

Analisi di alcoli nel sangue con il campionatore per spazio di testa integrato Agilent 8697 con il sistema GC a doppio FID 8890

Autore

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

I limiti legali di concentrazione di alcoli nel sangue (BAC) per operare veicoli a motore variano nel mondo, con molti paesi che stabiliscono livelli di intossicazione a 0,05 o 0,08%. La valutazione statistica del campionatore per spazio di testa Agilent 8697 collegato al sistema GC Agilent 8890 mostra un'ottima linearità per l'etanolo tra 0,02 e 0,4%. La strumentazione ha una configurazione a doppia colonna e doppio FID e presenta riproducibilità tra vial e vial alla concentrazione di 0,05%, con RSD inferiore a 2 % per la maggior parte dei composti alcolici e carbonilici in una miscela.

Introduzione

L'analisi della concentrazione di alcoli nel sangue (BAC) mediante GC è un test ampiamente riconosciuto in ambito legale, medico-legale e diagnostico. Il sangue è una miscela estremamente complessa di composti ampiamente non volatili. Di conseguenza, l'iniezione diretta di campioni di sangue intero utilizzata negli approcci di GC tradizionali presenta notevoli difficoltà. Alcoli a basso peso molecolare e/o metaboliti alcolici, presenti in casi di intossicazione o esposizione, sono molto più volatili del resto della matrice sanguigna, il che rende possibile il campionamento dello spazio di testa.

L'utilizzo di un campionatore per estrarre il contenuto volatile di un campione riduce al minimo gli inconvenienti legati a una lunga preparazione del campione e al rischio di errore umano. Il campionatore per spazio di testa 8697 sviluppa ulteriormente la tecnologia di valvola e loop, la cui efficacia è stata dimostrata in passato, con l'aggiunta di un controllo migliorato della pneumatica, l'integrazione completa nel driver del GC e numerosi miglioramenti per l'utilizzatore. Tali miglioramenti includono la diagnostica passo a passo, disponibile tramite l'interfaccia browser o mediante interazioni con lo schermo touch, indicatori luminosi che confermano il corretto posizionamento del vassoio e una transfer line rinforzata. La somiglianza delle zone dei parametri consente una semplice migrazione dai parametri di spazio di testa di sistemi 7697A esistenti.^{1,2,3}

Condizioni sperimentali

Un sistema GC Agilent 8890, configurato con iniettore split/splitless e due rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID), è stato usato per processare il campione dal campionatore per spazio di testa Agilent 8697. Ulteriori dettagli riguardo al sistema sono forniti nella Figura 1, mentre gli standard analitici e i prodotti di consumo utilizzati per i test sono forniti

nella Tabella 1. Le condizioni del metodo sono riportate nella Tabella 2. Un lotto da 1 L di acqua (erogata da Millipore) contenente 0,1% (in volume) di *t*-butanolo è stato preparato per lo standard interno e il solvente. I vial per spazio di testa utilizzati per il test contenevano 0,5 mL di volume di campione, con 50 µL di standard aggiunti a 450 µL di soluzione di acqua/*t*-butanolo.

