



De bepaling van "bloedalcoholen"

met behulp van gaschromatografie met cold on column injectie

Henk van der Lijke
Laboratorium Apotheek
Martiniziekenhuis
Postbus 30033, 9700 RM Groningen

Inleiding

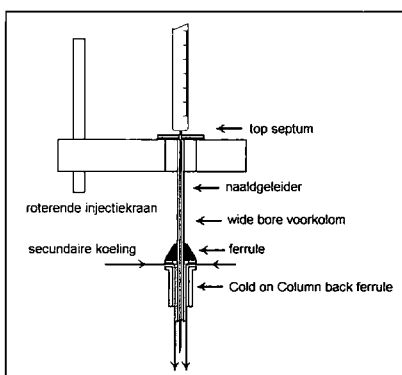
Tot 1999 werden op de apotheek van het Martiniziekenhuis ethanolspiegels bepaald op de tdx. Toen de behoefte aan uitgebreide toxicologie toenam, nam ook de behoefte om andere alcoholen en andere laagkokende stoffen te kunnen bepalen toe. De meest gangbare methode om laagkokende stoffen te analyseren is nog altijd gaschromatografie en aldus kwam er toestemming om de oude gaschromatograaf te vervangen.

De nieuwe gaschromatograaf was in eerste instantie bedoeld voor de "bloedalcoholen", maar het was bekend dat er met een gaschromatograaf ook hoogkokende verbindingen zoals psychofarmaca bepaald konden worden. Om twee vliegen in één klap te slaan werd besloten tot de aanschaf van een gaschromatograaf waarbij de twee functionaliteiten waren geïntegreerd.

Onze keuze viel op de GC8000 top van Thermo Finnigan (Interscience) met twee AS2000 automatische injectoren, twee injectiepoorten, twee kolommen en twee detectoren. Voor de alcoholen werd gekozen voor een split/splitless-injector, een Supelcowax-10-kolom en een vlamionisatiedetector. Voor de hoogkokende verbindingen werd het een cold on column-injector, een apolaire Rtx-5 kolom van Restek en een stikstoffsfordetector.

Een cold on column injector is een vrij eenvoudige injector, waarbij het analyt via een wide bore voorkolom rechtstreeks op de analytische kolom wordt geïnjecteerd. Tijdens het injecteren wordt de voorkolom door perslucht gekoeld, waardoor

er in de voorkolom een vloeistoffilm ontstaat, die onder invloed van het draaggas langzaam verdampt. Hierbij worden de hoogkokende componenten als een smalle zone op de punt van de analytische kolom geconcentreerd. Na een vooraf ingestelde tijd stopt de koeling, waarna de geconcentreerde monsterzone onder invloed van het draaggas en het temperatuurprogramma door de analytische kolom migreert, waarbij de scheiding plaats vindt.



Figuur 1. Schematische voorstelling van een cold on column-injector

De cold on column-injectietechniek heeft als voordeel dat ze koud is (de injectietemperatuur is door de perslucht ongeveer 15°C onder het kookpunt van het oplosmiddel) waardoor componenten, die gevoelig zijn voor ontleding, toch geïnjecteerd kunnen worden. Als tweede voordeel geldt, dat het gehele geïnjecteerde monstervolume op de kolom gebracht wordt, waardoor in theorie lagere detectiegrenzen kunnen worden verkregen. In combinatie met een stikstoffsfordetector is dan een vrij gevoelig systeem gecreëerd, dat in eerste instantie bedoeld was voor de bepaling van psychofarmaca in bloedserum.

De praktijk bleek echter (zoals zovaak) weerbarstiger. Met name de zeer polaire metabolieten van de psychofarmaca zijn gevoelig voor adsorptie.

Als de voorkolom bij cold on column injectie niet smetteloos schoon is gaan de metabolieten adsorberen waardoor de pieken gaan tailen en kleiner worden. Het verlies van analyt door adsorptie is relatief het grootst bij lage concentraties waardoor de ijklijnen niet meer door nul gaan en krom gaan lopen. Een nauwkeurige bepaling is dan niet meer mogelijk.

Al is een extract nog zo helder het bevat altijd zeer hoog kokende componenten die op de voorkolom achterblijven en daar vervuilingen veroorzaken. Deze vervuilingen veroorzaken adsorptie en verstoren uiteindelijk ook een goede filmvorming tijdens de injectie. Het koude voordeel van cold on column werkt bij adsorptie als een nadeel, want de monstercomponenten zijn door de lage injectietemperatuur extra moeilijk los te weken van de adsorptieplaatsen.

Uiteindelijk was alleen een redelijk nauwkeurige psychofarmaca bepaling mogelijk, op het moment dat een nieuwe voorkolom was geïnstalleerd. Dat bleek een dure arbeidsintensieve oplossing voor series met soms maar twee of drie patiënten.

