

# Analisi forense della concentrazione di alcol nel sangue

Usando il GC Agilent 8860 con le colonne Agilent J&W DB-BAC1 UI e Agilent J&W DB-BAC2 UI e il campionatore per spazio di testa Agilent 7697A

## **Autori**

Lukas Wieder, Jie Pan e  
Rebecca Veeneman  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808

## **Abstract**

La presente nota applicativa evidenzia la determinazione della concentrazione di alcol nel sangue (BAC) usando il GC Agilent 8860 configurato con doppio rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e un campionatore per spazio di testa Agilent 7697A. Il sistema mostra eccezionali prestazioni statistiche, con linearità nell'intervallo atteso di concentrazioni e ripetibilità su molte iniezioni. La produttività aumenta notevolmente quando viene implementato uno splitter per risolvere simultaneamente i componenti del campione su due colonne: Agilent J&W DB-BAC1 UI e Agilent J&W DB-BAC2 UI.

## Introduzione

La BAC corrisponde alla percentuale di etanolo (alcol etilico) nel circolo sanguigno e può essere misurata mediante test su sangue, urina o respiro. L'analisi della BAC, con un flusso di lavoro standard che comprende spazio di testa e FID, è di routine in molti laboratori di medicina legale<sup>1</sup>. Il sistema GC 8860 è perfettamente adatto ad analisi di routine come la BAC. Configurazioni hardware semplici come HSS con doppio FID sono facili da realizzare sul GC 8860 interfacciato con OpenLab CDS versione 2.2 e soddisfano la maggior parte dei requisiti del metodo. La presente nota applicativa descrive un metodo per determinare la BAC con il GC 8860 a doppio FID e con il campionatore per spazio di testa 7697A.

## Condizioni sperimentali

### Apparecchiature

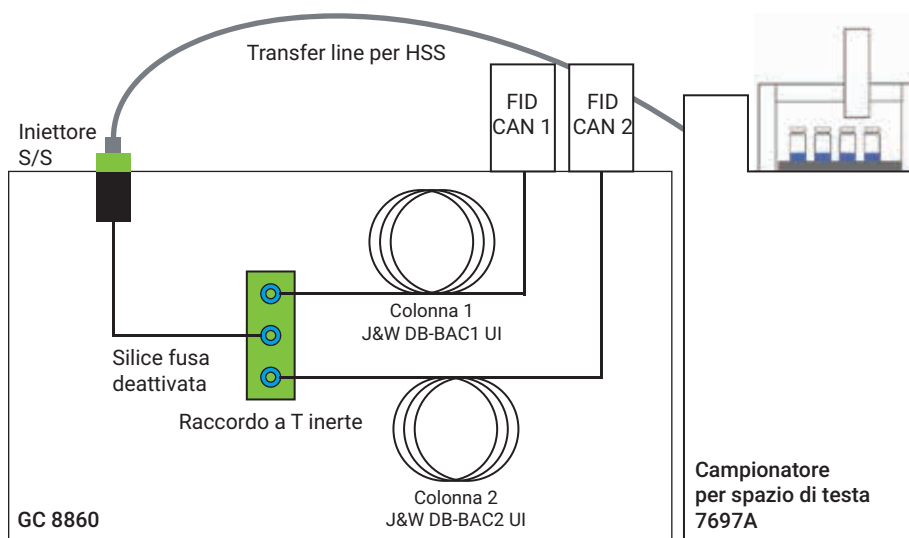
Un GC 8860 è stato configurato con iniettore split/splitless (SSL) e doppio FID e il campionamento è stato effettuato usando un campionatore per spazio di testa 7697A.

Il GC 8860 può utilizzare dispositivi microfluidici non spurgati. In questo caso, è stato installato un raccordo a T inerte per effettuare l'analisi nella configurazione a doppia colonna e doppio FID. La Figura 1 mostra un diagramma di questa configurazione.

### Prodotti di consumo

La Tabella 1 elenca i prodotti di consumo usati in questa nota applicativa.

La Tabella 2 elenca gli standard di etanolo offerti da Agilent. Questi standard possono essere combinati per creare standard di calibrazione accurati o usati singolarmente per verificare l'accuratezza di una curva di calibrazione.



**Figura 1.** Configurazione sperimentale usando doppia colonna e doppio FID per l'analisi della concentrazione di alcol nel sangue.

