

Begleitalkoholanalyse: Erfahrungen mit der Adsorbensfalle in der Headspace-Gaschromatographie

R. Köhling, H.-D. Wehner

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelsestr. 5, D-72074 Tübingen.

Zusammenfassung

Die Analyse von Begleitalkoholen stellt in der forensischen Toxikologie inzwischen ein Routinewerkzeug dar, mit dem hauptsächlich Trinkangaben, also Art, Menge und Zeitpunkt des Konsums alkoholischer Getränke, überprüft werden können. Standard hierfür stellt die Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) dar. Neben einer Kryofokussierung bietet seit kurzem auch die Adsorption der Analyten an Festkörperoberflächen („Adsorbensfalle“ oder „Trap“) die Möglichkeit einer signifikanten Steigerung der Empfindlichkeit ohne drastische Veränderung der Probenzusammensetzung durch Salze. Das Adsorbens kann außerdem an die Bedürfnisse der Analytik angepasst und optimiert werden.

Einleitung

Durch die umfangreichen Arbeiten von Bonte *et al* [1] wurde es möglich, die Art und Menge bestimmter alkoholischer Getränke im Blut des Konsumenten nachzuweisen. Die Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) stellte sich dabei als optimale Methode für die Routineanalytik von Blutproben heraus. Auf Grund der sehr geringen Konzentrationen der Begleitalkohole werden den Proben Salze zugesetzt, um die geforderten Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen zu erreichen [2,3]. Die Zugabe von Salzen lässt sich jedoch durch andere Anreicherungstechniken umgehen. Im Falle der kryogenen Anreicherung werden die interessierenden Analyten aber auch das Lösungsmittel Wasser in einer Art „Kühlfalle“ („Cold Trap“) vor der Injektion gesammelt. In analoger Weise lassen sich auch Adsorbentien, wie z.B. Aktivkohle, verwenden, mit deren Hilfe die Analyten aus der Gasphase gefiltert werden. Thermisch werden diese wieder reversibel von der Oberfläche entfernt und anschließend chromatographisch analysiert. Dieses Verfahren stammt ursprünglich aus der Spurenanalytik von flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) [4,5] und wird z.B. für den forensischen Nachweis von Brandbeschleunigern verwendet [6].

Kommerziell bietet Perkin-Elmer einen Probengeber mit „Trap“-Funktion an, der nach dem o.g. Prinzip der Adsorption funktioniert. Es handelt sich um einen umgebauten HS 110 Headspace-Probengeber, der über eine beheizbare Anschlussmöglichkeit für eine mit Adsorbens gefüllte Quarzglaszylinder verfügt. Zusätzliche Gaskreisläufe sorgen dafür, dass aus dem Gasraum des Probenbehälters die Analyten auf das Adsorbens transportiert werden, dort mit Trägergas vom Lösungsmittel Wasser befreit werden („Purge Dry“) und durch Einschalten der Heizung bzw. Umschalten des Trägergasstromes in Richtung Trennsäule gebracht werden [7,8].

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun gezeigt werden, welche Vorteile die „Trap“-Funktion im Vergleich zur statischen HS-GC bringt. Die Empfindlichkeit der Kalibrierung stellt dabei ein wichtiges Maß für die Präzision und Richtigkeit der analysierten Begleitalkohole dar. Bei der praktischen Anwendung zeigt sich allerdings auch, wie komplex die Geräteparameter (Fließgeschwindigkeiten, Split-Einstellungen, Säulendimensionen, etc.) voneinander abhängen und welchen Einfluss Salzzusätze und Matrix auf die Empfindlichkeit haben. In der Regel gilt es jedoch, die niedrige Begleitalkoholkonzentrationen neben einer großen Ethanolkonzentration gesichert nachzuweisen.

Material und Methoden

Material

Es werden nur wässrige Kalibrierstandards verwendet, um eine Vergleichbarkeit zwischen der „Trap“-Methode und der HS-GC ohne „Trap“ zu gewährleisten. Zusammen mit einer Blindprobe werden 5 Kalibrierstandards untersucht. Die Analysen werden mit einem Perkin-Elmer HS 110 Trap Headspace-Probengeber und einem Perkin-Elmer AutoSystem Gaschromatographen durchgeführt. Neben einer 0,53 mm „Wide Bore“ Kapillarsäule mit einer Länge von 30 m (DB-Alc2, J & W Scientific) wird ebenfalls eine 0,32 mm Standardsäule mit einer Länge von 25 m (CP-Wax, Varian) eingesetzt. Das Probenvolumen in den 20 ml Probengefäßen beträgt 1 ml, zu dem 0,1 ml interner Standard gegeben werden. Als interner Standard wird tert. Butanol und Tetrahydrofuran (0,01 %) benutzt. Bei den Messungen ohne „Trap“-Modus wird 1 g Na_2SO_4 zur Steigerung der Empfindlichkeit den Proben zugegeben. Im „Trap“-Modus wird auf die Zugabe von Salzen verzichtet.