Met de alcoholenbepaling ging het eigenlijk niet veel beter. Voor een goede scheiding van de meest voorkomende misbruikte vluchtige oplosmiddelen en hun metabolieten (methanol, ethanol, aceton, acetaldehyde en iso-propanol) is eigenlijk een 60 m lange wide-bore waxkolom gewenst. De spoel van zo'n kolom is zo breed dat er dan eigenlijk geen andere kolom meer in de GC past en dus werd er voor een compromis van 30 m gekozen.

Alcoholen bepalen op zo'n korte kolom gaat als de kolom nieuw en intact is best goed. Een wide-bore

wax kolom is echter erg temperatuur-gevoelig. Bij een normale alcoholbepaling waarbij de analysetemperatuur meestal isotherm en zo rond de 100°C is dat geen probleem. Als de temperatuur in de GC-oven oploopt tot 260°C voor de psychofarmaca bepaling op de Rtx-kolom, wel.

Hoewel 260°C nog ver beneden de toegestane maximum temperatuur van de alcoholenkolom was, bleek al vrij snel dat deze kolom erg te lijden had onder dit temperatuurprogramma. Na elke serie psychofarmaca werden de retentietijden van de alcoholen korter en werd de scheiding minder totdat er uiteindelijk helemaal geen scheiding meer over was.

Inmiddels werd na verloop van tijd de psychofarmacabepaling (na beroerde KKG-uitslagen en slapeloze nachten van collega's) op GC niet meer verantwoord geacht en in eerste instantie als tijdelijke oplossing gretig overgezet naar HPLC. Hierdoor ontstond een adempauze om de cold on column injector te laten vervangen door een split/splitless injector.

Dit bleek echter niet gemakkelijk realiseerbaar, waardoor het idee ontstond om de injectiesystemen voor de alcoholen en de psychofarmaca dan maar om te draaien. Dus: alcoholen cold on column!

In de aanloop van deze verwisseling moest wel een oplossing worden gevonden voor het plasmaprobleem. Plasma (ook al is het verdund) kan niet rechtstreeks on column op een GC kolom worden geïnjecteerd. De eiwitten veroorzaken na een paar injecties al een dusdanige vervuiling, dat verdere analyse niet meer mogelijk is. Nu is onteiwitten met methanol gezien de doelstelling van de bepaling niet handig. Ook de toevoeging van allerlei meer of minder agressieve neerslagreagentia kan het systeem extra vervuilen of beschadigen.

Uiteindelijk is besloten de monsters te onteiwitten met behulp van eiwit-filtertjes. Na enig zoeken is een type gevonden, dat in een standaard microfuge gebruikt kan worden. Het monster en de interne standaard worden gemengd in een filtertje gedaan en na vijf minuten centrifugeren is voldoende heldere filtraat verkregen om te kunnen injecteren.

Voor de scheiding wordt nu de Porabond Q kolom van Chrompack gebruikt, omdat deze beter bestand is tegen de hogere temperaturen die nodig zijn, voor de bepaling van de psychofarmaca. Bovendien is het scheidend vermogen groter.

Het heeft even tijd gekost voordat de juiste instellingen waren gevonden voor de bepaling. De bestaande methoden voor de cold on column-techniek gaan er van uit, dat het oplosmiddel het laagste kookpunt heeft. Voor de bepaling van alcoholen in een waterig filtraat is dit juist andersom. Daarnaast is water ook veel polairder dan de gebruikelijke oplosmiddelen waardoor het gemakkelijk druppels vormt in de apolaire voorkolom tijdens injectie. Een oplossing kan een polair gedeactiveerde voorkolom zijn, maar deze zijn weer minder goed bestand tegen (vloeibaar) water, dat aan de binnenkant van de voorkolom tijdens de injectie wordt verdampt.

Een voorkolom die hier wel tegen kan is de Hydroguard kolom van Restek. Door veel te experimenteren, bleek dat er een goed chromatogram ontstond, als er tijdens de injectie niet werd gekoeld en als de aanvangstemperatuur tussen de 110 en 120°C werd gekozen.

Als de oventemperatuur tijdens injectie te laag wordt gekozen, ontstaan de eerder genoemde druppels in de voorkolom tijdens het injecteren waardoor er onregelmatige pieken ontstaan. Als de temperatuur te hoog wordt gekozen verdampt het oplosmiddel meteen tijdens de injectie en expandeert het

monster deels terug in de injector en de draaggasaanvoer waardoor een deel van de componenten in een volgend chromatogram terug komen.

Uit ervaring is gebleken dat er ook niet te veel mag worden geïnjecteerd. Bij ethyleenglycol experimenten waarbij 2 of 3 µl monster werd geïnjecteerd, bleek de voorkolom al na een injectie of tien, ongeveer bij de eerste winding, spontaan te knappen. De uiteinden van de geknapte voorkolom bleken vervolgens gemakkelijk te verpulveren. Verderop bleef de kolom flexibel.

