

Eine präzise und einfache gaschromatographische Methode zur direkten Bestimmung von Alkoholkonzentrationen in Vollblut

U. P. SCHLUNEGGER

Eingegangen am 1. März 1967

I. Einleitung

Hohe Empfindlichkeit und gute Differenzierungs- bzw. Trennmöglichkeiten führten in den letzten Jahren zu einer ausgedehnten Anwendung der Gaschromatographie in der forensischen Analytik. Besonderes Interesse erlangte dabei die Bestimmung von Blutalkoholkonzentrationen, da sich mit dieser Methode neben den bereits erwähnten Vorteilen auch noch erhebliche Gewinne an Arbeits- und Zeitaufwand erzielen lassen.

Im allgemeinen sollte ein forensisch brauchbares Verfahren unter anderem folgende Bedingungen erfüllen:

1. Gute Differenzierung von Äthanol und anderen chemischen Substanzen, beispielsweise solcher, die infolge pathologischer Zustände (Diabetes, gewerbliche Lösemittel-Intoxikationen) im Blut enthalten, oder infolge sekundärer Alterationen der Blutproben (bakterielle Zersetzung) entstanden sind.

2. Präzision bzw. Reproduzierbarkeit.

3. Möglichst wenig Arbeitsschritte, in der Absicht, damit subjektive Fehler weitgehend auszuschalten. Eine direkte Injektion der Blutprobe in die Apparatur — ohne irgendwelche weiteren Vorbereitungen — ist daher anzustreben.

4. Relativ kurze Analysedauer.

In der Literatur wurden bisher verschiedene Verfahren vorgeschlagen, die aber die gestellten Forderungen jeweils nur teilweise erfüllen.

So setzen z. B. McCORD und GADSDEN [1], RAY [2] sowie FOX [3] die Gaschromatographie erst zur Untersuchung von Destillaten ein. Dadurch wird zwar eine verbesserte Selektivität der Methode erreicht, die Destillation mit all ihren Nachteilen kann aber nicht umgangen werden.

CADMAN und JOHNS [4], ROCKERBIE [5], LYONS und BARD [6], wie auch OSTERHAUS [7] untersuchen im Gaschromatographen einen Extrakt aus Blut. Die dazu verwendeten Lösemittel verdecken aber einen Teil der bekannten organischen Lösemittel, verursachen eine recht

umfangreiche Probenvorbereitung und erfordern zudem spezielle Einrichtungen (Umschaltventile für Rückspülungen), wenn nicht sehr lange Wartezeiten in Kauf genommen werden möchten.

Eine weitere Gruppe, nämlich MARIQ und MOLLE [8], MATUMOTO [9] und DURITZ et al. [10] fällen vor der gaschromatographischen Untersuchung die Eiweißbestandteile des Blutes mit chemischen Agenzien aus. Anschließend lassen sich die Proben zwar leicht dosieren, doch werden durch diese Art der Blutaufbereitung zusätzliche Fehlerquellen eingebracht.

Zur Umgehung der erwähnten Dosierungs-Schwierigkeiten beim genauen Abmessen einiger Mikroliter hochviscösen Blutes geben unter anderem PARKER et al. [11], HESSEL und MODGLIN [12], MACHATA [13] sowie FREUDIGER und VIGNAU [14] den Blutproben einen internen Standard in Form eines organischen Lösemittels zu. Die dadurch bedingten Messungen und/oder Wägungen stellen aber erneut eine Fehlerquelle dar. Außerdem können — je nach Art des internen Standards — zufällige Beimischungen zum Blut (bei Lösemittel-Intoxikationen, Diabetes etc.) unter Umständen übersehen werden und quantitative Fehler bewirken.

Direkte gaschromatographische Analysen von Blutproben führen CHUNDELA und JANAK [15] sowie BOBER (BECKMAN) durch. Sie benötigen aber dazu nicht sehr rasch auswechselbare Einsätze zur Abtrennung schwerflüchtiger Blutbestandteile und/oder Doppelkolonnen-systeme — letztere zur Überbrückung der Schwierigkeiten, die stark wasserhaltige Proben in der Gaschromatographie bereiten können.

