



Bloedalcoholenbepaling met GC-FID en de medium polaire DB-624 kolom

Hai Holthuysen, Hay Janssen, Josje Hermkens-Laemers

Laboratorium apotheek
Viecuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg
Tegelseweg 210
5912 BL Venlo
hholthuysen@viecuri.nl

Inleiding

Tot voor kort bepaalden wij de bloedalcoholen methanol, ethanol, 2-propanol, aceton en ethyleenglycol met behulp van een apolaire kolom. Omdat de bloedalcoholen meestal met een polaire GC-kolom worden bepaald, keken wij dan ook op van het artikel van Rick Langen en Eric Olyslager van het TweeSteden Ziekenhuis in Tilburg [1]. Zij beschreven een methode voor de bepaling van methanol, ethanol, aceton en 2-propanol op een apolaire kolom. Hoewel er gebruik werd gemaakt van een kolom van verschillende interne diameter en lengte bleek de stationaire fase wel identiek met die gebruikt in Venlo, namelijk 100% dimethylpolysiloxaan. Naast de genoemde alcoholen werd ethyleenglycol op dezelfde kolom bepaald met behulp van een derivatisering.

Naar aanleiding van dit artikel heb ik onze eigen GLC-bepaling voor genoemde stoffen nog eens kritisch tegen het licht gehouden. Enkele knelpunten:

1. Op de eerste plaats was het voor ons onmogelijk om de componenten met de auto-injector te injecteren. Met ons GC-systeem is het mogelijk minimaal 0,5 µl te injecteren. Deze hoeveelheid gaf echter aanleiding tot overbelading van de kolom met als resultaat een ontoelaatbare tailing van de componenten en dan met name methanol. Een injectiehoeveelheid van 0,2 µl leverde de beste resultaten op, met dien verstande dat er wel handmatig moest worden geïnjecteerd.
2. De methanol bleek toch vaak problematisch om te bepalen, zeker als het lage concentraties betrof. Bij concentraties lager dan ca. 200 mg/l bleek tailing een dermate storende factor dat een exacte kwantificering eigenlijk niet meer mogelijk was. Dit trad meer op de voorgrond bij de bepaling van methanol in plasma dan in volbloed.

3. Ethyleenglycol liet hetzelfde profiel zien als de methanol, veel tailing met name in het lage gebied, waardoor een detectiegrens moest worden aangehouden van 200 mg/l. Aan de hoge kant dus.

In het artikel van Tilburg werd voor ethyleenglycol hetzelfde probleem gezien, dit werd opgelost door de ethyleenglycol te derivatiseren. Dit was voor ons echter geen optie.

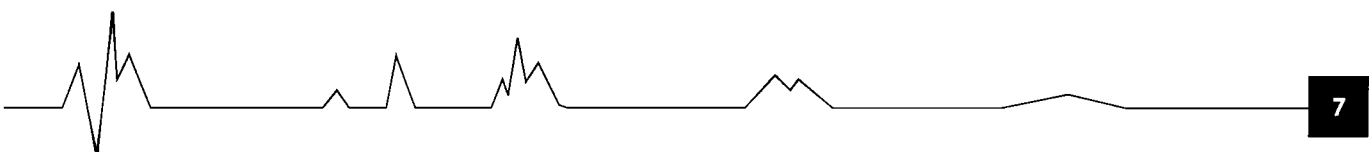
Om de geschetste problemen te ondervangen moesten we dus op zoek naar een andere kolom. Zoals al eerder gesteld worden de meeste vluchtige verbindingen bepaald op kolommen met hoge polariteit. Deze kolommen zijn echter erg gevoelig voor hoge temperaturen en hebben vaak een maximale temperatuur bereik van rondom de 240 °C. Dit is voor de meeste GC analyses in ons laboratorium te laag. Gezocht werd naar een kolom die bovenstaande problemen kon oplossen en tevens een temperatuur bereik van minimaal 260 °C had. De DB-624 kolom van Agilent bleek voor ons laboratorium een schot in de roos te zijn.