**Tabella 1.** Elenco dei prodotti di consumo utilizzati per questa applicazione.

Prodotto di consumo	Codice
Vial per spazio di testa, tappo a chiusura meccanica, trasparenti, 10 mL	5190-2285
Liner per iniettore split a bassa caduta di pressione, Ultra Inert, con lana di vetro	5190-2295
Raccordo a T inerte per Capillary Flow Technology	G3184-60065
Ferule per colonna lato iniettore (grafite, 0,4 mm, per colonne da 0,25 mm)	500-2114
Ferule per FID (grafite, 0,5 mm, per colonne da 0,32 mm)	5080-8853
Ferule CFT (ferule metalliche flessibili UltiMetal Plus, d.i. 0,32 mm)	G3188-27502
Agilent J&W DB-BAC1 UI (30 m x 320 µm, 1,8 µm)	123-9334UI
Agilent J&W DB-BAC2 UI (30 m x 320 µm, 1,2 µm)	123-9434UI
Precolonna in silice fusa deattivata fino alla T inerte (30 m x d.i. 250 µm x d.e. 350 µm)	160-2255-30

**Tabella 2.** Concentrazioni degli standard di calibrazione dell'etanolo e codici corrispondenti.

Standard	Codice
20 mg/dL	5190-9756
50 mg/dL	5190-9757
80 mg/dL	5190-9758
100 mg/dL	5190-9759
150 mg/dL	5190-9760
200 mg/dL	5190-9761
300 mg/dL	5190-9762
400 mg/dL	5190-9763

### Parametri sperimentali

La Tabella 3 elenca i parametri del metodo per il GC e per il campionatore per spazio di testa usati in questa nota applicativa.

### Preparazione del campione

Gli standard di calibrazione sono stati preparati nei vial per ottenere concentrazioni di etanolo comprese tra 10 e 320 mg/dL. È stato aggiunto *n*-propanolo come standard interno fino a raggiungere una concentrazione finale di 100 mg/dL.

Per determinare la ripetibilità, sono stati preparati standard di etanolo (*n*=10) a 15 e 60 mg/dL con lo standard interno a 100 mg/dL.

Tabella 3. Parametri del GC e del campionatore per spazio di testa.

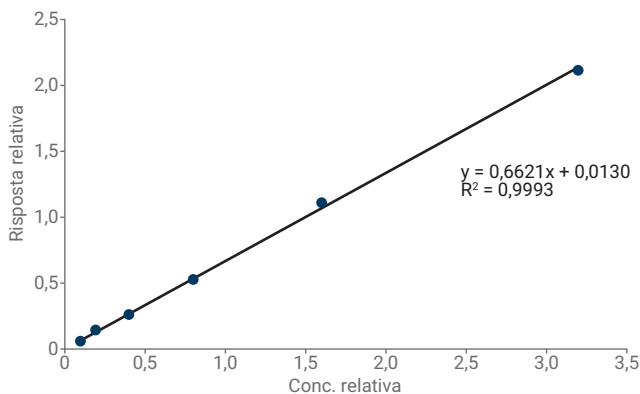
Parametro del GC	GC 8860
Gas di trasporto	Elio
Tipo di iniettore	Split/splitless
Temperatura dell'iniettore	110 °C
Pressione all'iniettore	24 psi
Rapporto di splittaggio	10:1
Programma del forno	40 °C per 4,5 minuti
FID	250 °C
<b>Parametri dello spazio di testa</b>	<b>Campionatore per spazio di testa 7697A</b>
Gas di pressurizzazione del vial	Elio
Dimensione del loop	1 mL
Dimensioni del vial	10 mL
Agitazione del vial	Disattivata
Tappi	Rivestiti in PTFE
Flusso di standby del vial	20 mL/min
Tempo di equilibratura del vial	7,00 minuti
Tempo di iniezione	1,00 minuto
Durata del ciclo del GC	4,50 minuti
Temperatura del forno	70 °C
Temperatura del loop	80 °C
Transfer line	d.i. 0,53 mm, silice fusa deattivata inserita nel setto
Temperatura della transfer line	90 °C
Pressione di riempimento del vial	15 psi
Modalità di riempimento del loop	Personalizzata
Velocità della rampa per il loop	30 psi/min
Pressione finale del loop	1,5 psi
Tempo di equilibratura del loop	0,05 minuti
Spurgo post-iniezione	200 mL/min per 3 minuti
Gas di trasporto controllato dal GC	

