

# Analisi della concentrazione di alcoli nel sangue con un sistema GC Agilent Intuvo 9000

Vantaggio tecnologico: percorso del flusso GC modulare con campionamento in spazio di testa molto efficace



## Introduzione

La determinazione della concentrazione di alcoli nel sangue (BAC) richiede un controllo estremamente preciso. Determinare in maniera accurata il contenuto di etanolo nel sangue è fondamentale poiché questo parametro corrisponde direttamente al grado di ebbrezza di un individuo. Considerato che la soglia universale per la BAC è pari a 0,08 g/dL (80 mg/dL), possono esservi conseguenze legali rilevanti a seconda del valore refertato. Calibrazione accurata e alta precisione sono fattori critici al fine di ridurre gli errori. La maggior parte dei metodi basati su rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) prevede l'uso di due colonne: la prima per l'identificazione e la quantificazione iniziali, la seconda per la conferma. A seconda del laboratorio, questa attività può comportare il ricorso a due sistemi analitici separati o sfruttare invece i dispositivi CFT (Capillary Flow Technology) per ottenere lo stesso risultato su un unico sistema gascromatografico.

Il gascromatografo Agilent Intuvo 9000 semplifica le analisi a doppia colonna grazie al Flow-Chip splitter dell'iniettore Intuvo. Il Flow-Chip splitter dell'iniettore gestisce il flusso proveniente dall'iniettore inviandolo attraverso due colonne e quindi a due rivelatori FID (o altri a pressione atmosferica). In tal modo gli utilizzatori non devono eseguire calcoli, misure né tagliare i restrittori. Questo dispositivo, inoltre, fornisce un rapporto di split 1:1 alle colonne, purché le dimensioni delle colonne corrispondano, per esempio se entrambe le colonne sono da 30 m x 320 µm. Infine, consente l'analisi del campione su entrambe le colonne in un'unica analisi.

Per maggiori informazioni  
visita il sito:  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)



Sistema GC Agilent Intuvo 9000 e campionatore per spazio di testa Agilent 7697A.

## Condizioni sperimentali

Un sistema GC Intuvo è stato equipaggiato con un campionatore per spazio di testa Agilent 7697A. Sono state configurate due colonne per alcoli, DB-BAC1 Ultra Inert (UI) e DB-BAC2 Ultra Inert (UI), tra un singolo iniettore split/splitless e due rivelatori FID; le colonne sono state mantenute in condizioni isotermitiche (Tabella 1 e Tabella 2). Sono stati preparati standard di etanolo in acqua a concentrazione variabile nell'intervallo 10 - 800 mg/dL con metanolo, acetone e isopropanolo a metà concentrazione, ossia nell'intervallo 5 - 400 mg/dL. Campioni di controllo di etanolo sono stati impiegati per valutare l'accuratezza della calibrazione ed è stata usata una miscela di controllo degli alcoli nel sangue (Tabella 3) a dimostrazione della migliore risoluzione ottenuta con la nuova coppia di colonne DB-BAC UI. I vial per spazio di testa sono stati preparati aliquotando 50 µL del campione di calibrazione o controllo in 450 µL di *n*-propanolo 0,03% (v/v).

## Risultati e discussione

Per determinare le curve di calibrazione per entrambe le colonne DB-BAC1 UI e DB-BAC2 UI (Figura 1), gli standard di calibrazione sono stati acquisiti in triplicato. Le curve di calibrazione sono risultate lineari per i quattro analiti presenti negli standard di calibrazione. È stato ottenuto un coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) per l'etanolo pari o superiore a 0,9995 su entrambe le colonne. La differenza di pendenza per l'etanolo sulle due coppie colonna/rivelatore è risultata solo del 6,3%, a dimostrazione dell'accuratezza dello split 1:1 post-iniettore e della rivelazione.

Tabella 1. Sono riportate le condizioni strumentali per il sistema GC Agilent Intuvo 9000.