Oude methode voor methanol, ethanol, aceton en 2-propanol

Gaschromatograaf	:	HP 6890 Gaschromatograaf
Detector	:	FID
Kolom	:	HP-1, 30 m x 0,53 mm i.d., Df = 2,65 µm
Draaggas	:	helium
Flow	:	3,2 ml/min. constant flow
Injectievolume	:	0,2 µl handmatig
Split	:	4:1
Ovenprogramma	:	40 °C → 5 °C/min. → 60 °C → 50 °C/min. → 160 °C → hold 2 min.
Injectietemperatuur	:	250 °C
Detectietemperatuur	:	250 °C

Standaarden:

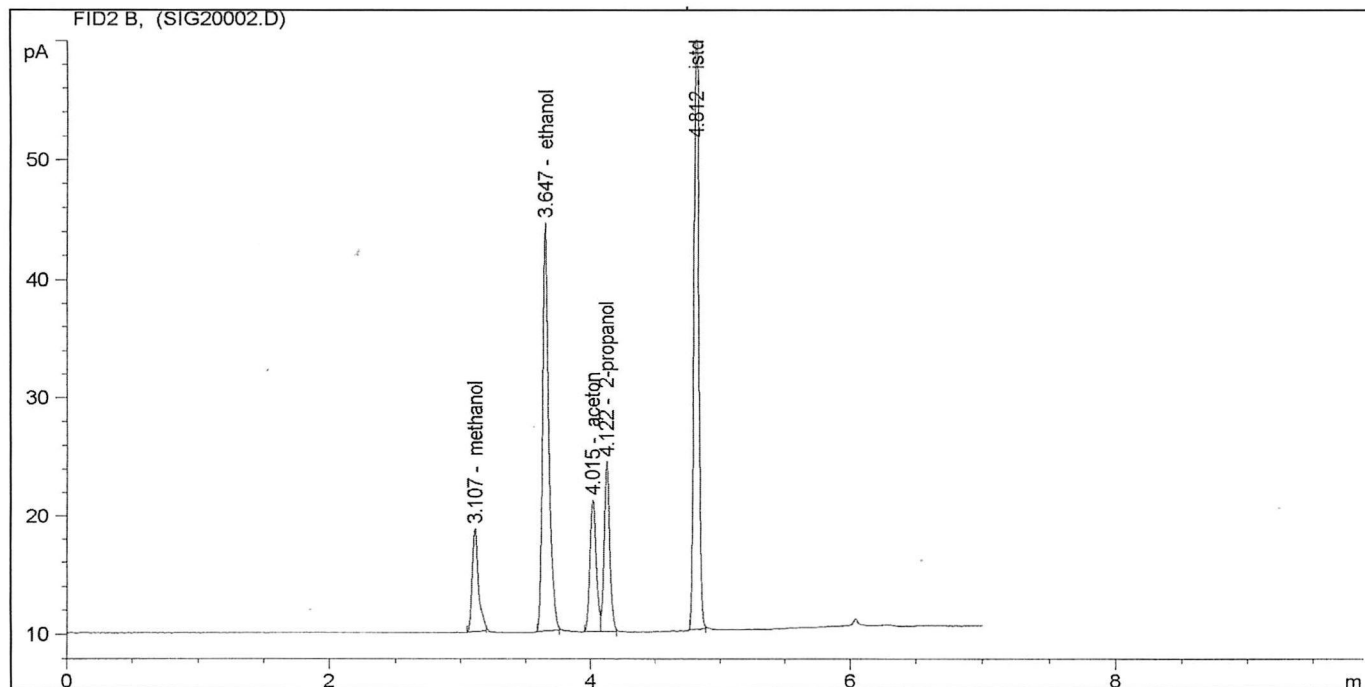
0,1 ml standaard methanol (1000 mg/l), ethanol (3000 mg/l), aceton (1000 mg/l) en 2-propanol (1000 mg/l) + 0,9 ml propanol (250 mg/l) = interne standaard.



Monster:

0,1 ml volbloed of plasma + 0,9 ml propanol (250 mg/l) = interne standaard.

