

Blutalkoholanalyse mit dem 8890 GC-System mit dualem FID und integriertem Agilent 8697 Headspace-Probengeber

Autor

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Die gesetzlich verankerten Höchstgrenzen für die Blutalkoholkonzentration (BAK) beim Führen von Kraftfahrzeugen variieren weltweit. Die meisten Länder haben die Höchstgrenze der Intoxikation mit Alkohol auf 0,5 oder 0,8 Promille festgelegt. Die statistische Bewertung des Agilent 8697 Headspace-Probengebers in Verbindung mit einem Agilent 8890 GC-System zeigt eine hervorragende Linearität für Ethanol zwischen 0,2 und 4 Promille. Das Gerätesystem verfügt über eine Konfiguration mit zwei Säulen und zwei Flammenionisationsdetektoren (FID). Die Reproduzierbarkeit von Probe zu Probe bei einer Konzentration von 0,5 Promille liegt bei einer relativen Standardabweichung von 2 % für die meisten Alkohole und Carbonylverbindungen in einer Mischung.

Einleitung

Die BAK-Analyse mittels GC ist eine etablierte Testform in gesetzlichen, forensischen und diagnostischen Szenarien. Blut ist eine extrem komplexe Mischung größtenteils nicht flüchtiger Substanzen. Diese Tatsache stellt eine enorme Herausforderung für Direktinjektionen von Vollblutproben in herkömmlichen GC-Systemen dar. Alkohole und/oder Alkoholmetaboliten mit niedrigem Molekulargewicht, die im Fall einer Intoxikation oder Exposition vorhanden sind, sind sehr viel flüchtiger als der Rest der Blutmatrix, was die Verwendung der Headspace-Probenvorbereitungstechnik ermöglicht.

Die Einbeziehung eines Headspace-Probengebers in das System zur Extraktion des flüchtigen Anteils einer Probe minimiert die Unannehmlichkeiten sowohl von umfangreichen Probenvorbereitungsschritten als auch von Bedienungsfehlern. Der 8697 Headspace-Probengeber nutzt eine Technologie mit Ventil und Probenschleife, die sich auch in der Vergangenheit als erfolgreich erwiesen hat, sowie zusätzlich eine verbesserte Pneumatiksteuerung, die vollständig in den GC-Treiber integriert ist, und verschiedene Verbesserungen für den Anwender. Diese Verbesserungen umfassen Schritt-für-Schritt-Diagnosen, die über die Browserschnittstelle oder Touchscreen-Interaktionen verfügbar

sind, Kontrollleuchten, die die richtige Positionierung der Probenträger bestätigen, und eine verstärkte Übertragungsleitung. Ähnlichkeiten der Parameterbereiche ermöglichen eine problemlose Migration von vorhandenen 7697A Headspace-Parametern.^{1,2,3}

Experimentelles

Ein Agilent 8890 GC-System mit Split/Splitless-Einlass und zwei Flammenionisationsdetektoren (FID) wurden verwendet, um die vom Agilent 8697 Headspace-Probengeber erhaltenen Proben zu verarbeiten.

Weitere Einzelheiten zum System sind in Abbildung 1 angegeben. Die für die Tests verwendeten analytischen Standards und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Bedingungen der Methode sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ein Volumen von 1 l Wasser (Millipore), das 0,1 Volumenprozent t-Butanol enthielt, wurde für den internen Standard und als Lösemittel hergestellt. Die Headspace-Probenflaschen zur Überprüfung enthielten 0,5 ml Probenvolumen, wobei einem Volumen von 450 µl Wasser/t-Butanol-Lösung 50 µl Standard zugegeben wurden.