Sistema GC Agilent Intuvo 9000	Impostazione
Forno	40 °C (6,5 minuti)
Iniettore split/splitless	Split 10:1, 110 °C
DB-BAC1 Ultra Inert (123-9334UI-INT) 30 m × 320 µm, 1,8 µm	Elio a pressione costante, 21 psi
DB-BAC2 Ultra Inert (123-9434UI-INT) 30 m × 320 µm, 1,2 µm	Controllata dalla colonna 1
FID (anteriore e posteriore)	250 °C
H <sub>2</sub>	30 mL/min
Aria	400 mL/min
N <sub>2</sub> (make-up)	25 mL/min
Jumper Chip	110 °C (temperatura dell'iniettore)
Bus	Predefinita (a 200 °C)
Segnale anteriore/posteriore	20 Hz

Tabella 2. Sono riportate le condizioni strumentali per il campionatore per spazio di testa Agilent 7697A.

Campionatore per spazio di testa Agilent 7697A	Impostazione
Forno	70 °C
Loop	70 °C
Transfer line	90 °C
Tempo di equilibratura del vial	7 minuti
Durata dell'iniezione	0,5 minuti
Dimensioni del vial	20 mL
Agitazione del vial	Disattivata
Modalità di riempimento del vial	Predefinita (50 mL/min a 15 psi, 0,1 minuti)
Pressione di riempimento del vial	15 psi
Velocità della rampa per il loop	30 psi/min
Pressione finale del loop	1,5 psi
Tempo di equilibratura del loop	0,05 minuti

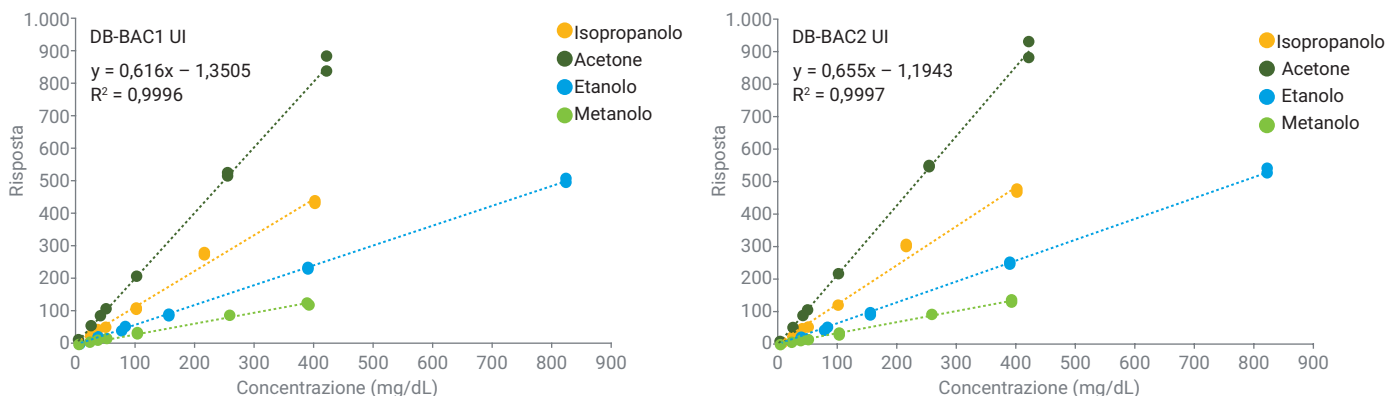


Figura 1. Curve di calibrazione per etanolo, metanolo, acetone e isopropanolo per le colonne Agilent DB-BAC1 UI e DB-BAC2 UI.