In een experimentele opzet waarbij vervolgens steeds 1 µl water werd geïnjecteerd, duurde het ongeveer 50 injecties voordat de voorkolom spontaan brak. De analytische en de voorkolom zouden in theorie water moeten kunnen verdragen, maar misschien dat tijdens de injectie het begin van de voorkolom tijdens het expanderen van de monsterfilm een te grote klap krijgt. Hoe meer monster hoe groter de klap hoe sneller het is gebeurd.

Sinds er 0,5 µl monster wordt geïnjecteerd zijn er geen problemen meer. Een injectievolume van 0,5 µl is nog goed te injecteren met een automatische injector en levert voldoende hoge pieken op voor onze eisen aan de detectiegrens, zelfs voor de ethyleenglycolbepaling.

De resultaten zijn uiteindelijk uitstekend. Doordat de alcoholen (aldehyden en ketonen) minder basisch zijn dan de primaire aminogroepen op de metaboliëten van de psychofarmaca, zijn ze veel minder gevoelig voor absorptie waardoor een voorkolom veel vuiler mag zijn en daardoor veel langer mee kan. Daarnaast moeten de monstercomponenten als ze aan een polair oppervlak zouden willen adsorberen een concurrentie aangaan met het waterige oplosmiddel.

Bijkomende voordelen zijn, dat een

nieuw stuk voorkolom goedkoper is dan een liner en dat de injectie-naalden door het koude injecteren minder snel verstopt raken. De resultaten van de nieuwe KKGTC-controles zijn goed. In een test is de ijklijn voor ethanol tussen 0,1 en 10 promille lineair gebleken. Een reden temeer om de huidige bepalingsgrenzen (0,125 en 2,5 promille) van de ijklijn voor de aankomende validatie uit te breiden.

Ethyleenglycol kan ook goed worden bepaald met vrijwel dezelfde methode. Alleen het temperatuurprogramma loopt een minuut langer door. Daar ethyleenglycol veel polairder is dan de eerste genoemde stoffen vereist het een wat schonere voorkolom. De bepaling van GHB (bepaald als gamma-butyrolacton) in urine is ook uitgeprobeerd met deze methode en ook dat gaat vooralsnog goed. Wellicht in een volgend Extract hier meer over.

Aan het opnieuw opstarten van de psychofarmaca bepaling op GC op de klassieke manier (splitless) is nog niet serieus gewerkt, daar de HPLC-bepaling goed blijkt te functioneren.

En dan nu voor het geval dat u een cold on column injector over hebt en niet weet wat u er mee moet het recept voor "alcoholen" op z'n cold on columns.

Reagentia en hulpstoffen

Stamoplossingen voor éénpunts-calibratoren en calibratiecurve-standaarden:

Stamoplossing: verdun 5,00 g ethanol, 2,50 g aceton, 2,50 g acetaldehyde, 2,50 g iso-propanol en 2,50 g methanol samen tot 100,0 ml met water.

Eenpuntscalibratoren (0,5 en 1 g/l):

Verdun 20,0 ml stamoplossing tot 1000 ml met water en vul 2 ml uit in ampullen van 5 ml.

Calibratiecurvestandaarden:

(worden voor de routinebepaling niet gebruikt):

Verdun respectievelijk 100, 200, 400, 600, 800 en 1000 µl stamoplossing tot 20 ml met blanco kalfsserum. De concentraties zijn respectievelijk: 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; en 2,50 g/l ethanol en respectievelijk 125; 250; 500; 750; 1000 en 1250 mg/l aceton, acetaldehyde, iso-propanol en methanol.

Controlemonsters:

De controlemonsters worden ingekocht bij de KKGTC.

Interne standaardoplossing:

250 mg n-propanol per liter water.

Draaggas:

Helium.

Apparatuur en hulpmiddelen

Beschrijving GC-systeem:

GC: CE instruments GC 8000 TOP

Detector: Vlam-ionisatie.