Chromatogram van standaard



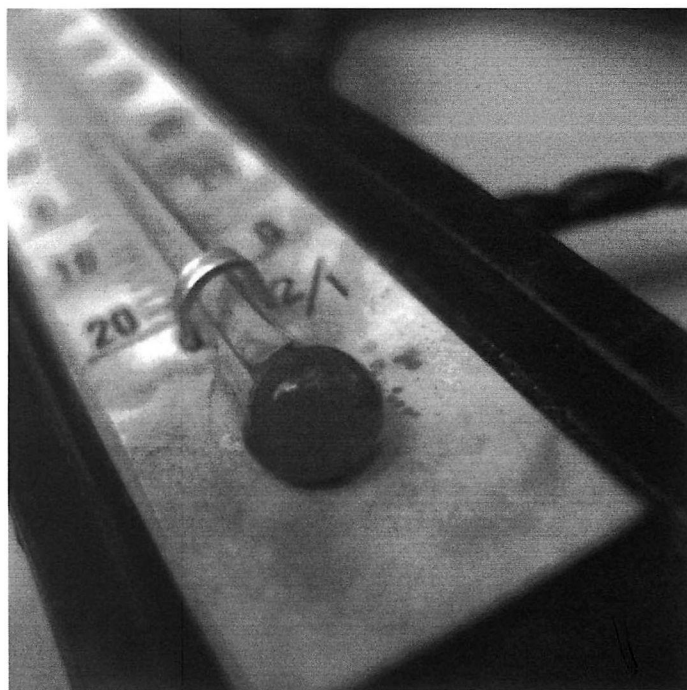
In het chromatogram is duidelijk te zien dat de methanol neiging tot tailen vertoont. Dit wordt pas echt merkbaar bij lage concentraties wanneer gebruik wordt gemaakt van volbloed of plasma.

Nieuwe methode voor methanol, ethanol, aceton en 2-propanol

Gaschromatograaf	: HP 6890 Gaschromatograaf
Detector	: FID
Kolom	: DB-624, 60 m x 0,32 mm i.d., Df = 1,8 µm
Draaggas	: helium
Flow	: 2,9 ml/min. constant flow
Injectievolume	: 0,5 µl auto-injector
Split	: 10:1
Ovenprogramma	: 40 °C → 5 °C/min. → 60 °C → 50 °C/min. → 160 °C hold 5 min.
Injectietemperatuur	: 250 °C
Detectietemperatuur	: 320 °C

Standaarden:

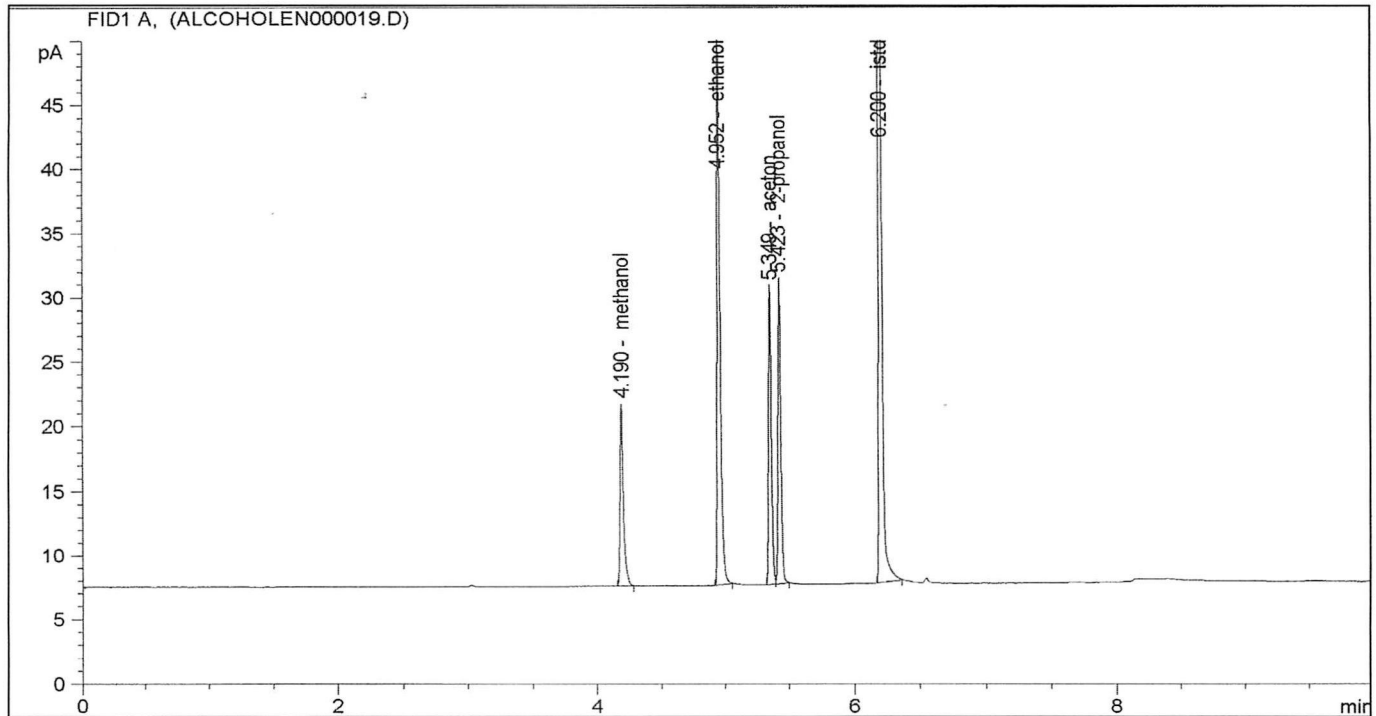
0,1 ml standaard methanol (1000 mg/l), ethanol (3000 mg/l), aceton (1000 mg/l) en 2-propanol (1000 mg/l) + 0,9 ml propanol (250 mg/l) = interne standaard.