Dopo la calibrazione, sono stati preparati cinque campioni per spazio di testa con un controllo di etanolo a 80 mg/dL e con la miscela di controllo degli alcoli nel sangue (50 mg/dL). La ripetibilità dell'area, misurata dalla deviazione standard relativa (RSD), è risultata pari o inferiore a 4,1% per entrambi i canali (Tabella 4). È stata calcolata anche la precisione del tempo di ritenzione, che è risultata pari o inferiore a 0,1% (Tabella 5). L'accuratezza della calibrazione è stata verificata con campioni di controllo di etanolo (Tabella 6).

Tabella 3. Codici dei campioni di controllo di etanolo e della miscela di controllo degli alcoli nel sangue.

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
Miscela di controllo degli alcoli	5190-9765

Tabella 4. Precisione dell'area (RSD) per lo standard di etanolo a 80 mg/dL e gli analiti presenti nella miscela di controllo degli alcoli nel sangue per entrambe le colonne.

Analita	Agilent DB-BAC1 UI	Agilent DB-BAC2 UI
Standard di etanolo a 80 mg/dL	3,70%	2,80%
Metanolo (50 mg/dL)	4,10%	1,40%
Acetaldeide (50 mg/dL)	2,80%	3,00%
Etanolo (50 mg/dL)	2,30%	1,10%
Isopropanolo (50 mg/dL)	3,30%	1,90%
<i>t</i> -butanolo (50 mg/dL)	2,80%	2,70%
Propanale (50 mg/dL)	3,40%	3,00%
<i>n</i> -propanolo (50 mg/dL)	3,10%	2,10%
Acetone (50 mg/dL)	3,40%	2,90%
Acetonitrile (50 mg/dL)	2,30%	2,80%
2-butanolo (50 mg/dL)	2,00%	3,00%
Etilacetato (50 mg/dL)	3,20%	3,10%
2-butanone (50 mg/dL)	3,10%	3,00%

Tabella 5. Precisione del tempo di ritenzione (RSD) per lo standard di etanolo a 80 mg/dL e gli analiti presenti nella miscela di controllo degli alcoli nel sangue a 50 mg/dL su entrambe le colonne.

Analita	Agilent DB-BAC1 UI	Agilent DB-BAC2 UI
Standard di etanolo a 80 mg/dL	0,04%	0,10%
Metanolo	0,01%	0,02%
Acetaldeide	0,01%	0,02%
Etanolo	0,02%	0,05%
Isopropanolo	0,02%	0,04%
<i>t</i> -butanolo	0,03%	0,04%
Propanale	0,01%	0,02%
<i>n</i> -propanolo	0,03%	0,04%
Acetone	0,02%	0,03%
Acetonitrile	0,02%	0,03%
2-butanolo	0,04%	0,04%
Etilacetato	0,02%	0,03%
2-butanone	0,02%	0,03%

L'errore riscontrato per tutti i campioni di controllo rientrava in una tolleranza accettabile ( $\pm 6\%$ ). I cromatogrammi in Figura 2 dimostrano il miglioramento della risoluzione ottenuto per i vari analiti presenti nella miscela di controllo degli alcoli nel sangue. Gli standard interni comuni, *t*-butanolo ed *n*-propanolo, sono ben risolti da tutti gli analiti di interesse.

## Conclusione

Il sistema GC Agilent Intuvo 9000, equipaggiato con un campionatore per spazio di testa Agilent 7697A e configurato con uno splitter dell'iniettore, permette l'identificazione, la quantificazione e la conferma degli alcoli nel sangue in un'unica analisi. La linearità su entrambe le colonne ed entrambi i rivelatori è eccellente, così come lo sono la precisione (area e tempo di ritenzione) e l'accuratezza della determinazione della concentrazione. Grazie al percorso del flusso modulare che semplifica la configurazione a doppia colonna/doppio rivelatore, il sistema Intuvo 9000 fornisce prestazioni di valore assoluto. Gli altri vantaggi del sistema Intuvo 9000, quali le dimensioni più contenute, il luminoso touch-screen a colori e le connessioni click-and-run, migliorano ulteriormente l'esperienza degli operatori di cromatografia.

