracije (podešavanja) i ispitivanja u svrhu odobrenja tipa, koriste se sertifikovani referentni rastvori etanola u vodi [1]. Proizvodnja, karakterizacija i sertifikovanje referentnih materijala su ključne aktivnosti koje omogućavaju uspostavljanje i održavanje koherentnog sistema merenja u celom svetu u oblasti etilometrije. Sertifikovani referentni materijali (CRM) se koriste u procesu merenja ili ispitivanja određenih osobina kada na drugi način nije moguće ostvariti sledivost rezultata merenja do SI jedinica ili nekih drugih međunarodno priznatih jedinica, etaloniranja i podešavanja instrumenta, procenu odstupanja rezultata, internu kontrolu kvaliteta i validaciju metoda. Referentni rastvori etanola u vodi mogu se potvrditi na nekoliko načina; gasna hromatografija (GC), fotojonizaciona spektroskopija, enzimski testovi, denzitometrija, kao i titrimetrija. U Direkciji za mere i dragocene metale (DMDM) rastvori se proizvode u deset različitih koncentracija etanola u vazduhu na 34 °C, od 0 mg/L do 1,95 mg/L. Za potvrđivanje referentnih rastvora etanola u DMDM koristi se gasna hromatografija sa plameno-jonizujućim detektorom i headspace autosamplerom (HSGC-FID) [2]. Prednost gasne hromatografije kao instrumentalne metode je ta što je jedna od najpouzdanijih kvantitativnih analitičkih metoda za alkohole.

Cilj ovog rada je predstavljanje metode potvrđivanja mernih mogućnosti masenog udela etanola u vodenim rastvorima realizovane u DMDM, a potvrđene na međunarodnom nivou, kao i prikaz dobijenih rezultata DMDM u međunarodnom međulaboratorijskom poređenju u kojem je učestvovalo petnaest Laboratorija iz Evrope i sveta.

MATERIJALI I METODE

Merna oprema i materijali

Osnova HSGC-FID metode je u konstruisanje kalibracione krive koja daje odnos poznatih koncentracija rastvora i odziva analitičkog instrumenta, odnosno površine dobijenih hromatografskih pikova. Za potrebe međulaboratorijskog poređenja, koje se sastojalo u određivanju masene koncentracije dva rastvora različitih nepoznatih koncentracija (bliskih 0,6 mg/g i 1,8 mg/g), konstruisane su dve kalibracione krive, svaka od osam tačaka, pomoću osam različitih kalibracionih rastvora u uskim koncentracionim opsezima, koji su obuhvatali dve koncentracije uzoraka sa poređenja. Kalibracioni rastvori su pripremani gravimetrijskom metodom. Merenje etanola (Honeywell, Sigma Aldrich, Chromasolv Gradient, čistoće $\geq 99,9\%$) vršeno je na analitičkoj vagi Sartorius, Nemačka, tip GPC 225-CW ($d=0,00001$ mg). Dejonizovana voda (Human, PowerIII) u koju se dodavao izmereni etanol, merila se na vagi Mettler, Švajcarska, tip PM4000 ($d=0,01$ g) [2]. Obe vage etalonirane su interno u DMDM. Metoda koja se primenjivala pri gasno hromatografskoj analizi rastvora je metoda internog standarda. Interni standard (ISTD) koji se koristio je rastvor propanola (1-propanol, Sigma Aldrich, Chromasolv za HPLC, čistoće $\geq 99,9\%$) u dejonizovanoj vodi, koncentracije 100 mg/g. Čistoće etanola i propanola deklarisanе su od strane proizvođača i proverene su Karl-Fišerovom potencijometrijskom titracijom u DMDM.

Priprema kalibracionih rastvora

Kalibracioni rastvori su pripremani u staklenim bocama od 1 L. Etanol se merio u staklenim vijalama od 5 ili 10 mL koje su se zatim ubacivale u staklenu bocu u kojoj se nalazila dejonizovana voda, u cilju potpunog kvantitativnog prenosa etanola.

Kako bi se homogenizovali, pripremljeni kalibracioni rastvori odstojali su 48 h nakon čega su kalibracioni rastvori uzorkovani za gasno-hromatografsku analizu. Postupak uzorkovanja za gasno-hromatografsku analizu podrazumevao da se u vijalu za gasno-hromatografsku analizu prvo doda 10 mL kalibracionog rastvora a nakon toga doda i 100 μ L internog standarda.

