



Bloedalcoholen bepaling met GC-FID op een apolaire kolom

E Olijslager en R Langen

Klinisch Farmaceutisch Laboratorium

TweeSteden ziekenhuis

Dr. Deelenlaan 5, 5042 AD Tilburg.

EOlyslager@zamb.tsz.nl

Inleiding

Met veel belangstelling hebben wij de publicatie van Van der Lijke in Extract gelezen [1]. Ook wij hadden een probleem met het opzetten van de alcohol/ethyleenglycol bepaling op GC. Er stond destijds een GC met vlammionisatiedetector (FID) klaar voor de bepaling van bloedalcoholen ten behoeve van toxicologie. Daarnaast beschikte het laboratorium over een GCMS. De GC met FID moest vervangen worden door een tweede GCMS. Met deze GCMS wilden we naast MS analyses echter ook de bloedalcoholen bepalen. Er werd besloten om naast een MS detector een FID te laten installeren in dit apparaat, zodat met behulp van een tweede kolom gekoppeld aan de FID, de bloedalcoholen bepaald konden worden.

Alcoholen worden eigenlijk bijna altijd op polaire GC kolommen bepaald. In combinatie met MS analyses doet zich echter het volgende probleem voor. Polaire kolommen zijn gevoelig voor hoge temperaturen terwijl de meeste GCMS analyses een temperatuurprogramma hebben dat doorloopt tot 300 °C of meer. Dit zou betekenen dat de alcoholen kolom niet in de GC kan blijven op het moment dat er een GCMS analyse draait. Dit betekent weer dat de analist voor een alcoholenscreening tijdens een dienst eerst een kolom in de GC moet installeren (voor de bepaling van ethanol wordt gebruik gemaakt van een immunologische methode). Dit werd door de meeste analisten als onwenselijk gezien.

Als een alcoholen kolom in de GC moet blijven hangen kan dat alleen een kolom zijn die tegen 300 plus graden kan, met andere woorden: een apolaire kolom. Alcoholen zijn best direct op een apolaire kolom te bepalen zolang deze alcoholen maar één OH groep bevatten. Ethyleenglycol met z'n twee OH groepen is een veel groter probleem. Injectie van ethyleenglycol op een apolaire kolom geeft enorm veel tailing. Lage concentraties gaan zelfs helemaal op in de basislijn. Een ijklijn laat, hoewel deze best recht is, derhalve een zeer grote negatieve asafsnede zien. Lage concentraties zijn zo niet te bepalen.

Edinboro [2] beschreef in 1993 een monstervoorbewerking waarbij ethyleenglycol wordt geëxtraheerd/geconcentreerd met behulp van een organisch oplosmiddel. Het extract wordt vervolgens na gedeeltelijk te zijn ingedampt direct geïnjecteerd op een polaire kolom. Zou een met deze methode opgewerkt serummonster niet ook op een apolaire kolom kunnen worden bepaald? Er wordt immers geconcentreerd en van het organische oplosmiddel wordt een positieve bijdrage aan de piekvorm verwacht. Na enkele injecties bleek dit te werken, zelfs boven verwachting. De piekvorm blijft bij alle concentraties gewoon goed. Zelfs een concentratie van minder dan 10 mg/L (0,01 promille) heeft een goede piekvorm.

Dit alles heeft geleid tot een dubbele methode die hierna wordt beschreven. Er is een methode voor enkelvoudige alcoholen op een lange apolaire kolom en een methode ethyleenglycol met een andere voorbewerking, maar op dezelfde kolom. Met deze laatste methode is ook trichloor-ethanol te bepalen.

Chemicaliën en apparatuur

Methanol, ethanol, aceton, isopropanol en 1 propanol worden geleverd door Baker. Ethyleenglycol en trichloor-ethanol door VWR en propyleenglycol door Spruyt-Hillen.