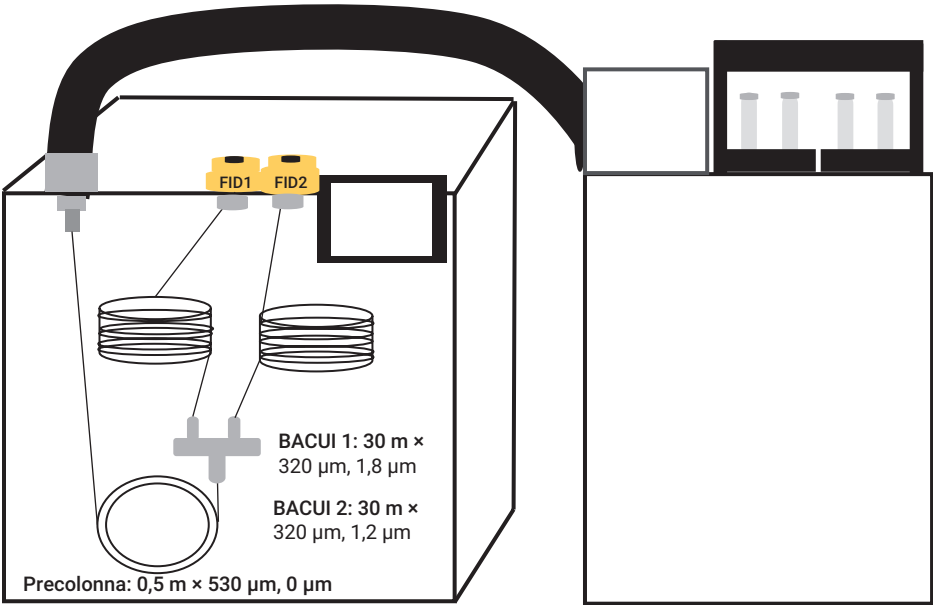


Figura 1. Dettagli della configurazione di spazio di testa/sistema GC utilizzata nei test.

Tabella 1. Prodotti di consumo per la strumentazione e standard utilizzati nei test.

Prodotti di consumo		Standard		Fornitore	Test
Vial da 20 mL e tappi a chiusura meccanica	codice 5190-2286	Miscela per risoluzione BAC	5190-9765	Agilent	Risoluzione
Liner per GC (d.i. 2 mm)	codice 5190-6168	Calibrazione etanolo	G3440-85035	Agilent	Linearità
Transfer line (silice fusa disattivata)	d.i. 0,53 mm	<i>t</i> -butanolo, >99 %	24127	Millipore/Sigma	
Colonne		Solventi personalizzati	Personalizzato	Restek	Riproducibilità
Precolonna: 0,5 m x 0,53 mm x 0 µm	codice 160-2535-10				
Colonna 1: Agilent J&W DB-BAC1 UI (30 m x 0,32 mm x 1,8 µm)	codice 123-9334UI				
Colonna 2: Agilent J&W DB-BAC2 UI (30 m x 0,32 mm x 1,2 µm)	codice 123-9434UI				

Tabella 2. Condizioni per spazio di testa e sistema GC utilizzate nei test.

Condizioni per lo spazio di testa 8697	
Temperatura del forno	70 °C
Temperatura del loop	80 °C
Temperatura della transfer line	90 °C
Equilibratura dei vial	7 min
Tempo di iniezione	1 min
Dimensioni dei vial	20 mL
Modalità di riempimento dei vial	Predefinito
Pressione di riempimento	15 psi
Gas di pressurizzazione	Azoto
Modalità di riempimento del loop	Personalizzato
Pressione loop finale	1,5 psi
Equilibratura del loop	0,05
Volume del loop	1 mL
Condizioni per il sistema GC 8890	
Temperatura dell'iniettore	150 °C
Rapporto di splittaggio	10:1
Modalità	Pressione costante
Pressione in ingresso	21 psi (elio)
Forno	40 °C, isotermico per 5 minuti
Temperatura FID (entrambi)	250 °C
Flusso d'aria	400 mL/min
Flusso di idrogeno	30 mL/min
Gas di makeup (N ₂)	25 mL/min

Risultati e discussione

Tre test sono stati utilizzati per valutare le prestazioni del campionatore per spazio di testa 8697: linearità per l'etanolo, riproducibilità tra vial e vial e risoluzione dello standard di miscela BAC.

Linearità per l'etanolo

Una curva di calibrazione è stata creata utilizzando sei punti dati tra 0,02 e 0,4 mg/dL. Grafici individuali ottenuti da un test di calibrazione sono forniti nella Figura 2. La curva di regressione è stata generata utilizzando lo standard interno, t-butanolo, e confrontando i rapporti relativi senza ponderazione. Sono stati effettuati vari replicati del test di linearità per l'etanolo, con tutti i valori di R² che superano 0,9995 su questo intervallo.