Monster:

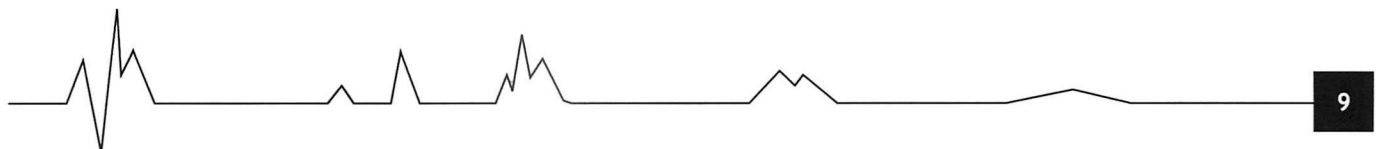
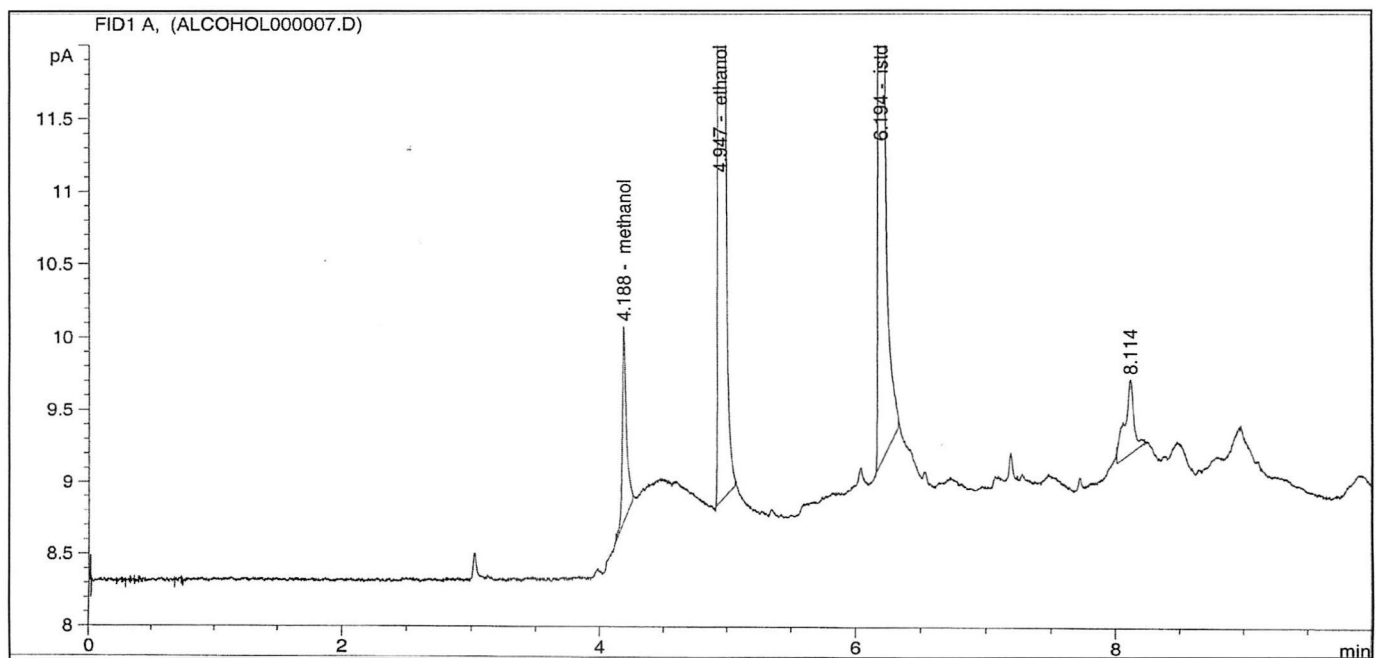
0,1 ml volbloed + 0,9 ml propanol (250 mg/l) = interne standaard.