Methoden

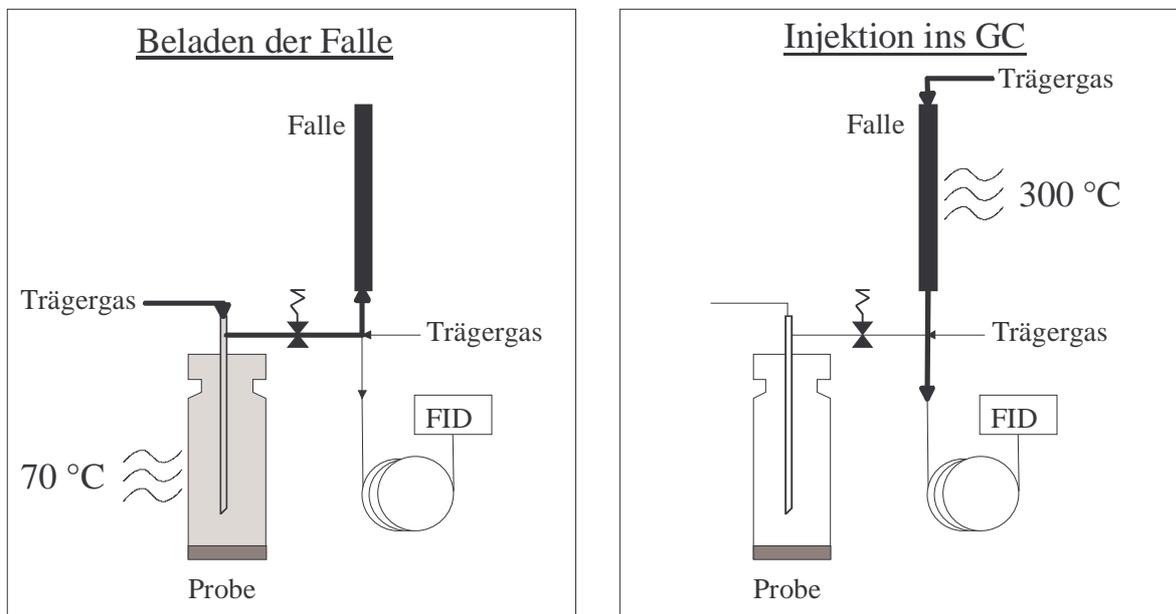


Abb.1: Schematische Darstellung der zwei wichtigsten Arbeitsschritte im „Trap“-Modus. Beladen der Falle: Zunächst wird das Probengefäß erwärmt, mit Trägergas gefüllt und durch Öffnen des Ventils gelangen die Analyten in die Falle, wo sie adsorbiert werden. Durch einen zusätzlichen Trägergasstrom („Isolation Flow“) gelangen keine Analyten in das angeschlossene GC. Injektion: Durch Erwärmen der Falle auf 300 °C werden die Analyten wieder vom Adsorbens gelöst und durch Trägergas, das durch die Falle gespült wird, zum GC transportiert.

Im Vergleich stehen 3 unterschiedliche Methoden: Zum Einen die klassische HS-GC mit Zusatz von Salzen, des Weiteren der neue „Trap“-Modus mit einer 0,53 mm Kapillarsäule und schließlich der „Trap“-Modus mit einer 0,32 mm Kapillarsäule.

Die klassische HS-GC-Analyse ohne „Trap“-Modus wird mit der 0,53 mm Kapillarsäule isotherm bei 35 °C durchgeführt. Zwischen Transferkapillare und Trennsäule ist im Injektor ein „Zero-Dilution Liner“ geschaltet; ein Stromverhältnis von 1:10 am Split verbessert dabei die Auflösung der Signale. Die Detektion erfolgt mit einem FID. Die Probengefäße werden mit einem Trägergasdruck von 120 mbar bei 70 °C für 18 min temperiert.