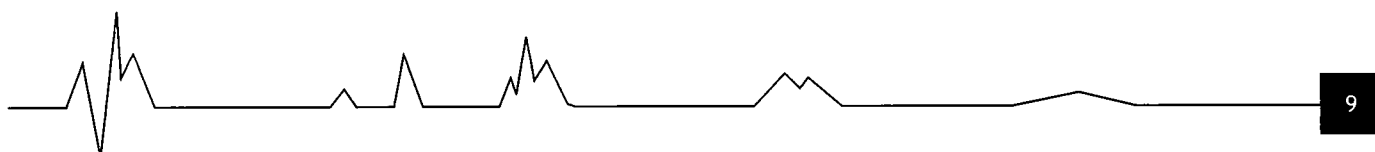
Gaschromatograaf	: Agilent 6890
Autosampler	: Agilent 7683
Detector	: FID
kolom	: Machery-Nagel
Kolom type	: OPTIMA 1, 60 m, 0,32 mm i.d., 1,0 µm film (100% dimethyl- polysiloxaan)

Standaarden enkelvoudige alcoholen

Interne standaard:
75 µL 1-propanol in 500 mL demiwater.

Stockoplossingen methanol, ethanol, aceton en 2-propanol worden bereid door 2,5 mL (ethanol 5,0 mL) te pipetteren in een maatkolf van 25 mL en aan te vullen met demiwater.

Standaarden worden bereid door uit de stockoplossing respectievelijk 0,8, 2,0 en 5,0 mL te pipetteren in maatkolven van 200 mL en aan te vullen met demiwater.



Deze 3 standaarden worden uitgevuld in ampullen. De concentraties zijn (tussen haakjes ethanol) 0,3 (0,6), 0,8 (1,6) en 2,0 (4,0) promille.

Monstervoorbereiding enkelvoudige alcoholen

Pipetteer 50 μL standaard of monster in een regeerbuis.
Voeg 1,0 mL interne standaard toe en meng. Pipetteer 1 μL van dit mengsel.

GC instellingen enkelvoudige alcoholen

Draaggas	: helium
Flow	: 6,0 mL/min constant flow (59 cm/sec)
Injectievolume	: 1 μL split
Splitverhouding	: 1:40
Analysetijd	: 3,2 min
Temp. programma	: 60 °C isotherm
Injector temperatuur	: 200 °C
Detector temperatuur	: 250 °C