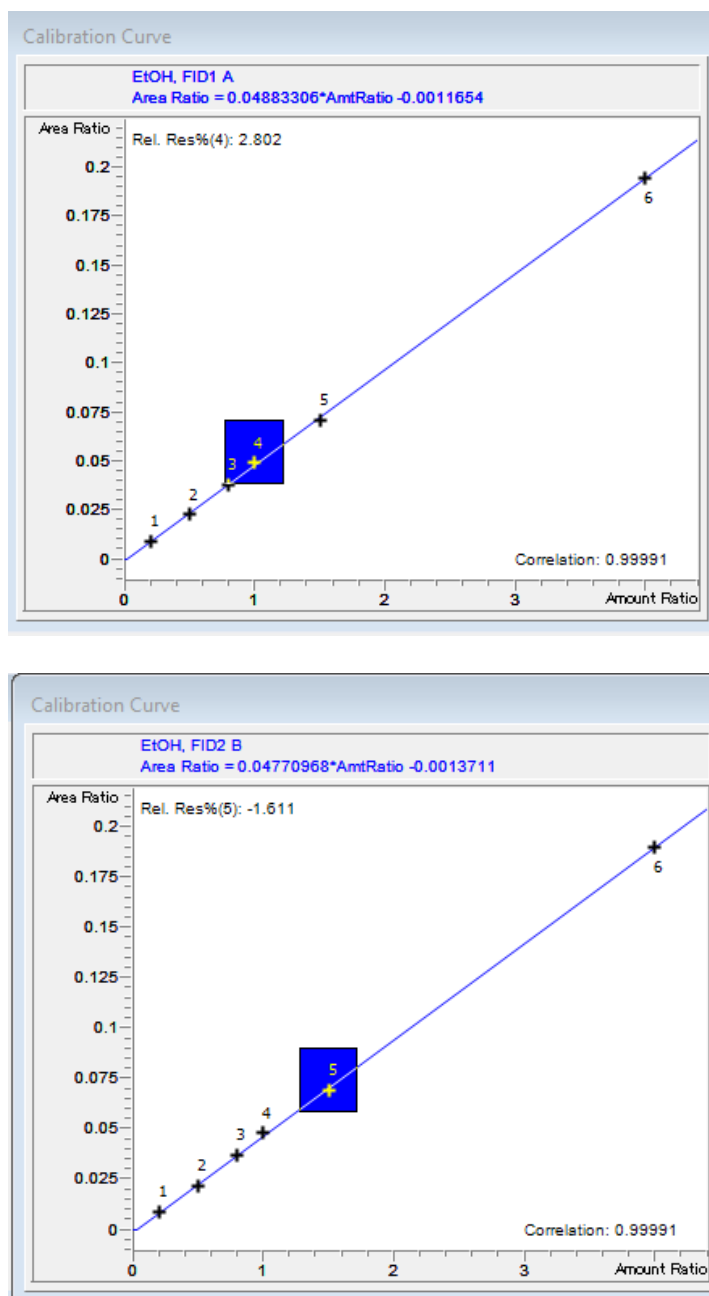


Figura 2. Grafici di calibrazione dell'etanolo per entrambi i FID nell'intervallo tra 0,02 e 0,4 mg/dL.

Riproducibilità

È stato effettuato uno studio di ripetibilità utilizzando una soluzione a più componenti aggiunta alla soluzione acqua/standard interno (ISTD) per creare una concentrazione della soluzione di 0,05 mg/dL in ciascun vial per spazio di testa. La Tabella 3 riporta i dettagli relativi al tempo di ritenzione e alla riproducibilità di ciascun composto con riferimento allo standard interno, *t*-butanolo, su 12 iniezioni in sequenza.