Im „Trap“-Modus (Abb. 1) wird ebenfalls die selbe 0,53 mm Kapillarsäule verwendet. Der Trägergasdruck im Probengeber und im Probengefäß beträgt 130 mbar. Die Zeit, die dem System zur Erreichung des Gleichgewichts gewährt wird, beträgt wiederum 18 min bei 70 °C. Die Temperatur der Falle beträgt beim Beladen 40 °C und bleibt während der „Dry Purge“-Phase konstant. Während dieser Phase wird für 16 min Trägergas durch die Falle gespült, um die hohen Wasseranteile von der Aktivkohle zu entfernen. Im nachfolgenden Desorptionsschritt wird die Temperatur in der Falle auf 300 °C erhöht und Trägergas für 0,2 min mit einem Druck von 160 mbar in Fließrichtung zur Trennsäule durch die Falle gespült. Die Einstellungen des GC ändern sich nicht und er wird wiederum mit einem Split von 1:10 und einer Ofentemperatur von 35 °C isotherm betrieben.

Für die 0,32 mm Kapillarsäule sind höhere Trägergasdrücke notwendig, d.h. im Probengeber und Probengefäß wird ein Druck von 160 mbar vor dem Beladen der Falle erzeugt. Bei der Desorption der Analyten von der Aktivkohle wird für eine Zeitspanne von 0,2 min ein Druckpuls von 185 mbar in Fließrichtung zur Transferkapillare generiert. Die gaschromatographische Trennung wird mit einem Temperaturprogramm durchgeführt (Starttemperatur 35 °C, Endtemperatur 70 °C, Heizrate 1,0 °C/min).

Die statistische Auswertung der Kalibrierungen wird mit dem Programm Igor Pro (Wave Metrics Inc.) durchgeführt; es eignet sich hierfür aber auch jedes andere wissenschaftliche Analyseprogramm, wie z.B. Origin. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze nach DIN 32645 anhand der hyperbolischen Toleranzgrenzen um die Kalibriergerade wird ein Vertrauensniveau von 0,99 (Signifikanzniveau 0,01) eingesetzt. Vergleichbare Vorschriften für die Qualitätskontrolle analytischer Messungen finden sich auch in [9,10]

Ergebnisse

Aufbau einer neuen „Trap“-Methode

Ausgehend von der klassischen HS-GC-Methode wurde direkt eine neue „Trap“-Methode entwickelt. Dabei wurde lediglich der Probengeber HS 110 Trap an den bestehenden GC mit der vorhandenen Kapillarsäule angeschlossen und die Trägergasparameter angepasst. Die Methanol-Kalibrierung in Abb. 2 zeigt bei der Verwendung der Aktivkohlefalle im Vergleich zur vorherigen Kalibrierung eine deutliche Zunahme der Empfindlichkeit.

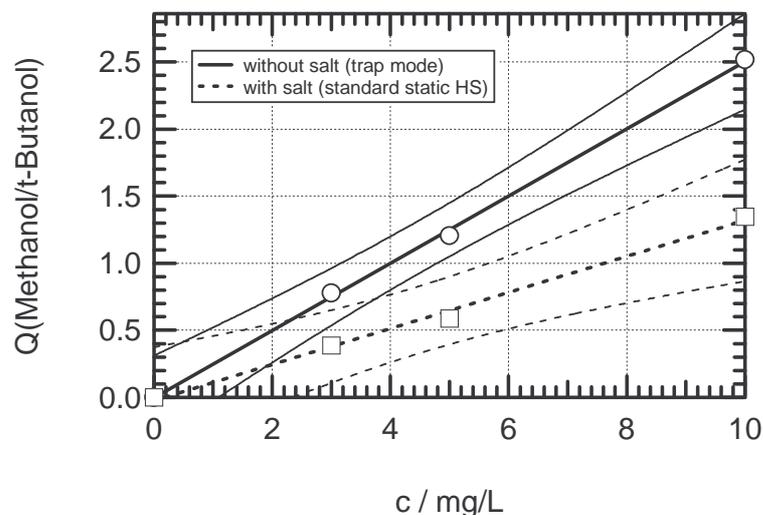


Abb. 2: Vergleich der Methanol-Kalibrierung nach der „alten“ HS-GC-Methode inkl. Salzzugabe mit der „Trap“-Methode. Durch den Einsatz des Aktivkohleadsorbens kann auch ohne Zugabe eines Salzes die Empfindlichkeit um den Faktor 1,5 erhöht und die Nachweisgrenze um den Faktor 0,5 erniedrigt werden.

Diese signifikante Verbesserung kann zwar nicht für alle untersuchten Analyten erreicht werden, jedoch erfährt durch den Einsatz der Falle keine der o.g. Analyten eine schlechtere Wiederfindung als bei der klassischen HS-GC.