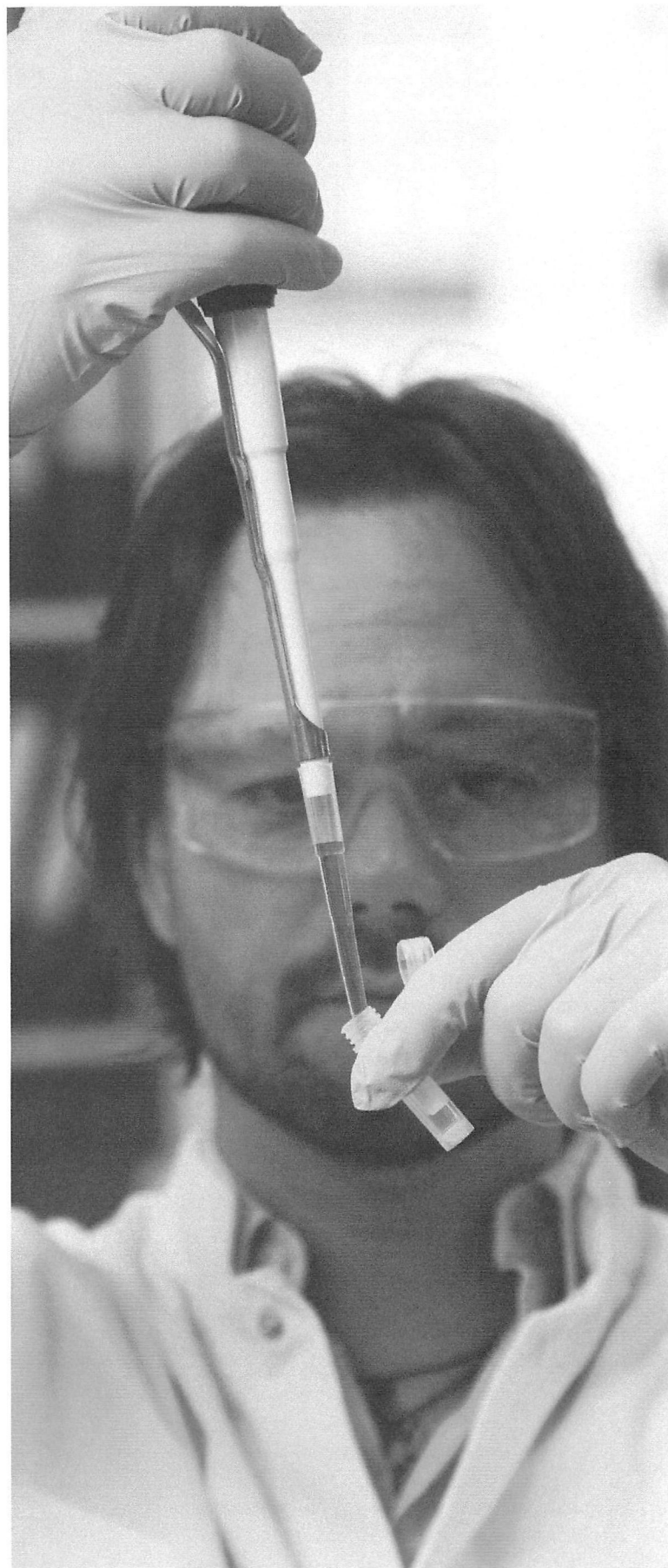
In figuur 1 is een chromatogram van een standaard weergegeven. Figuur 2 geeft een chromatogram weer met daarin een mengsel van verschillende alcoholen en organische oplosmiddelen. De analysetijd is in dit chromatogram verlengd tot 7 minuten.

Standaarden ethyleenglycol en trichloorethanol

Interne standaard:
Pipetteer 300 μL propyleenglycol in een maatkolf van 100 mL en vul aan met demiwater.

Stockoplossingen ethyleenglycol en trichloorethanol worden bereid door 1500 mg ethyleenglycol en 500 mg trichloorethanol af te wegen in een maatkolf van 100 mL en aan te vullen met demiwater. Dit geeft concentraties van 15000 mg/L ethyleenglycol en 5000 mg/L trichloorethanol. Deze stockoplossing wordt uitgevuld in ampullen.

Standaarden worden bereid door uit de stockoplossing 50, 200 en 500 μL te pipetteren in maatkolven van 10 mL en aan te vullen met blanco plasma. De concentraties zijn dan voor ethyleenglycol/ trichloorethanol 75/25, 300/100 en 750/250 mg/L



Monstervoorbewerking ethyleenglycol en trichloorethanol

Pipetteer 200 µL monster of standaard in een reageerbuis en voeg 50 µL interne standaard toe. Voeg 1 mL extractievloeistof (diethylether:2-propanol = 1:1 v/v) toe en schud 20 seconden op de vortex. Vervolgens wordt circa 1 gram watervrij natriumsulfaat toegevoegd tijdens het vortexen. Na 3 minuten centrifugeren wordt de bovenste laag overgeschonken in een tweede buis en ingedampt tot 50 à 100 µL. De oplossing mag niet droogdampen omdat anders ethyleenglycol mee verdampt. Injecteer 1 µL.