### Calibrazione/linearità

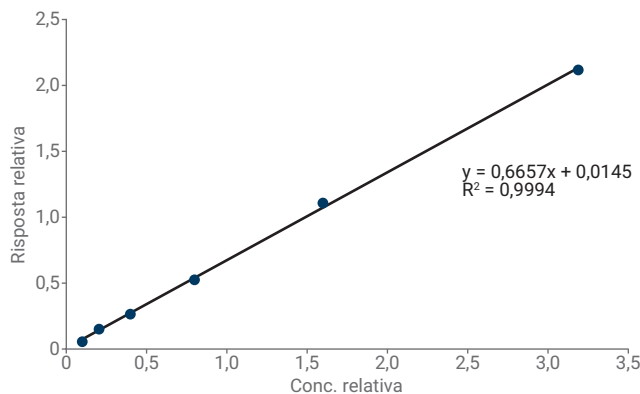
La calibrazione è stata effettuata con le colonne J&W DB-BAC1 UI e J&W DB-BAC2 UI, prima su singola colonna, poi nella configurazione a doppia colonna e doppio FID. In entrambi i casi, è stata costruita una curva di calibrazione a sei livelli a 10, 20, 40, 80,

160 e 320 mg/dL di etanolo in acqua con *n*-propanolo a 100 mg/dL come standard interno. Ad ogni livello sono state effettuate iniezioni in replicato (n=3). Le Figure 2 e 3 mostrano le curve di calibrazione per l'etanolo con le colonne J&W DB-BAC1 UI e J&W DB-BAC2 UI nella configurazione a colonna singola.

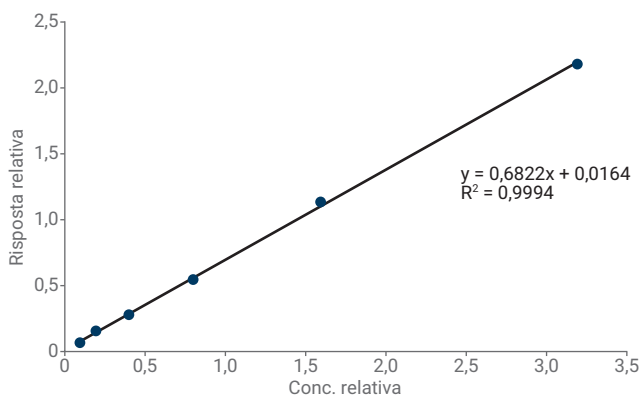
Dopo aver calibrato le colonne singolarmente, è stato installato un raccordo a T inerte per determinare le curve di calibrazione simultanee. Le Figure 4 e 5 mostrano le curve di calibrazione per la configurazione a doppia colonna e doppio FID.



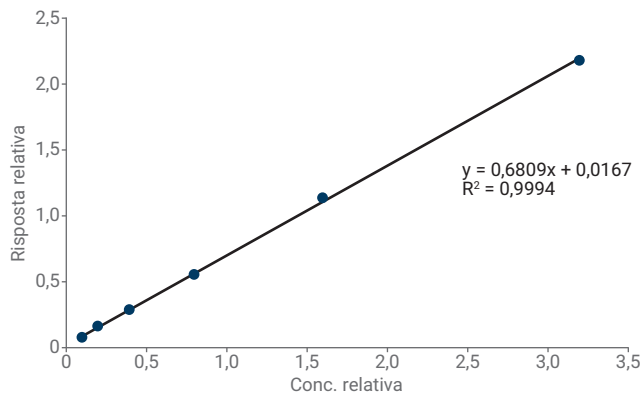
**Figura 2.** Curva di calibrazione dell'etanolo rispetto allo standard interno con la colonna J&W DB-BAC1 UI nella configurazione a singola colonna.



**Figura 3.** Curva di calibrazione dell'etanolo rispetto allo standard interno con la colonna J&W DB-BAC2 UI nella configurazione a singola colonna.



**Figura 4.** Curva di calibrazione dell'etanolo rispetto allo standard interno con la J&W DB-BAC1 UI nella configurazione a doppia colonna.



**Figura 5.** Curva di calibrazione dell'etanolo rispetto allo standard interno con la J&W DB-BAC2 UI nella configurazione a doppia colonna.

## Ripetibilità

La ripetibilità di area e tempo di ritenzione è stata determinata rispettivamente a 15 e 60 mg/dL (Tabelle da 4 a 6).

La Tabella 4 mostra che le RSD per ciascuna concentrazione e colonna sono inferiori al 2%.

I tempi di ritenzione per tutte le combinazioni di composto, colonna e concentrazione sono rimasti essenzialmente costanti a valori pari o inferiori allo 0,07%.

## Test generale di risoluzione con miscela di controllo della BAC

Per documentare le prestazioni delle colonne J&W DB BAC1-UI e J&W DB BAC2-UI, è stata analizzata la miscela Agilent di controllo della BAC (codice 5190-9765) usando la configurazione a doppia colonna. La Figura 6 riporta i cromatogrammi che mostrano la separazione dei composti della miscela con le colonne J&W DB BAC1-UI e J&W DB BAC2-UI.