Weiterhin zeigen die Konfidenzbänder in Abb. 2, dass allein eine verbesserte Empfindlichkeit mit einer Verbesserung der Nachweisgrenze einhergeht.

Die gewonnenen Vorteile der „Trap“-Methode sind allerdings auch mit Nachteilen verbunden: Im Probengeber mussten für den „Trap“-Modus zusätzliche Trägergasleitungen verbaut werden, die sehr sensibel auf Druckeinstellungen reagieren und dadurch die Suche nach den optimalen Betriebsparameter schwieriger gestalten als bei der statischen HS-GC. Wie das Chromatogramm in Abb. 3 zeigt, wird auch die Wahl einer geeigneten Kapillarsäule eingeschränkt. Die Verwendung der Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 0,53 mm („Wide Bore“) führt zu einem starken „Tailing“ der Signale.

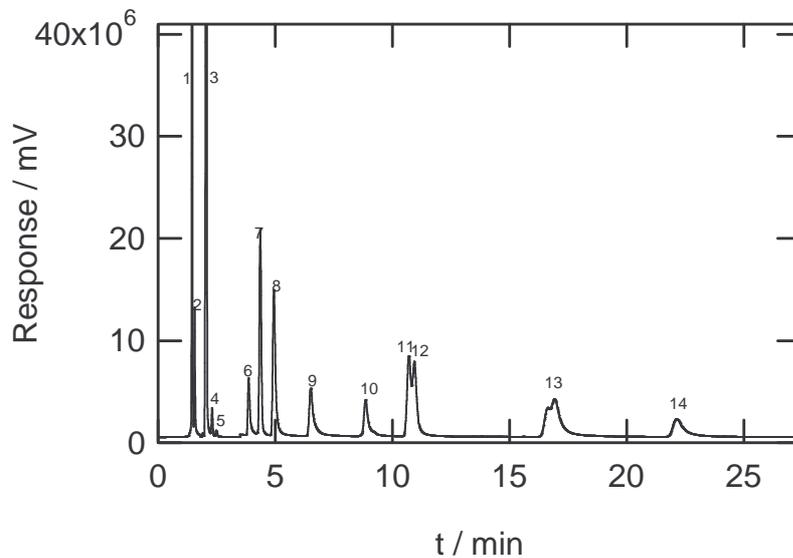


Abb. 3: Chromatogramm eines Kalibrierstandards. Die Zahlen beziehen sich auf folgende flüchtige Substanzen: Acetaldehyd (1), Methanol (2), Ethanol (3), Aceton (4), Propanol-2 (5), Propanol-1 (6), Butanon-2 (7), Butanol-2 (8), 2-Methyl-1-propanol (9), Butanol-1 (10), Pentanol-2 (11), Pentanol-3 (12), 2,3-Methyl-1-butanol (13), Pentanol-1 (14). Durch die verzögerte Desorption kann man deutlich eine Verbreiterung der Signal zu höheren Zeiten („Tailing“) beobachten.

Dieses „Tailing“ resultiert aus dem verzögerten Aufheizen der Adsorbensfalle, und kann auch durch die kurzfristige Erhöhung des Trägergasflusses während der Desorptionsphase nicht kompensiert werden.

Optimierung der Gaschromatographie für den Einsatz mit der Adsorbensfalle

Um dem Problem des „Tailing“ zu begegnen, wird eine andere Kapillarsäule mit einem kleineren Innendurchmesser von 0,32 mm eingebaut. Dadurch können höhere Drücke und Trägergasflüsse im HS-GC-System erreicht werden, die eine verzögerte Freisetzung der auf der Aktivkohle adsorbierten Analyten ausgleichen und die Injektion somit verbessern. Abb. 4 zeigt ein typisches Chromatogramm mit der 0,32 mm Standardkapillarsäule: Das „Tailing“ konnte minimiert werden und die Signale der einzelnen Analyten sind gut voneinander getrennt. Aber auch hier wird der Vorteil wiederum durch einen Nachteil erkauft: Die Analyszeit erhöht sich signifikant, so dass schnelle Analysen nicht möglich sind. THF musste als neuer interner Standard eingeführt werden, da tert. Butanol bei der gewählten Kapillarsäule das Methanol-Signal zu stark überlagert.