Tabella 6. Le concentrazioni sono state calcolate per un set di standard di etanolo valutati mediante le curve di calibrazione acquisite. Tutte le concentrazioni sono risultate entro il 6% della concentrazione attesa.

Standard di etanolo	Concentrazione calcolata Agilent DB-BAC1 UI	Superamento/ non superamento	Concentrazione calcolata Agilent DB-BAC2 UI	Superamento/ non superamento
20 mg/dL	19,8 mg/dL	Superamento	19,3 mg/dL	Superamento
50 mg/dL	50,0 mg/dL	Superamento	47,1 mg/dL	Superamento
80 mg/dL	79,3 mg/dL	Superamento	76,8 mg/dL	Superamento
100 mg/dL	96,7 mg/dL	Superamento	94,4 mg/dL	Superamento
150 mg/dL	152 mg/dL	Superamento	149 mg/dL	Superamento
200 mg/dL	197 mg/dL	Superamento	193 mg/dL	Superamento
300 mg/dL	302 mg/dL	Superamento	302 mg/dL	Superamento
400 mg/dL	384 mg/dL	Superamento	386 mg/dL	Superamento

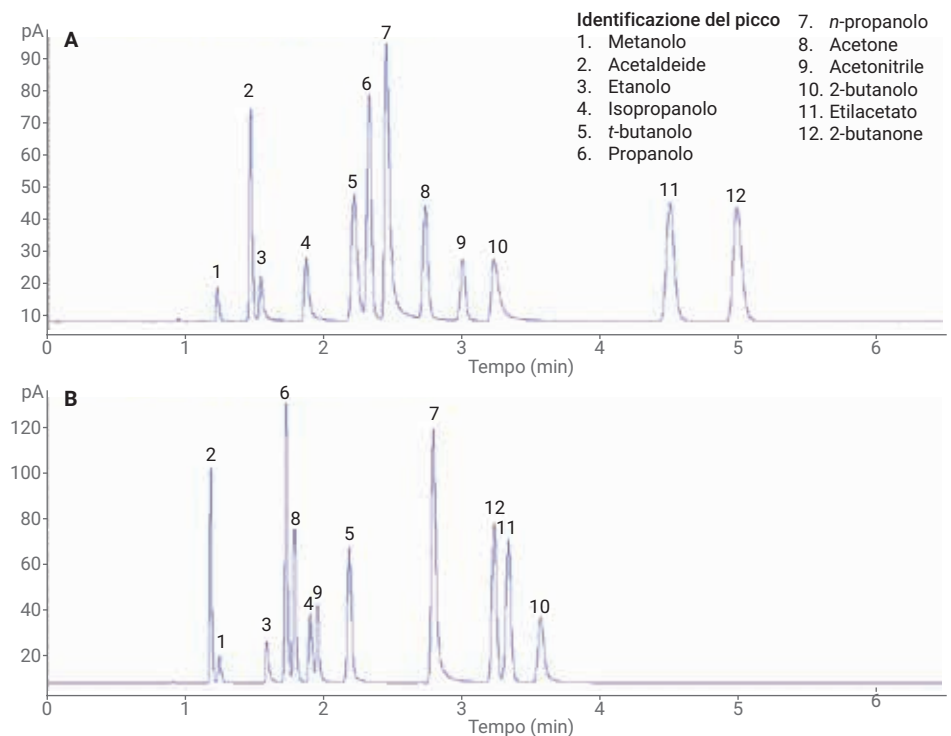


Figura 2. I cromatogrammi della miscela di controllo degli alcoli nel sangue dimostrano che è possibile risolvere il *t*-butanolo (5) e l'*n*-propanolo (7) dagli altri analiti di interesse su una colonna Agilent DB-BAC1 UI (A). L'ordine di eluizione cambia sulla colonna complementare Agilent DB-BAC 2 UI (B).