Risoluzione

L'uso della coppia di colonne di conferma costituita da Agilent J&W DB-BAC1 e DB-BAC2 UI ha fornito una risoluzione significativa in queste condizioni. Il flusso può essere accelerato o rallentato, a seconda dell'elenco dei singoli composti e delle esigenze di risoluzione. Cromatogrammi per entrambe le colonne sono forniti nella Figura 3, mentre i dati relativi a tempo di ritenzione e risoluzione sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 3. Riproducibilità tra vial e vial di uno standard di miscela BAC.

Composto	FID 1		FID 2	
	RT	RRF	RT	RRF
Metanolo	0,03%	2,06%	0,03%	1,72%
Acetaldeide	0,04%	2,09%	0,00%	2,11%
Etanolo	0,00%	2,16%	0,02%	1,69%
Isopropanolo	0,02%	1,49%	0,03%	1,34%
Acetone	0,02%	0,74%	0,00%	1,01%
1-propanolo	0,04%	1,90%	0,02%	1,61%
2-butanone	0,04%	2,74%	0,02%	2,68%

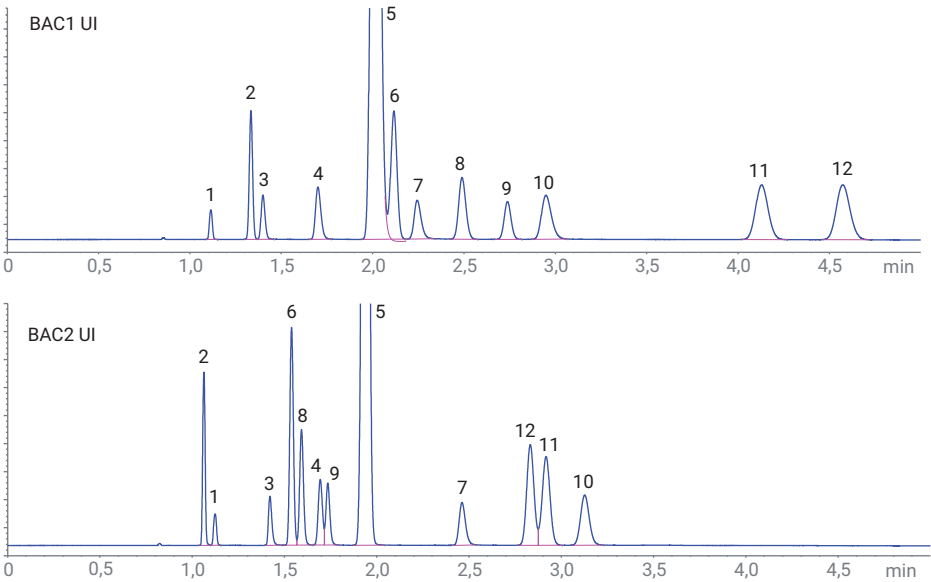


Figura 3. Cromatogrammi FID della miscela di risoluzione BAC Agilent con colonne Agilent J&W DB-BAC1 UI e DB-BAC2 UI.

Tabella 4. ID dei picchi, tempi di ritenzione e calcoli di risoluzione (USP) con colonne BAC1 UI e BAC2 UI.

Indice picco	Nome composto	RT BAC1 UI (min)	Ris BAC1 UI	RT BAC2 UI (min)	Ris BAC2 UI
1	Metanolo	1,071		1,081	2,7
2	Acetaldeide	1,284	7,9	1,022	
3	Etanolo	1,348	2,0	1,371	11,5
4	Isopropanolo	1,644	7,2	1,640	3,1
5	<i>t</i> -butanolo	1,953	5,2	1,881	5,3
6	Propanale	2,048	1,3*	1,485	4,1
7	<i>n</i> -propanolo	2,175	2,0*	2,388	10,6
8	Acetone	2,412	3,8	1,538	1,8
9	Acetonitrile	2,65	3,9	1,674	1,1
10	2-butanolo	2,867	3,0	3,043	3,3
11	Etilacetato	4,027	12,4	2,84	1,6
12	2-butanone	4,456	4,1	2,753	7,1