Injector: cold on column

Kolom: Varian CP-PoraBOND Q,
 lengte: 25,0 m
 binnen-Ø: 0,32 mm
 buiten-Ø: 0,45 mm
 fasedikte 5 µm

Voorkolom: Restek Hydroguard
 lengte: ca. 0,5 m
 binnen-Ø: 0,53 mm
 buiten-Ø 0,77 mm

Overige benodigheden:

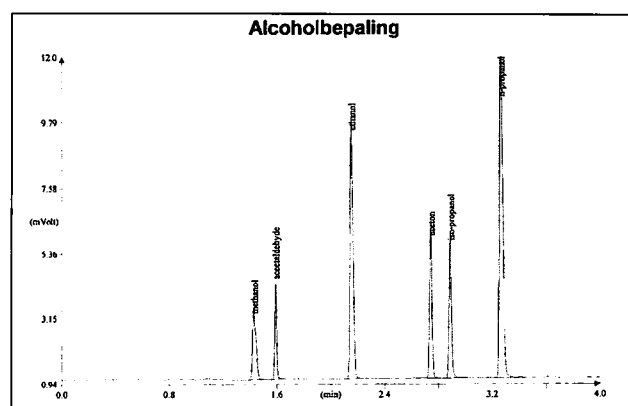
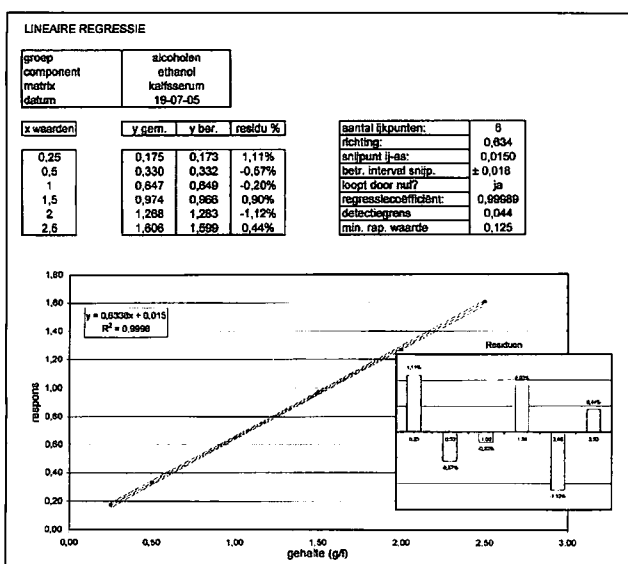
Limited Volume Vials (12 x 32 mm, 8 mm/425 Thread), (Restek 24627)

Flesje, transparant 11 mm OD, 2 ml inhoud met schroefdraad (Interscience 92010205)

Schroefdop 11 mm t.b.v. 2 ml flesje (Interscience 92010207)

Silicone, Teflon septum t.b.v. 11 mm schroefdop (Interscience 92010608)

Nanosep 100K OMEGA Centrifugal Devices (Pall Corporation OD100C35; RVS technologies)



Figuur 3. Lineaire regressie calibratiecurve ethanol.

Figuur 2. Chromatogram ijklijnoplossing #3 respectievelijk: methanol, acetaldehyde, ethanol, aceton, isopropanol en n-propanol (IS).

Werkwijze

Voorzorgsmaatregelen:

Werk zo snel mogelijk om verdamping van vluchtige bestanddelen te beperken.

Monstervoorbewerking:

Standaard (éénpuntscalibrator):

Pipetteer 100 µl standaard in een glazen monsterflesje en voeg 500 µl interne standaardoplossing toe en sluit onmiddellijk af met een schroefdopje met septum. Meng en injecteer 0,5 µl op de GC. De concentratie van de standaard is: 1 g/l ethanol en 500 mg/l acetaldehyde, aceton, methanol en isopropanol.

Controle- en patiëntenmonsters:

Pipetteer 100 µl monster en 500 µl interne standaardoplossing in een microfugecupje. Meng en breng de inhoud over in het binnenste buisje van een Nanosep 100 K filter.

Centrifugeer 5 min bij 10800 toeren in een microfuge en breng het filtraat over in een plastic monsterflesje met ingebouwde insert en sluit onmiddellijk af met een schroefdopje met septum. Injecteer 0,5 µl op de GC.

Instellingen apparatuur:

injectievolume:

0,5 µl

secondary cool time:

0 s

detectietemperatuur:

300°C

ovenprogramma:

T0 = 110°C (0 min) 25°C/min T1 =

180°C (1,5 min)

draaggas:

helium 2ml/min

Opmerkingen

De éénpuntscalibratoren worden gemaakt in water omdat ze op deze manier goed overeenkomen met de gefiltreerde plasma/serummonsters, zonder dat er gebruik gemaakt hoeft te worden van dure microfilters.

De minimale rapporteringswaarde is per definitie de helft van de laagste calibratiecurvestandaard. De detectiegrens wordt berekend uit de ijklijn en is gelijk aan de concentratie die hoort bij de y-asafsnede + 2 x de t waarde (one tailed) van de ijklijn ($p = 0,05$) vermenigvuldigd met de standaarddeviatie van de y-asafsnede.

Bijlagen

1. Chromatogram calibratiecurve-standaard #3 ethanol 1g/l; = 1,0 g/l methanol; acetaldehyde; aceton; iso-propanol 500 mg/l.
2. Calibratiecurve in kalfsserum.