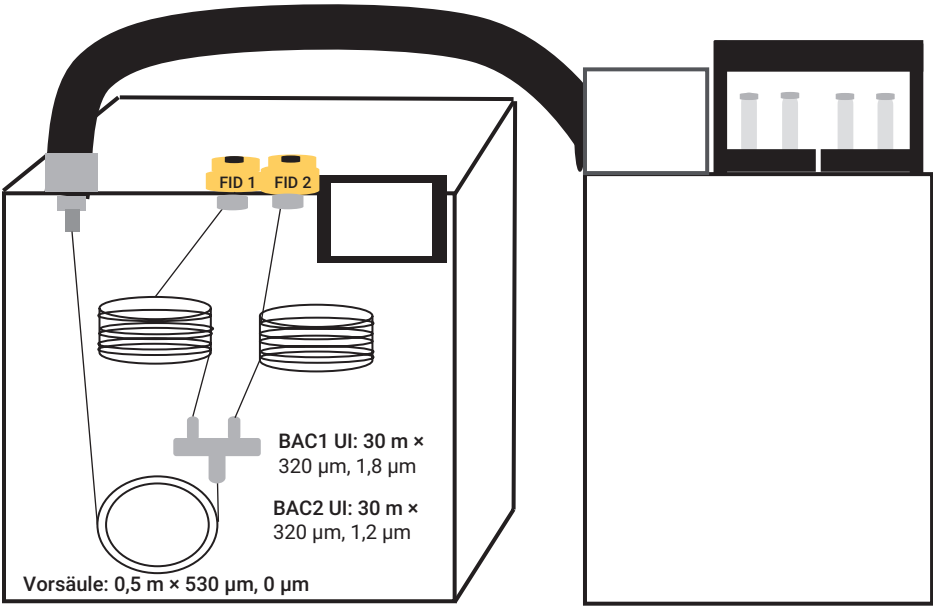


Abbildung 1: Für die Tests verwendete Konfiguration des Headspace-GC-Systems.

Tabelle 1: Für die Tests verwendete Verbrauchsmaterialien für das Gerät und Standards.

Verbrauchsmaterialien		Standards		Anbieter	Test
Probenflaschen, 20 ml, und Bördelkappenverschlüsse	Best.-Nr. 5190-2286	Blutalkohol-Checkout-Mischung	5190-9765	Agilent	Auflösung
GC-Liner (2 mm ID)	Best.-Nr. 5190-6168	Ethanolkalibrierung	G3440-85035	Agilent	Linearität
Übertragungsleitung (deaktivierte Fused Silica-Kapillare)	0,53 mm ID	t-Butanol, > 99 %	24127	Millipore/Sigma	
Säulen		Anwendungsspezifische Lösemittelmischung	Anwendungsspezifisch	Restek	Reproduzierbarkeit
Vorsäule: 0,5 m x 0,53 mm x 0 µm	Best.-Nr. 160-2535-10				
Säule 1: Agilent J&W DB-BAC1 UI (30 m x 0,32 mm x 1,8 µm)	Best.-Nr. 123-9334UI				
Säule 2: Agilent J&W DB-BAC2 UI (30 m x 0,32 mm x 1,2 µm)	Best.-Nr. 123-9434UI				

Tabelle 2: Für die Tests verwendete Headspace- und GC-Bedingungen.

Bedingungen für den 8697 Headspace-Probengeber	
Ofentemperatur	70 °C
Schleifentemperatur	80 °C
Übertragungsleitungs-temperatur	90 °C
Äquilibration der Probenflaschen	7 min
Injektionszeit	1 min
Probenflaschengröße	20 ml
Probenflaschen-Füllmodus	Standard
Fülldruck	15 psi
Druckgas	Stickstoff
Schleifen-Füllmodus	Anwendungsspezifisch
Enddruck der Schleife	1,5 psi
Schleifenäquilibration	0,05
Schleifenvolumen	1 ml
Bedingungen für das 8890 GC-System	
Einlasstemperatur	150 °C
Splitverhältnis	10:1
Modus	Konstanter Druck
Einlassdruck	21 psi (Helium)
Ofen	40 °C isotherm für 5 Minuten
Temperatur der FID (beide)	250 °C
Luftstrom	400 ml/min
Wasserstofffluss	30 ml/min
Makeup-Gas (N ₂)	25 ml/min

Ergebnisse und Diskussion

Um die Leistung des 8697 Headspace-Probengebers zu bewerten, wurden drei Tests verwendet: die Untersuchung der Linearität für Ethanol, der Reproduzierbarkeit von Probe zu Probe und der Auflösung der Standardmischung für BAK-Analysen.

Linearität für Ethanol

Mit sechs Datenpunkten zwischen 0,02 und 0,4 mg/dl wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Einzelne Diagramme von Kalibrierungen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Regression der Kurve wurde unter Verwendung des internen Standards, *t*-Butanol, und aus dem Vergleich relativer Verhältnisse ohne Gewichtung generiert. Von den Linearitätstests für Ethanol wurden mehrere Wiederholungen durchgeführt, wobei alle R²-Werte in diesem Bereich über 0,9995 lagen.