GC instellingen ethyleenglycol en trichloorethanol

Draaggas : helium
 Flow : 6,0 mL/min constant flow (59 cm/sec)
 Injectievolume : 1 µL split
 Splitverhouding : 1:10
 Analysetijd : 4,5 minuten
 Temp. programma : 100 °C (0 minuten), dan met 10°C/min naar 140°C en dit 0,5 minuten.
 Injector temperatuur : 225 °C
 Detector temperatuur : 300 °C

Tabel 1: Validatieparameters

Concentratie (mg/L)	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %	Extractieopbrengst % (VC %)
Methanol 198	106	1,4	10,5	99 (1,6)
791	106	1,3	2,4	103 (2,3)
2374	99	1,1	3,0	99 (1,6)
Ethanol 395	100	0,6	1,5	106 (1,5)
1579	101	0,7	2,3	103 (1,2)
4736	101	0,6	3,3	101 (0,9)
Aceton 198	98	0,9	2,1	102 (2,1)
790	101	0,6	1,3	101 (0,8)
2370	98	0,7	4,3	100 (1,3)
Isopropanol 196	101	0,6	2,8	101 (1,3)
786	101	0,5	3,1	101 (1,0)
2357	99	0,6	3,1	100 (0,9)
Ethyleenglycol 75	98	2,4	3,7	59 (7,6)
300	94	2,6	2,0	61 (9,5)
900	98	1,0	6,4	65 (8,5)
Trichloorethanol 25	106	3,2	11,6	58 (4,1)
100	105	3,9	12,5	65 (3,7)
300	87	4,9	13,2	66 (12,0)
IS propyleenglycol				89 (5,9)
Voor alle bepalingen n=6				
		Detectiegrens mg/L (‰)	Bepalingsgrenzen mg/l (‰)	
Methanol		20 (0,02)	60 – 4000 (0,06-4,0)	
Ethanol		20 (0,02)	60 – 8000 (0,06-8,0)	
Aceton		10 (0,01)	50 – 4000 (0,05-4,0)	
Isopropanol		20 (0,02)	50 – 4000 (0,05-4,0)	
Ethyleenglycol		3 (0,003)	10 – 1500 (0,01-1,5)	
Trichloorethanol		3 (0,003)	8 – 500 (0,008-0,5)	

Validatie

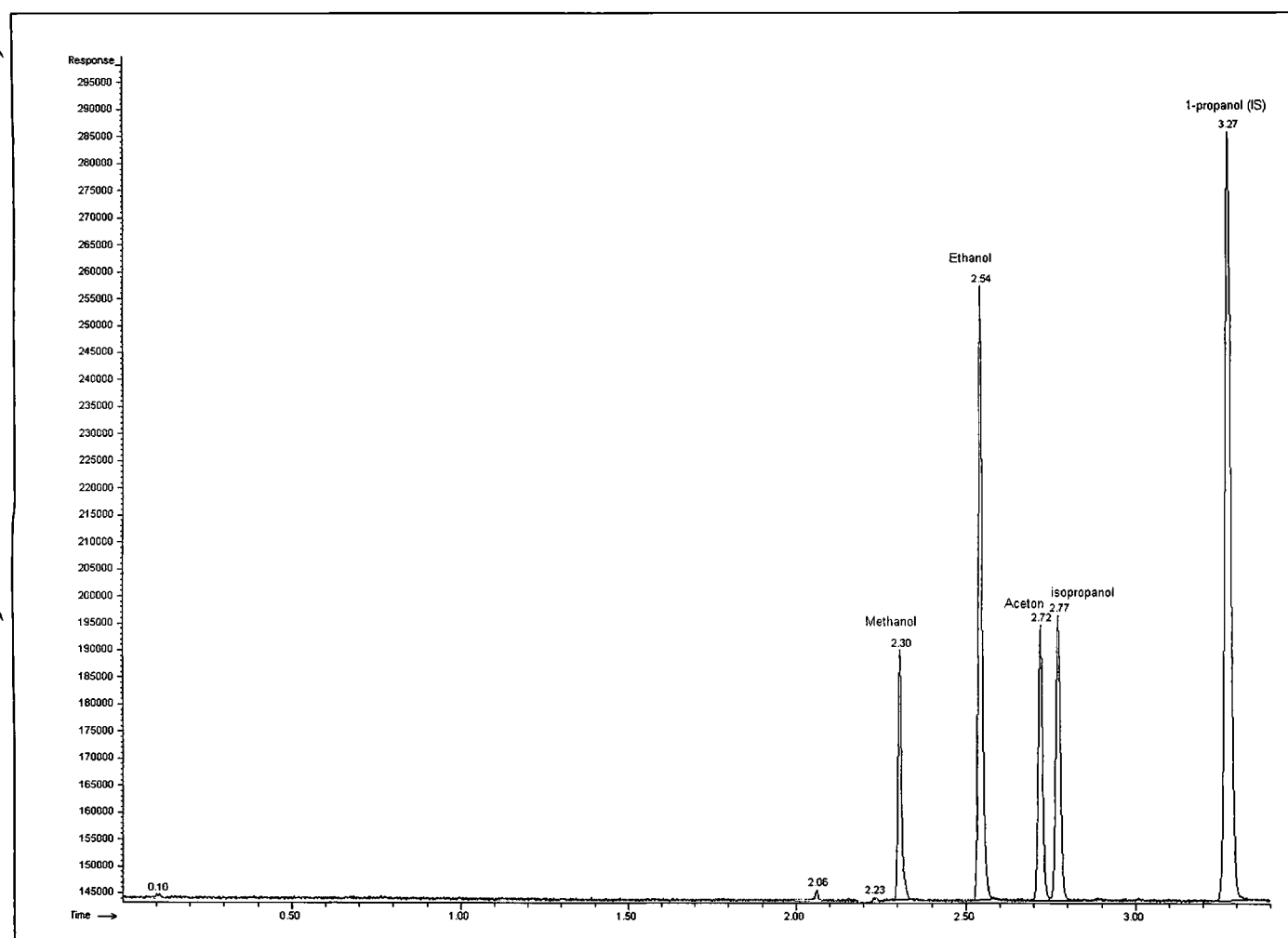
Beide methodes zijn gevalideerd volgens de in het laboratorium van toepassing zijnde procedure. De validatieparameters zijn gegeven in tabel I.