Tabela 1: Mase etanola i vode za pripremu kalibracionih rastvora za određivanje nepoznatog uzork br. 2

Kalibracioni rastvor	Nazivna koncentracija rastvora (g/L)	Ciljna masa vode (g)	Ciljna masa etanola (g)
Kal 1	1,6600	1150,0	1,91755
Kal 2	1,7000	1150,0	1,96385
Kal 3	1,7400	1150,0	2,01015
Kal 4	1,7800	1150,0	2,05645
Kal 5	1,8200	1150,0	2,10275
Kal 6	1,8600	1150,0	2,14915
Kal 7	1,9000	1150,0	2,19545
Kal 8	1,9400	1150,0	2,24175

Gasno-hromatografska metoda za određivanje koncentracije rastvora

Analitičko određivanje masenog udela etanola u rastvoru u DMDM vršeno je gasno-hromatografskom analizom sa plameno-jonizujućim detektorom (HSGC-FID) na Shimadzu GC- 2010 uređaju sa Headspace autosemplerom. Headspace gasna hromatografija sa detekcijom jonizacije plamena (HSGC-FID) je izabrana da se koristi za CRM analizu zbog njene lakoće automatizacije, osetljivosti, tačnosti kao i relativne specifičnosti.



slika 2: Gasni hromatograf sa plameno - jonizujućim detektorom i headspace autosemplerom

Poboljšanje ove metode određivanja etanola u vodenim rastvorima u DMDM je u zameni autosemplera HTA310A koji je ranije korišćen, zamenjen je sa Headspace AOC 5000 autosemplerom i split-splitless injektorom povezanim sa InterCap FFAP kolonom (debljina filma 0,25 µm, 30 m x 0,25 mm) (HSGC-FID) [3]. Opseg merenja je takođe proširen zahvaljujući odličnim rezultatima na međulaboratorijskom poređenju; od 0,1 mg/g do 8 mg/g (ranije do 5 mg/g) [3].

Uzorci pripremljenih kalibracionih rastvora koji su analizirani zagrevani su na 70 °C tri minuta (Headspace autosampler). Nakon zagrevanja, autosemplerom 500 µL uzorka nastale gasne faze injektovano je u splitless režimu u kolonu. U ovoj analizi, protok azota kao nosećeg gasa iznosio je 1,39 ml/min, 250 °C je bila temperatura detektora, dok je temperatura kolone bila postavljena na 70 °C tokom 1 minuta a nakon toga se menjala u linearnom režimu temperaturnog programiranja od (70-120) °C brzinom 15 °C/min. [2].

Analiza jednog uzorka ovom metodom traje 7,33 minuta. Retenciono vreme etanola iznosi 2,4 min, dok je retenciono vreme propanola 2,8 min. [2].

Dobijeni hromatogrami su analizirani u Shimadzu GC solution program, odnosno izvršena je automatska integracija dobijenih pikova.

Validacija ove analitičke metode urađena je sa SRM NIST 2895 koji ima masenu frakciju etanola u vodi 0,2 % , u sklopu koje je urađen i proračun istinitosti, granice detekcije i kvantifikacije, preciznost, linearnost, kao i proračun merne nesigurnosti ove metode [2].

Izračunavanje i konstruisanje kalibracione krive

Generisanje linearne kalibracione krive predstavlja osnov za potvrđivanje masene koncentracije etanola HSGC - FID metodom.

Analizom pripremljenih kalibracionih rastvora dobijene su vrednosti površina pikova rastvora etanola i propanola potrebne za konstruisanje kalibracione krive.

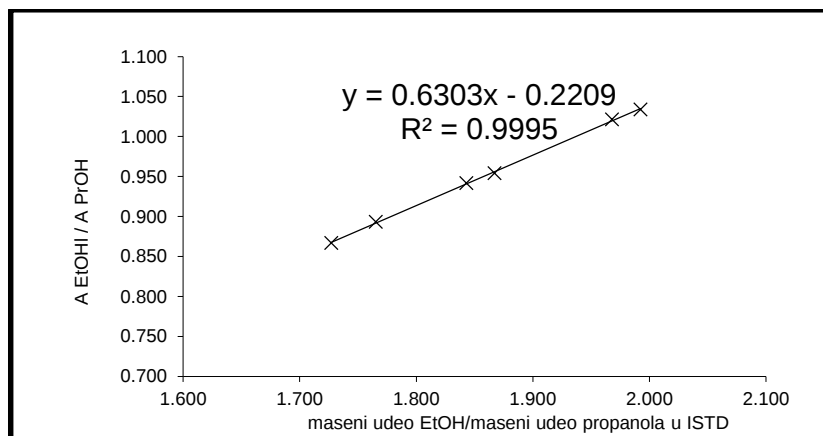
Na x - osi koordinatnog sistema unet je količnik masenog udela etanola i masenog udela propanola u pripremljenom internom standardu, koji se računa prema formuli:

$$x = \frac{\text{maseni udeo Et OH}}{\text{maseni udeo propanola u ISTD}} \quad (1)$$

dok je na y - osi unet količnik površina ispod dobijenih hromatografskih pikova etanola i propanola, prema jednačini:

$$y = \frac{A_{EtOH}}{A_{PrOH}} \quad (2)$$

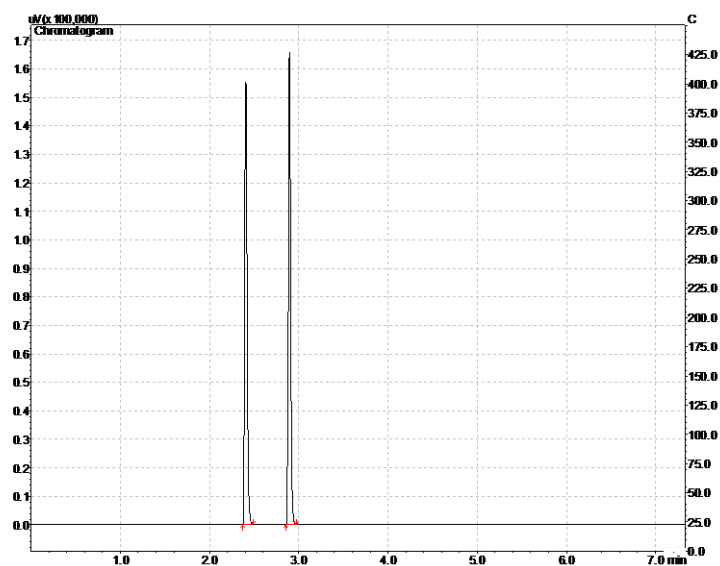
Kalibraciona kriva je dobijena regresionim modelom metode najmanjih kvadrata, odnosno dobijene su vrednosti odsečka i nagiba krive, a određen je i faktor linearnosti krive.



Slika 2: Grafički prikaz kalibracione krive konstruisane za potrebe međulaboratorijskog poređenja za uzorak rastvora br.2.

Proračun i analiza rastvora nepoznate koncentracije

Rastvori nepoznate koncentracije koji su dobijeni za potrebe međulaboratorijskog poredjenja, uzorkovani su i analizirani HSGC-FID metodom u DMDM na isti način kao i pripremljeni kalibracioni rastvori.



slika 3: Grafički prikaz hromatografa analiziranog nepoznatog rastvora br.2

Nakon gasno-hromatografske analize kalibracionih rastvora, masena koncentracija nepoznatog rastvora računata je po formuli:

$$\text{Masena koncentracija rastvora } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\text{EtOH}}}{A_{\text{PrOH}}} \text{ odsečak}}{\text{nagib}} \right) * \frac{m_{\text{EtOH}} (\text{g})}{m_{\text{ISTD}} (\text{g})} \quad (3)$$

Na slici 3 prikazan je dobijen hromatogram za jednu HSGC-FID analizu, gde su pikovi etanola (RT=2,4 min) čija je površina bila 282283,7 i propanola (RT=2,8 min) sa površinom od 296100,1.

PRIKAZ REZULTATA DMDM-A NA MEĐULABORATORIJSKOM POREĐENJU

Međulaboratorijsko poređenje EURAMET.QMS-14 pokrenuto je u okviru projekta EMPIR 16RPT02 ALCOREF - Certified forensic reference materials okviru Evropskog programa za inovacije i istraživanja u metrologiji (EMPIR). Projekt je imao za cilj podržavanje razvoja Nacionalnih metroloških instituta i laboratorija (NMI/DI) u proširenju mogućnosti za proizvodnju referentnih materijala etanola u vodi, koji bi se upotrebljavali za metrološku kontrolu analizatora alkohola u izdahu prema međunarodnoj preporuci OIML R126 [4]. Međulaboratorijsko poređenje bilo je prilika projektnim partnerima i drugim zainteresovanim nacionalnim metrološkim institucijama (NMI) da ocene svoje analitičke metode za kvantifikaciju etanola u vodi. Koordinator međulaboratorijskog poređenja bio je BAM (Savezni institut za istraživanje i ispitivanje materijala, Nemačka).U međulaboratorijskom poređenju učestvovalo je petnaest metroloških instituta iz petnaest zemalja. [5]