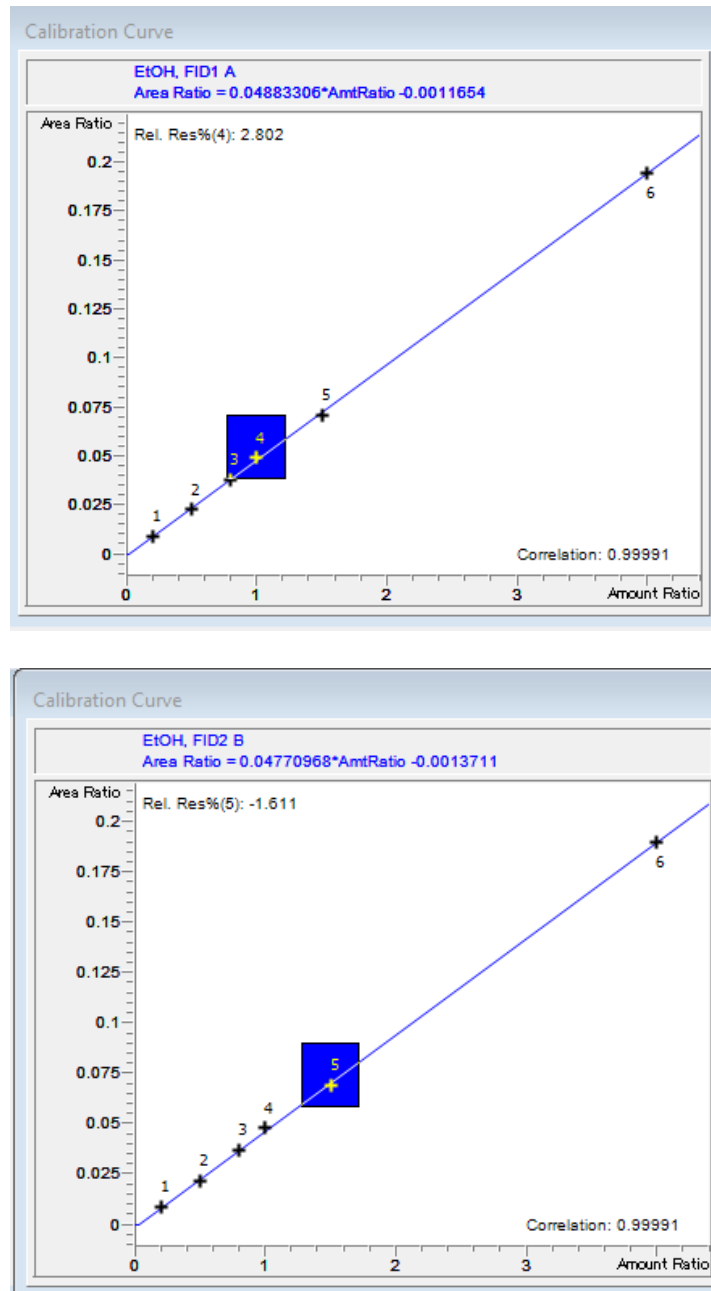


Abbildung 2: Diagramme der Ethanolkalibrierung für beide Flammenionisationsdetektoren im Bereich von 0,02 bis 0,4 mg/dl.

Reproduzierbarkeit

Eine Untersuchung zur Reproduzierbarkeit wurde unter Verwendung einer Lösung mit mehreren Komponenten durchgeführt, die so zur Lösung aus Wasser und internem Standard zugegeben wurde, dass in der Lösung in jeder Headspace-Probenflasche eine Konzentration von 0,05 mg/dl vorlag. In Tabelle 3 sind die Retentionszeiten und die Reproduzierbarkeit für jede Verbindung in Bezug auf den internen Standard, *t*-Butanol, für 12 aufeinanderfolgende Injektionen aufgeführt.

Auflösung

Die Verwendung des Säulenpaares Agilent J&W DB-BAC1 und DB-BAC2 UI mit Bestätigungssäule bietet eine gute Auflösung unter diesen Bedingungen. Die Flussrate kann nach der jeweiligen Liste der zu analysierenden Verbindungen und nach den Anforderungen an die Auflösung entweder erhöht oder verringert werden. Die Chromatogramme für beide Säulen sind in Abbildung 3 gezeigt, die Retentionszeiten und die jeweilige Auflösung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Reproduzierbarkeit von Probe zu Probe mit der Standardmischung für BAK-Analysen.