Il valore della risoluzione riportato nella tabella è il valore comparativo relativo al picco target e al picco di composto immediatamente precedente al picco target. I valori di risoluzione per propanale e *n*-propanolo sono stati calcolati manualmente. Per mantenere una risposta uniforme del *t*-butanolo (ISTD) tra standard di miscela di calibrazione e di risoluzione per l'etanolo, uno skim di coda è stato applicato nei parametri di integrazione. Questa modifica ha disabilitato il calcolo automatico della larghezza alla tangente del picco, che è necessaria per i calcoli di risoluzione della USP (United States Pharmacopeia) (Figura 4). Poiché l'ordine di eluizione non è identico tra le due colonne, i composti a bassa risoluzione nella colonna 1 sono separati meglio nella colonna 2, il che dimostra in modo efficace la natura complementare di questa analisi di conferma. In alternativa, è possibile utilizzare *n*-propanolo come standard interno.

Attributi dei picchi come larghezza e simmetria possono essere utili indicatori dello stato di salute complessivo del sistema e dei prodotti di consumo. I sistemi GC 8890 e Intuvo 9000 offrono una funzione chiamata Valutazione dei picchi⁴ che può essere abilitata per monitorare caratteristiche fondamentali di un'applicazione, segnalando all'utilizzatore lievi differenze prima che si verifichi una qualsiasi perdita di produttività. Un semplice aggiornamento del firmware consente agli utilizzatori di mainframe GC qualificati esistenti di aggiungere questa funzione.

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

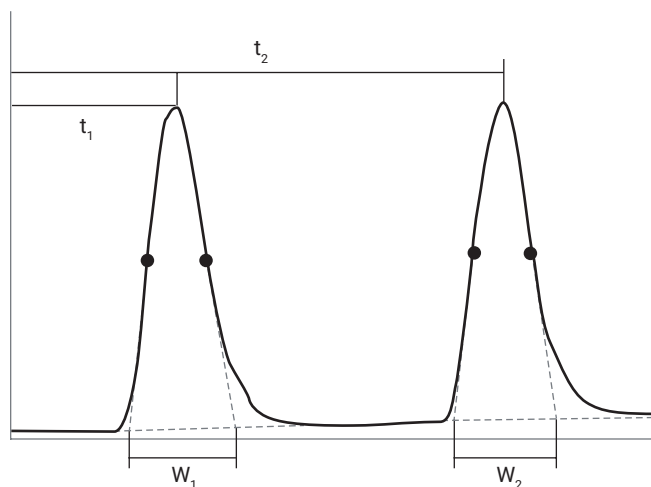


Figura 4. Calcolo USP della risoluzione come determinato da Agilent OpenLab ChemStation edition, versione C.1.10.

Conclusione

Il campionatore per spazio di testa Agilent 8697 offre un semplice trasferimento del metodo e prestazioni equivalenti rispetto al campionatore Agilent 7697A. Ciò che il sistema 8697 offre è un'espansione delle funzioni intelligenti del GC a includere un driver completamente integrato, una diagnostica migliorata gestita dall'utilizzatore e risorse a portata di mano per guidare l'utilizzatore nella manutenzione, nell'utilizzo e nella risoluzione dei problemi per promuovere l'efficienza.

Bibliografia

1. Analysis of Blood Alcohol Concentration with an Agilent Intuvo 9000 GC System. Nota applicativa Agilent Technologies, codice di pubblicazione 5991-8999EN, **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. Nota applicativa Agilent Technologies, codice di pubblicazione 5991-8206EN, **2017**.
3. Wieder, L.; Pan, J.; Veeneman, R. Forensic Analysis of Blood Alcohol Concentration. Nota applicativa Agilent Technologies, codice di pubblicazione 5994-0443EN, **2019**.
4. Agilent Technologies: GC Intelligence. <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-intelligence> (accesso effettuato il 16 febbraio 2021).

www.agilent.com/chem

Per uso forense.

RA44246.726412037

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti, 8 marzo 2021
5994-31261TE