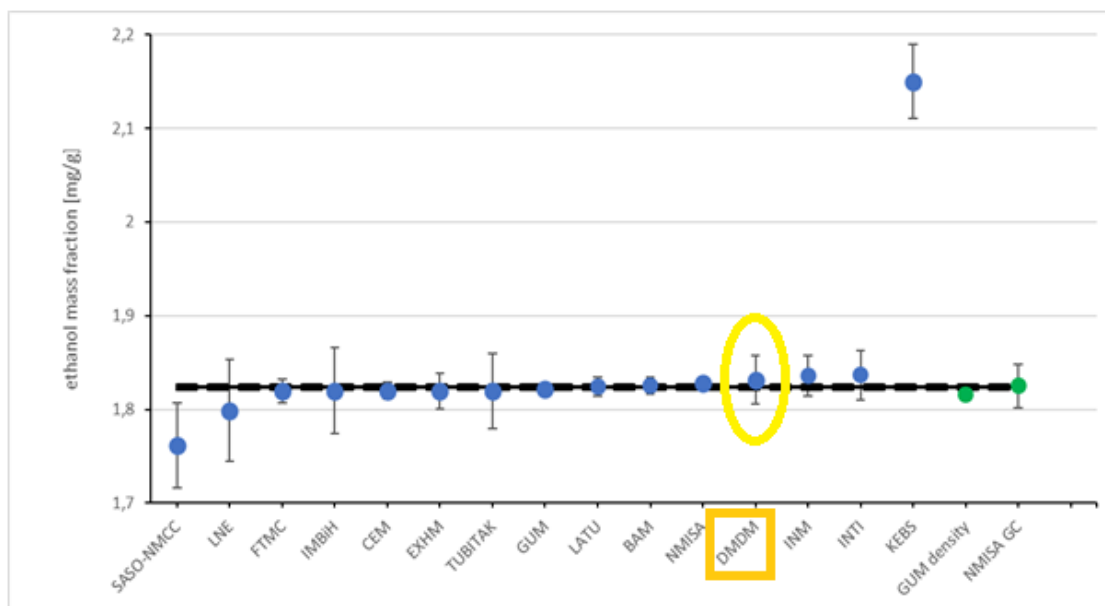
Uzorci koji su korišćeni u međulaboratorijskom poređenju su pripremljeni u BAM-u gravimetrijskim dodavanjem etanola visoke čistoće u boce već napunjene destilovanom vodom prema akreditovanom postupku. U okviru poređenja ispitivana je masena koncentracija etanola u dva različita koncentraciona nivoa. Od svake koncentracije svi učesnici su dobili po 2 boce od 1 L rastvora koje je bilo potrebno analizirati.

Analitičke metode koje su učesnici uglavnom primenjivali za potvrđivanje sadržaja etanola u vodi su: gasna hromatografija sa detekcijom plamena (GC-FID) ili masenom spektrometrijom (GC-MS), jedan učesnik koristio je titrimetriju, a jedan je koristio aparaturu za simulaciju etanola u izdahu ("bubble train"). Za određivanje čistoće komercijalnih rastvora etanola korišćene su različite metode; Karl-Fišerova titracija, hromatografska metoda i kvantitativna nuklearna magnetna rezonanca (qNMR). Četrnaest od petnaest učesnika uspešno je kvantifikovalo oba uzorka, jedan učesnik uspešno je kvantifikovao samo uzorak niže koncentracije. Koncentracioni nivoi rastvora 1 i 2 bili su približno 0,6 mg/g i 1,8 mg/g. [5]

U narednoj tabeli i grafikonu biće prikazani rezultati koje su prijavili učesnici za gravimetrijsku vrednost, srednju vrednost, mernu nesigurnost i proširenu mernu nesigurnost za rastvor 2.

Tabela 2: Prikaz stepena slaganja rezultata i njihove proširene merne nesigurnosti za rastvor 2 [5].