Chromatogram van standaard



De methanolpiek is significant verbeterd ten opzichte van die uit de oude methode en vertoont nauwelijks tailing. In de praktijk is gebleken dat concentraties in volbloed en plasma (de voorkeur gaat uit naar volbloed) tot een limiet van 25 mg/l bepaald kunnen worden. Daarnaast is gebruik gemaakt van de autoinjector, wat zowel het bedieningsgemak als de piekvorm ten goede komen.

Chromatogram van patiënt met methanol concentratie 54 mg/l



Oude methode voor ethyleenglycol

Gaschromatograaf	:	HP 6890 Gaschromatograaf
Detector	:	FID
Kolom	:	HP-1, 30 m x 0,53 mm i.d., Df = 2,65 µm
Draaggas	:	helium
Flow	:	7,9 ml/min. constant flow
Injectievolume	:	2 µl auto-injector
Split	:	splitless
Ovenprogramma	:	90 °C → hold 1 min. → 45 °C/min. → 190 °C → 90 °C/min. → 250 °C → hold 1 minuut
Injectietemperatuur	:	250 °C
Detectietemperatuur	:	275 °C

Standaarden:

0,2 ml standaard (200, 500, 1000 mg/l) + 0,7 ml water + 0,1 ml 1,2-propaandiol (2500 mg/l) = interne standaard.

Monster:

0,2 ml volbloed of plasma + 0,7 ml water + 0,1 ml 1,2-propaandiol (2500 mg/l) = interne standaard.

Nieuwe methode voor ethyleenglycol

Gaschromatograaf	:	HP 6890 Gaschromatograaf
Detector	:	FID
Kolom	:	DB-624, 60 m x 0,32 mm i.d., Df = 1,80 µm
Draaggas	:	helium
Flow	:	2,9 ml/min. constant flow
Injectievolume	:	2 µl auto-injector
Split	:	4:1
Ovenprogramma	:	90 °C → hold 1 min. → 45 °C/min. → 190 °C → 90 °C/min. → 250 °C → hold 1 minuut
Injectietemperatuur	:	250 °C
Detectietemperatuur	:	275 °C

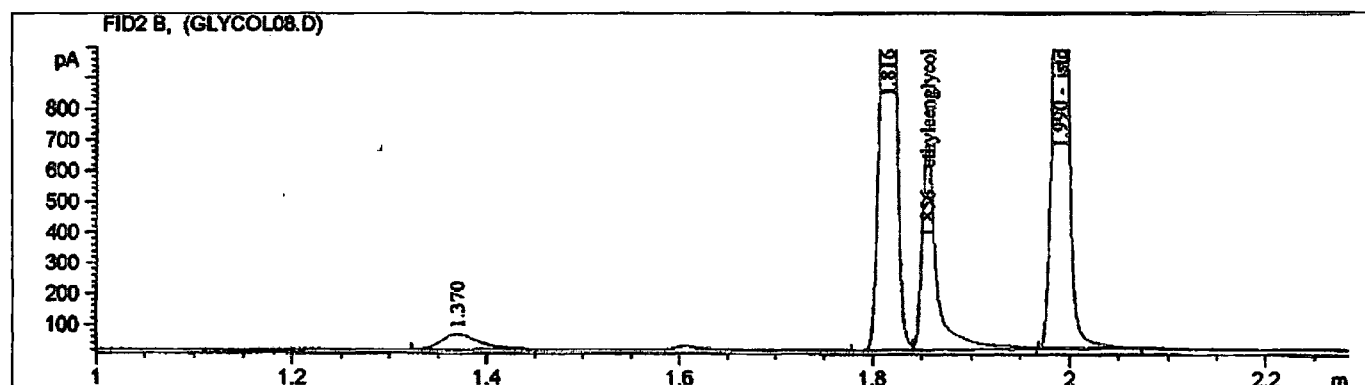
Standaarden:

0,2 ml standaard (200, 500, 1000 mg/l) + 0,7 ml water + 0,1 ml 1,2-propaandiol (2500 mg/l) = interne standaard.

Monster:

0,2 ml volbloed of plasma + 0,7 ml water + 0,1 ml 1,2-propaandiol = (2500 mg/l) interne standaard.

Chromatogram van ethyleenglycol 800 mg/l

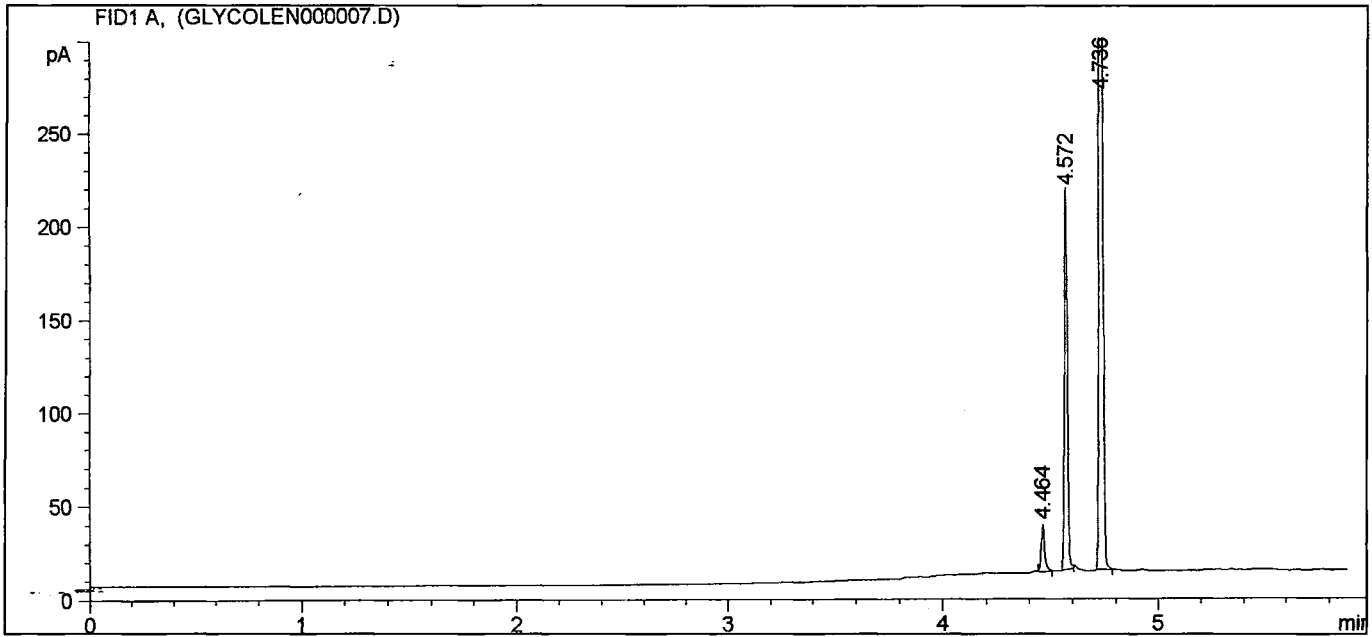


Duidelijk is de sterke tailing van ethyleenglycol te zien. Dit wordt pas echt merkbaar bij lage concentraties wanneer gebruik wordt gemaakt van volbloed of plasma.