Discussie

De problematiek waar we mee zaten dwong ons er toe 2 methoden op te zetten. Aangezien wij (en met ons waarschijnlijk veel andere laboratoria) geen headspace injector hebben, injecteren we de waterige oplossing met de enkelvoudige alcoholen direct in de GC. We beseffen dat de headspace techniek voor dit soort componenten de voorkeurtechniek is.

redelijke tijd beide analyses uit te voeren. Bij de validatie van ethyleenglycol is ook trichloorethanol meegenomen. Propyleenglycol is niet de beste interne standaard voor de bepaling van trichloorethanol. Daarom is tijdens de validatie ook benzylalcohol meegenomen als interne standaard voor trichloorethanol. De juistheid en reproduceerbaarheid waren beter dan bij propyleenglycol als interne standaard. De piek van benzylalcohol komt echter circa 1,5 minuut later dan trichloorethanol. In de afweging tussen optimalisatie van validatieparameters en snelheid van analyse, is gekozen voor de tijdswinst die bereikt wordt door alleen propyleenglycol als interne standaard te kiezen.

Figuur 1: Chromatogram standaard enkelvoudige alcoholen in water. 0,8 promille methanol, aceton en isopropanol en 1,6 promille ethanol

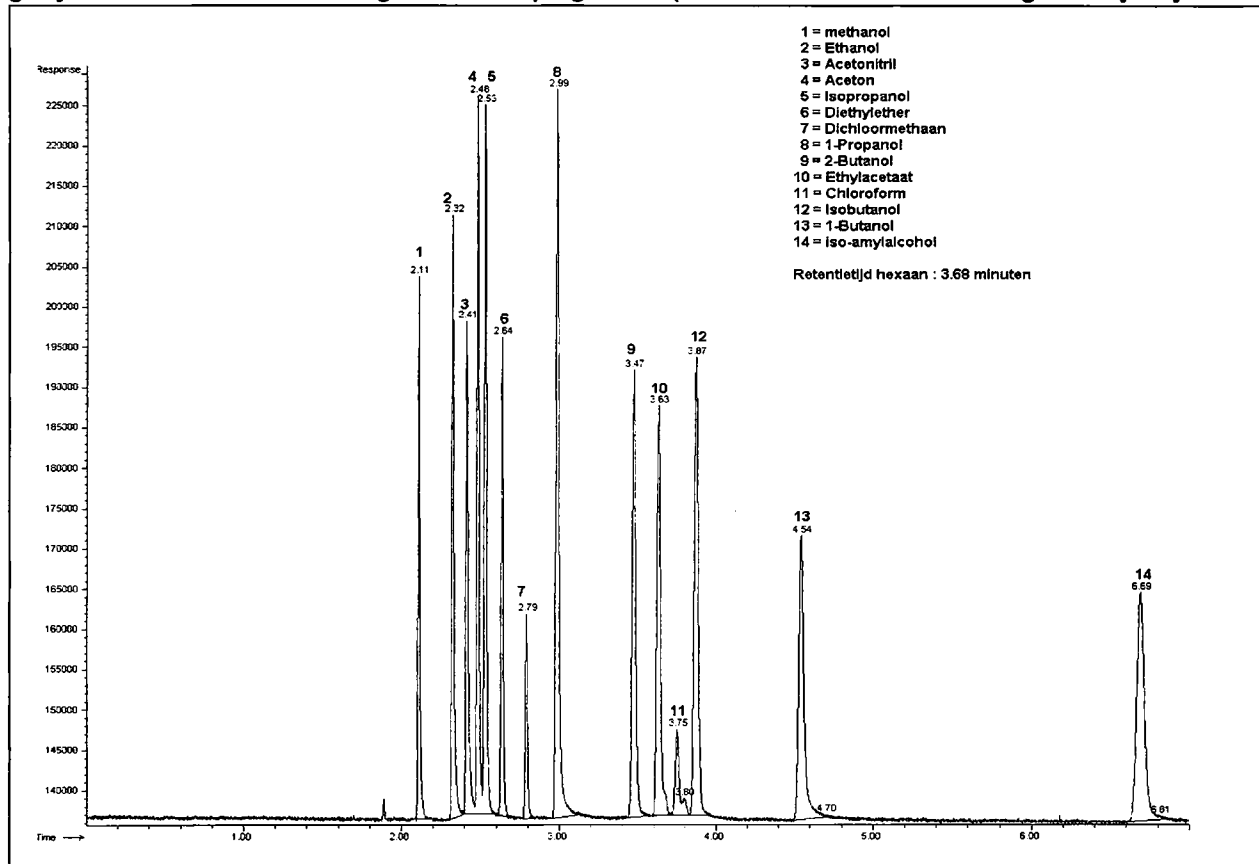


Het kan voorkomen dat zowel methanol als ethyleenglycol bepaald moeten worden. Dan wordt er met de beschreven methoden tijd verloren ten opzichte van methoden waarbij alles in één run geanalyseerd wordt. Omdat de methode voor de enkelvoudige alcoholen korte analysetijden heeft (isotherm dus geen afkoeltijd) en in de tussentijd ethyleenglycol opgewerkt kan worden, is het toch mogelijk binnen

Conclusie

Het blijkt heel goed mogelijk enkelvoudige alcoholen en ethyleenglycol zonder derivatiseren te bepalen op een apolaire GC kolom. Met de beschreven methoden zijn alle componenten geheel gescheiden en in voldoende lage concentraties te bepalen.

Figuur 2: Chromatogram mengsel van verschillende alcoholen en andere organische vloeistoffen in water, geïnjecteerd met het eenvoudige alcoholen programma (isotherm 60 °C met een verlengde analysetijd).



Figuur 3: Chromatogram standaard ethyleenglycol 75 mg/L (0,057 promille) en 25 mg/L (0,025 promille) trichloorethanol in serum.