Institut	DoE [mg/g]	U _{95%CI} [mg/g]
SASO-NMCC	-0.0622	0.0448
LNE	-0.0245	0.0534
FTMC	-0.0042	0.0140
IMBiH	-0.0038	0.0447
CEM	-0.0037	0.0109
EXHM	-0.0035	0.0194
TUBITAK	-0.0035	0.0414
GUM	-0.0018	0.0087
LATU	0.0009	0.0111
BAM	0.0017	0.0112
NMISA	0.0045	0.0092
DMDM	0.0082	0.0255
INM	0.0125	0.0226
INTI	0.0133	0.0268
KEBS*	0.3265	0.0397



Grafik 1. Prikaz rezultata merenja učesnika za rastvor 2 ($1,8239 \pm 0,0029$) g/kg.

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 2. i na grafiku 1. vidimo da su rezultati DMDM na ovom međulaboratorijskom poređenju, uzevši u obzir stepen slaganja rezultata, koji je iznosio 0,0082, u mg/g, dobri i na ovaj način u DMDM potvrđene su merne mogućnosti etaloniranja masenog udela etanola u rastvorima etanola u vodi. Na osnovu rezultata ovog poređenja, 16. septembra 2023. godine u bazi BIPMa, objavljene su nove merne mogućnosti etaloniranja masenog udela etanola u vodenim rastvorima u DMDM, za koncentracioni opseg od 0,1 mg/g do 8 mg/g relativne proširene merne nesigurnosti od 1,4 %.

ZAKLJUČAK

U DMDM sertifikovani referentni materijali rastvora etanola u vodi proizvode se na mesečnom nivou godinama unazad u velikim količinama. U ovom radu je prikazano unapređenje GC-FID metode za potvrđivanje gravimetrijski karakterizovanih referentnih rastvora etanola u vodi. Kroz prikaz rezultata koji su ostvareni na međulaboratorijskom poređenju jasno je potvrđen proširen opseg mernih mogućnosti sertifikovanja masenog udela etanola od strane Laboratorije za referentne materijale u DMDM. Time je obezbeđena sledivost na međunarodnom nivou, ostvarena u Republici Srbiji, za oblast etilometrije. Ove merne mogućnosti osnov su za potvrđivanje mogućnosti proizvodnje CRM etanola u vodi, u DMDM, čija se realizacija očekuje u budućnosti.

ZAHVALNOST

Prikazani rezultati koji se odnose na etaloniranje masenog udela etanola u vodi u DMDM deo su projekta koji je finansiran u okviru EMPIR programa 16RPT02 ALCOREF - Certified forensic reference materials. Zahvaljujemo se kolegama angažovanim na projektu na njihovoj pomoći u radu.

LITERATURA

- [1] *Pravilnik o vrstama merila koja podležu zakonskoj kontroli*, „Službeni glasnik RS”, broj 45/2019, 2019.
- [2] Katarina Banjanac, Milena Milošević, Jasmina Zukan Banović i Jelena Bebić, *Ispitivanje homogenosti sertifikovanih rastvora etanola u vodi u Direkciji za mere i dragocene metale*, Kongres metrologa 2019.
- [3] Nikola Škundrić, Jelena Bebić, *Potvrđivanje referentnih rastvora etanola u vodi*, JUSK Konferencija, Internacionalni zbornik, Mašinski fakultet Beograd 2013.
- [4] OIML R126, the International Standard for Evidential Breath Analyzers
- [5] Final report EURAMET.QM-S14: Measurement capabilities for the quantification of ethanol in water

Podaci o autorima:

Sofija Vuković, dipl. inž., Grupa za metrologiju u hemiji, Direkcija za mere i dragocene metale, Mike Alasa 14, Beograd, e-mail: sofija.vukovic@dmdm.rs, Tel. : (+381)(66) 860 4158.

dr Jelena Bebić, dipl inž. teh., Rukovodilac Grupe za metrologiju u hemiji, Direkcija za mere i dragocene metale, Mike Alasa 14, Beograd, e-mail: jelenabebic@dmdm.rs, Tel. (+381) (11) 202 44 27, Mob: (+381)(66) 860 4083.

Luka Gažević, dip.inž., Grupa za metrologiju u hemiji, Direkcija za mere i dragocene metale, Mike Alasa 14, Beograd, e-mail: lukagazevic@dmdm.rs, Tel. : (+381)(66) 860 4165.