Literatuur

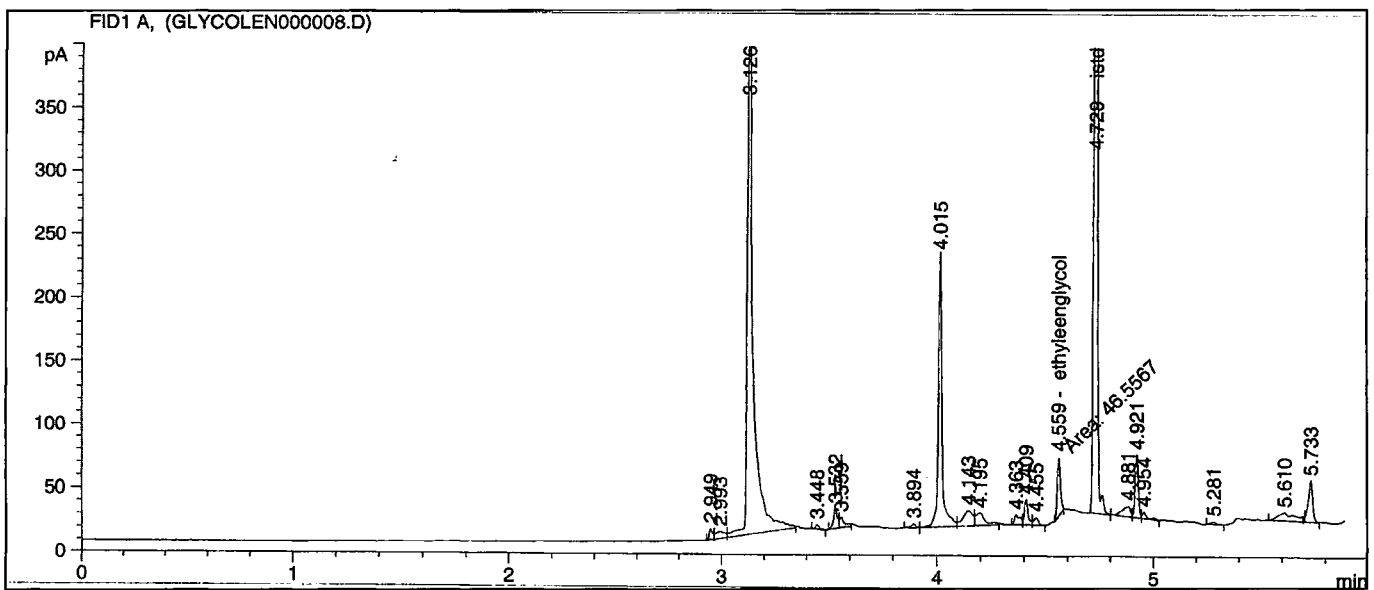
1. Bloedalcoholenbepaling met GC-FID op een apolaire kolom. E. Olyslager; R. Langen. Extract nummer 3, juli 2007, jaargang 18.

Chromatogram van ethyleenglycol 500 mg/l



De ethyleenglycol (4,57 min.) piek is significant verbeterd ten opzichte van die uit de oude methode en vertoont nauwelijks tailing. In de praktijk is gebleken dat concentraties in volbloed en plasma (volbloed heeft de voorkeur) tot een limiet van 40 mg/l bepaald kunnen worden.

Chromatogram van patiënt met ethyleenglycol concentratie 116 mg/l



Conclusie

De DB-624 is een kolom van medium polariteit die uitstekend aan onze eisen voldoet. De vluchtige verbindingen methanol, ethanol, aceton, 2-propanol en ethyleenglycol zijn alle met voldoende gevoeligheid te bepalen. De pieksymmetrieën van alle componenten zijn significant verbeterd ten op zichte van die van de oude bepalingen. Inmiddels zijn de methoden voor deze componenten gevalideerd. De kolom heeft een maximaal

temperatuurbereik van 260 °C. Dit is weliswaar veel lager dan een reguliere apolaire kolom, het vormt voor ons echter geen probleem. De methoden die worden gedraaid op onze apolaire HP-1-kolom kennen alle, met twee uitzonderingen, een temperatuurprogramma dat oploopt tot maximaal 250 °C. Voor de twee uitzonderingen werd de methode aangepast, dit resulteerde alleen in een verlenging van de retentietijd van de gebruikte interne standaard. Omdat deze methoden nog niet zijn gevalideerd vormde dit geen probleem.