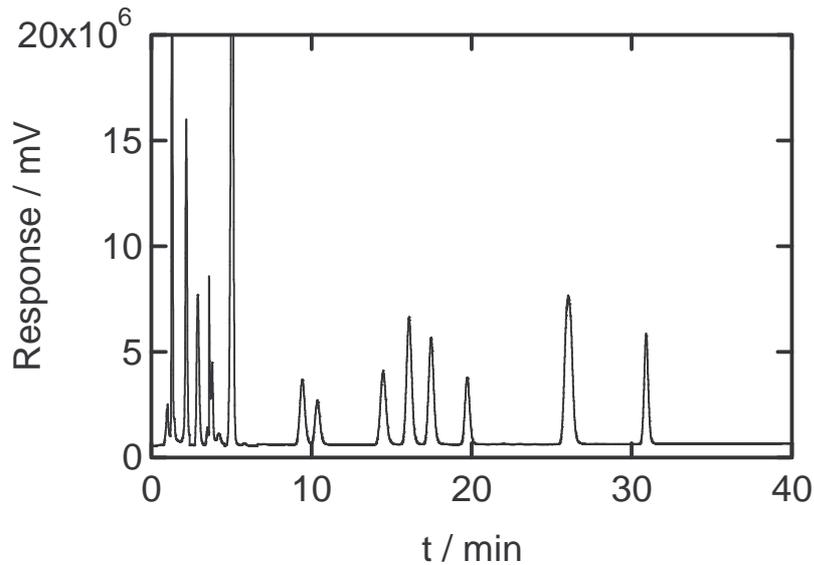


Abb 4: Chromatogramm mit normaler Varian CP-Wax 57 CB Säule (25 m x 0,32 mm; Schichtdicke 1,2 μm). Im Vergleich zur Kapillarsäule mit 0,53 mm Querschnitt weisen die Signale eine symmetrische Form auf, ein „Tailing“ wird nicht beobachtet.

Trotz der langen Analysezeiten erweist sich diese Methode als sehr robust und äußerst präzise. Abb. 5 zeigt das Histogramm der absoluten THF-Fläche von 27 Einzelmessungen. Innerhalb einer Messreihe schwankt die Signalfäche des internen Standards im Mittel nur um 2 %. Durch die symmetrische Verteilung steht auch fest, dass es zu keiner signifikanten Akkumulation der Analyten auf dem Adsorbens kommt. Dennoch sollte mindestens jede zehnte Messung eine Blindprobe sein, um Verschleppungen ausschließen zu können.

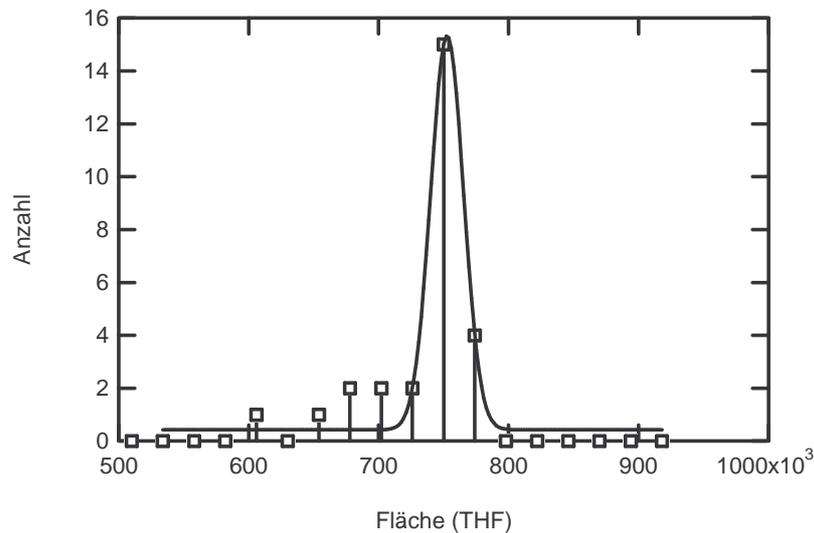


Abb. 5: Histogramm der THF-Signalfäche von 27 Einzelmessungen. Das Maximum der angepassten Gauß-Funktion befindet sich bei 750000, die Halbwertsbreite beträgt 17000 (2 %).

Abb. 6 zeigt beispielhaft für die untersuchten Analyten eine typische Pentanol-2-Kalibrierung, bei der ein Bestimmtheitsmaß von 0,99995 und eine Nachweisgrenze von 0,07 mg/l erreicht wird. Damit ist auch über einen breiten Konzentrationsbereich eine hohe Linearität und eine niedrige Nachweisgrenze gesichert.