Verbindung	FID 1		FID 2	
	RT	RRF	RT	RRF
Methanol	0,03 %	2,06 %	0,03 %	1,72 %
Acetaldehyd	0,04 %	2,09 %	0,00 %	2,11 %
Ethanol	0,00 %	2,16 %	0,02 %	1,69 %
Isopropanol	0,02 %	1,49 %	0,03 %	1,34 %
Aceton	0,02 %	0,74 %	0,00 %	1,01 %
1-Propanol	0,04 %	1,90 %	0,02 %	1,61 %
2-Butanon	0,04 %	2,74 %	0,02 %	2,68 %

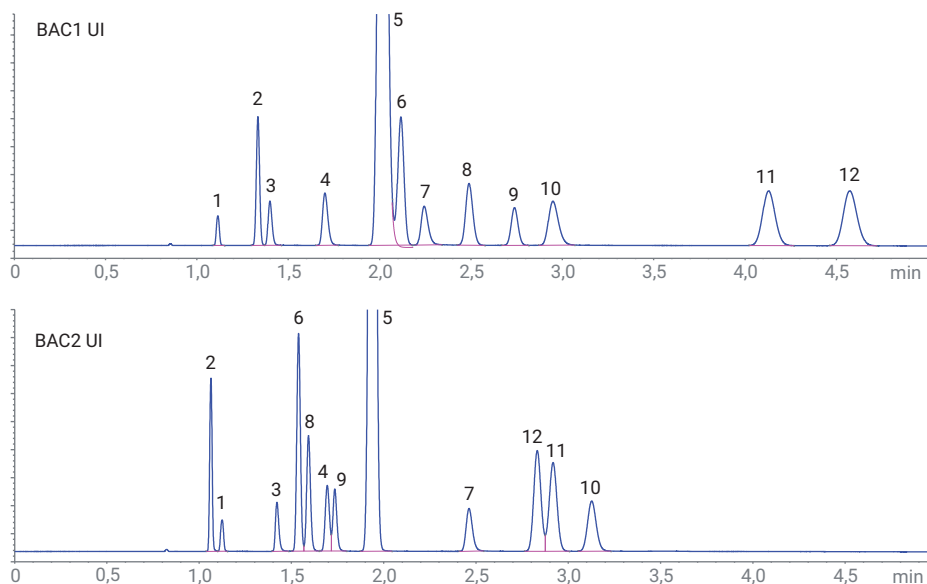


Abbildung 3: FID-Chromatogramme für die Blutalkohol-Checkout-Mischung auf den beiden Kanälen mit Agilent J&W DB-BAC1 UI- und DB-BAC2 UI-Säulen.

Tabelle 4: Peakzuordnung, Retentionszeiten und nach USP berechnete Auflösungen für die Säulen BAC1 UI und BAC2 UI.

Peaknummer	Verbindung	RT BAC1 UI (min)	Rs BAC1 UI	RT BAC2 UI (min)	Rs BAC2 UI
1	Methanol	1,071		1,081	2,7
2	Acetaldehyd	1,284	7,9	1,022	
3	Ethanol	1,348	2,0	1,371	11,5
4	Isopropanol	1,644	7,2	1,640	3,1
5	<i>t</i> -Butanol	1,953	5,2	1,881	5,3
6	Propanal	2,048	1,3*	1,485	4,1
7	<i>n</i> -Propanol	2,175	2,0*	2,388	10,6
8	Aceton	2,412	3,8	1,538	1,8
9	Acetonitril	2,65	3,9	1,674	1,1
10	2-Butanol	2,867	3,0	3,043	3,3
11	Ethylacetat	4,027	12,4	2,84	1,6
12	2-Butanon	4,456	4,1	2,753	7,1

Der Wert für die Auflösung in der Tabelle ist jeweils der Wert, der den Zielpeak mit dem Peak der Verbindung vergleicht, die direkt vor dem Zielpeak eluiert. Die Werte für die Auflösung von Propanal und *n*-Propanol wurden manuell berechnet. Um zwischen der Ethanolkalibrierung und dem Auflösungstest der Standardmischung eine konsistente Response für *t*-Butanol (ISTD) zu erzielen, wurde bei den Integrationsparametern ein Skimming an der abfallenden Peakflanke verwendet. Diese Änderung machte die automatisierte Berechnung der Peakbreite mit tangentialer Anpassung unmöglich, die für die Berechnung der Auflösung nach USP erforderlich ist (Abbildung 4).