I cromatogrammi in Figura 6 mostrano che tutti e 12 i componenti della miscela di controllo della BAC, inclusi acetaldeide ed etanolo, sono risolti l'uno rispetto all'altro con entrambe le colonne. Tutti i picchi risultano, inoltre, simmetrici con entrambe le colonne.

**Tabella 4.** Deviazioni standard relative (RSD%) su 10 iniezioni della risposta dell'etanolo rispetto alla risposta dello standard interno a 15 e 60 mg/dL con ciascuna colonna.

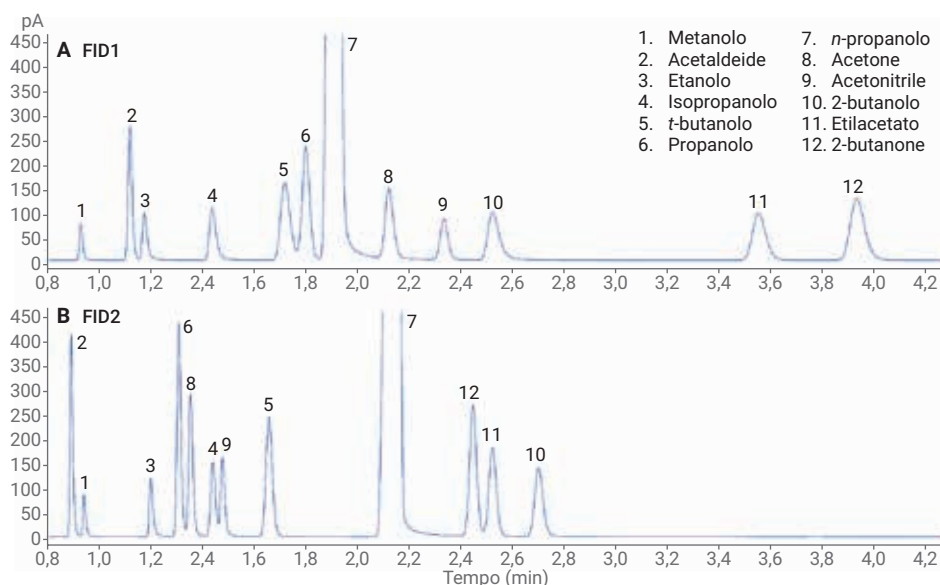
Colonna/concentrazione di etanolo	15 mg/dL	60 mg/dL
J&W DB-BAC1 UI	1,33%	1,08%
J&W DB-BAC2 UI	1,25%	1,10%

**Tabella 5.** RSD% su 10 iniezioni del tempo di ritenzione dell'etanolo a 15 e 60 mg/dL.

Colonna/concentrazione di etanolo	15 mg/dL	60 mg/dL
J&W DB-BAC1 UI	0,07%	0,03%
J&W DB-BAC2 UI	0,07%	0,03%

**Tabella 6.** RSD% su 10 iniezioni del tempo di ritenzione dell'*n*-propanolo per i gruppi di dati con etanolo alle concentrazioni di 15 e 60 mg/dL.

Colonna/concentrazione di etanolo	15 mg/dL	60 mg/dL
J&W DB-BAC1 UI	0,05%	0,02%
J&W DB-BAC2 UI	0,05%	0,05%



**Figura 6.** Cromatogrammi della miscela di controllo della BAC separata con le colonne J&W DB-BAC1 UI (A) e J&W DB-BAC2 UI (B).

## Conclusione

Il sistema GC 8860 con campionatore per spazio di testa 7697A permette l'identificazione, la quantificazione e la conferma dell'alcol nel sangue in una singola analisi e soddisfa la maggior parte dei requisiti del metodo.

La linearità con entrambe le colonne è eccellente sia nella configurazione a colonna singola che a doppia colonna, così come la precisione dell'area e del tempo di ritenzione e la capacità di separare efficacemente tutti i composti di interesse l'uno rispetto all'altro.

Il GC 8860 rappresenta un metodo economico ma efficace per determinare la concentrazione di etanolo nelle analisi di routine.

## Bibliografia

1. Boswell, H. A.; Dorman, F. L. Uncertainty of Blood Alcohol Concentration (BAC) Results as Related to Instrumental Conditions: Optimization and Robustness of BAC Analysis Headspace Parameters. *Chromatography* **2015**, 2, 691–708.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Per uso forense.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, 8 gennaio 2019  
5994-0443ITE