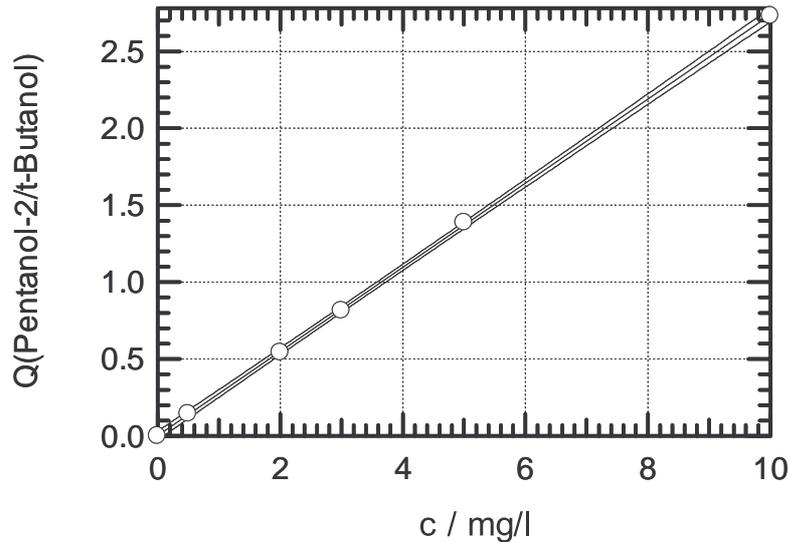


Abb. 6: Pentanol-2-Kalibrierung im Bereich 0 bis 10 mg/l dargestellt mit hyperbolischen Konfidenzbändern ($R^2=0,99995$, $x_{NG}=0,07$ mg/l bei einem Signifikanzniveau $\alpha=0,01$).

Diskussion der Ergebnisse

Mit den dargestellten Ergebnissen kann gezeigt werden, dass die Verwendung einer Adsorbensfalle oder „Trap“ im Bereich der Begleitkoholanalytik durchaus ihre Berechtigung hat, zumal dadurch die Probenvorbereitung stark vereinfacht werden kann. Die Zugabe von Salzen zur Steigerung der Empfindlichkeit wird somit unnötig und eine erhebliche Veränderung der Probe bzw. Probenmatrix wird somit umgangen. Im Gegensatz zur Kryofokussierung ist bei der Adsorptionsfalle der apparative Aufwand wesentlich geringer. Das Adsorbensmaterial bietet zusätzlich die Möglichkeit der optimalen Anpassung an die Analytik, so dass gezielt bestimmte Substanzen oder Substanzklassen untersucht werden können. Im Gegensatz zur vergleichbaren Headspace-SPME, bei der nur kleine Glasfaserkapillare verwendet werden [11], wird durch die größere Adsorbensmenge auch eine größere Adsorptionsflächen erreicht, so dass eine bessere Anreicherung und längere Standzeiten realisiert werden können.

Zusätzlich kann kondensiertes Wasser oder Lösungsmittelreste durch die „Purge Dry“-Funktion entfernt werden. Dabei wird bei niedriger Temperatur (Raumtemperatur) die Adsorbensfalle mit Trägergas gespült. Lösungsmittelsignale und Untergrundrauschen werden dadurch verringert.

Literatur

- [1] Bonte, *Begleitstoffe alkoholischer Getränke*, Schmidt-Römhild, Lübeck, 1987.
- [2] Machata, *Blutalkohol* 7 (1970), 345 – 348.
- [3] Schulz, Teske, Gilg, Aderjan *et al*, T+K 72 (2005), 85 – 89.
- [4] Dewulf, Van Langenhove, *Atmospheric Environment* 31 (1997), 3291 – 3307.
- [5] EPA, *Volatile Organic Compounds by GC/MS*, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste, SW-846 Method 8260B, Rev. 2, 1996
- [6] Lennard, *Fire Cause and Fire Debris Analysis*, 13th Interpol Forensic Science Symposium, Lyon, 2001.
- [7] Grecsek, Perkin-Elmer Application Note 007483-01, 2005.
- [8] Griffith, Perkin-Elmer Application Note 006810-03, 2004.
- [9] NIOSH, *NIOSH Manual of Analytical Methods*, 3. Aufl., DHEW Pub. Nr. 84-100, 1987.
- [10] DFG, *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*, Deutsche Forschungsgemeinschaft Verlag Chemie, 1985.
- [11] Pawliszyn, *Anal. Chem.* 75 (2003), 2543 – 2558.