Aufgrund der unterschiedlichen Elutionsreihenfolge auf den beiden Säulen werden Verbindungen mit schlechter Auflösung auf Säule 1 auf Säule 2 besser getrennt. Dies zeigt sehr gut die komplementären Eigenschaften dieser Analyse mit Bestätigungssäule. Anstelle des *t*-Butanols kann auch *n*-Propanol als interner Standard verwendet werden.

Peakeigenschaften wie Peakbreite und Peaksymmetrie liefern hilfreiche Hinweise über den Gesamtzustand des Systems und der Verbrauchsmaterialien. Die 8890 und die Intuvo 9000 GC-Systeme bieten eine Funktion namens Peak Evaluation⁴, die aktiviert werden kann, um Hauptmerkmale einer Applikation zu überwachen und den Nutzer darauf hinzuweisen, wenn kleine Veränderungen auftreten, bevor ein Produktivitätsverlust entsteht. Ein einfaches Firmware-Upgrade bestimmter vorhandener GC-Mainframes ermöglicht die Nutzung dieser Funktion.

www.agilent.com/chem

Für forensische Zwecke.

RA44246.726412037

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Gedruckt in den USA, 8. März 2021
5994-3126DEE

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

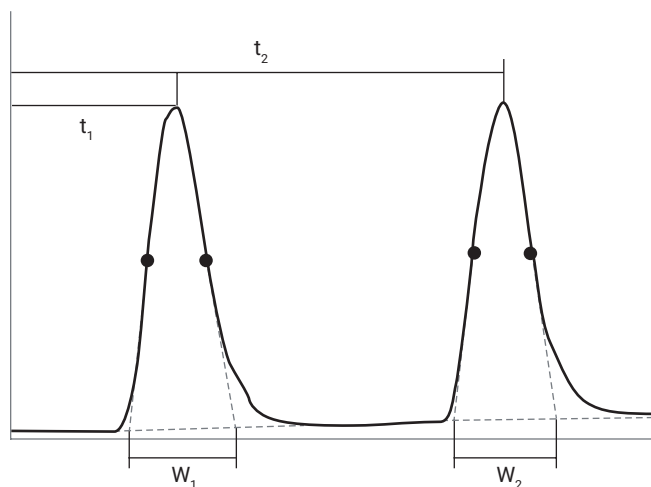


Abbildung 4: Berechnung der Auflösung nach USP wie in der Agilent OpenLab ChemStation Edition, Version C.1.10 festgelegt.

Schlussfolgerungen

Der Agilent 8697 Headspace-Probengeber eignet sich für einen einfachen Methodentransfer und eine dem Agilent 7697A Probengeber entsprechende Leistung. Die Vorteile des 8697 Probengebers sind eine Erweiterung der GC-Intelligenz in einem vollständig integrierten Treiber, eine verbesserte nutzergeführte Diagnostik und per Mausklick zugängliche Ressourcen, die den Anwender durch Wartung, Betrieb und Fehlersuche führen, um die Effizienz zu fördern.

Literatur

1. Analyse der Blutalkoholkonzentration mit einem Agilent Intuvo 9000 GC-System. Application Note von Agilent Technologies, Publikationsnummer 5991-8999DEE, **2020**.
2. Abercrombie, V. Improved Resolution and Peak Shape Performance for the Determination of Blood Alcohol Concentration Using Agilent J&W DB-BAC1 Ultra Inert and DB-BAC2 Ultra Inert Columns (Verbesserte Auflösung und Peakform für die Bestimmung von Blutalkoholkonzentrationen mit Agilent J&W DB-BAC1 Ultra Inert- und DB-BAC2 Ultra Inert-Säulen). Application Note von Agilent Technologies, Publikationsnummer 5991-8206EN, **2017**.
3. Wieder, L., Pan, J., Veeneman, R. Forensische Analyse der Blutalkoholkonzentration. Application Note von Agilent Technologies, Publikationsnummer 5994-0443DEE, **2019**.
4. Agilent Technologies: GC Intelligence. <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-intelligence> (aufgerufen am 16. Februar 2021).