Alle diese erwähnten Methoden erfüllen eine oder mehrere der eingangs aufgestellten Forderungen nur teilweise oder nicht. Wir versuchten deshalb, ein Verfahren zu entwickeln, das auf einfachste Art eine direkte Bestimmung der Alkoholkonzentration in Blutproben mit hinreichender Genauigkeit gestattet. Im folgenden sei über Einzelheiten dieser Methode berichtet.

II. Unsere Methode

A. Apparatives

Gaschromatograph Beckman GC — 2 mit Flammenionisations-Detektor.

Betriebstemperatur: 80° C.

Trägergas: Stickstoff.

Trennsäule: 12 ft., 3/16 in. Stahlrohr mit einem Gemisch von 78 Teilen NPGA (Nonylphenol-Glycerin-Äther [17]), 22 Teilen ORGA (Isooctyl-resorcin-Glycerinäther [18]) und zwei Teilen Alkaterge T in einer Belegungsdichte von 10% auf Chromosorb A-NAW 60/80 mesh (Johns-Manville).

Proben-Einlaß: Fest-flüssig-Einlaß mit rasch auswechselbarem Siebeinsatz (Bajonettverschluß) [19].

Schreiber: Honeywell, 1 mV, 25 cm Schreibbreite mit Disc-Integrator.

Dosierung: Mit Beckman liquid sampler (8 Mikroliter).

Zur Homogenisierung des Blutes wurde ein Polymetron-Mixer verwendet.

B. Methodisches

B 1. Trennsäule. Die direkte Analyse von Vollblutproben verlangt eine wasserbeständige Trennsäule. Flüssige stat. Phasen auf Ester- oder Amid-Basis sind aus diesem Grunde auf die Dauer wenig geeignet. In Frage kommen dagegen Materialien mit Ätherbindungen, wie z.B. Polyäthylenglykole. Letztere werden auch meistens für die zur Diskussion stehenden Verfahren eingesetzt. Leider sind die Leistungen derartiger Trennsysteme in der Regel nicht ausgesprochen gut. Beispielsweise lassen sich die diversen einfachen aliphatischen Alkohole (Methanol, Äthanol, Isopropanol) nicht oder nicht ohne weiteres auftrennen (MACHATA [13] — eine Leistung, die von einem forensischen Verfahren zur Blutalkoholbestimmung verlangt werden sollte. Wir entwickelten aus diesem Grunde ein Trennmaterial, das den gestellten Anforderungen weitgehend genügt und ein relativ rasches Arbeiten erlaubt. Die Eigenschaften der verwendeten Materialien wurden bereits an anderer Stelle beschrieben [20].

B 2. Proben-Eingabe. Die im Vollblut enthaltenen, schwer flüchtigen Bestandteile bewirken eine Verschmutzung des Einlaß-Systems oder der vordersten Partie der gaschromatographischen Trennsäule. Häufiges Reinigen oder Auswechseln der betroffenen Apparateile ist daher nötig, um unliebsame Veränderungen der Chromatographiebedingungen oder sogar Verstopfung der Trennsäule zu verhindern. In der Regel werden auswechselbare Einsätze verwendet, in denen die Blutproben verdampft werden. Brauchbare derartige Geräte wurden vor allem von MACHATA [13] und BOBER [16] beschrieben. Das Auswechseln der bei den Analysen verschmutzten Teile dauert aber jeweils eine gewisse Zeit, da dazu ein oder sogar mehrere Schraubverschlüsse gelöst werden müssen. Ein rasches Arbeiten wird dadurch stark behindert. Wir konstruierten deshalb einen Proben-Einlaß, der durch einen Bajonettverschluß festgehalten wird. Das Auswechseln des verschmutzten Apparateils ist so in kürzester Zeit möglich. Erfahrungsgemäß ist unser Gaschromatograph — Auswechseln und Equilibrieren bzw. Aufheizen des Einspritzteiles eingerechnet — innerhalb 2 min wieder betriebsbereit.

B 3. Zur Probemenge. Für die Abmessung der Blutproben hat sich ein Beckman liquid sampler bewährt. Er gestattet, die von uns zur Analyse verwendeten 8 µl homogenisierten oder ungerinnbar gemachten

Vollblutes sehr genau und reproduzierbar abzumessen (vgl. Abschnitt „Reproduzierbarkeiten“).

B 4. Durchführung der Blutalkoholbestimmung. Wie wir bereits früher [20] zeigten, lässt sich durch „Überlagerung“ von zwei Analysen auf der

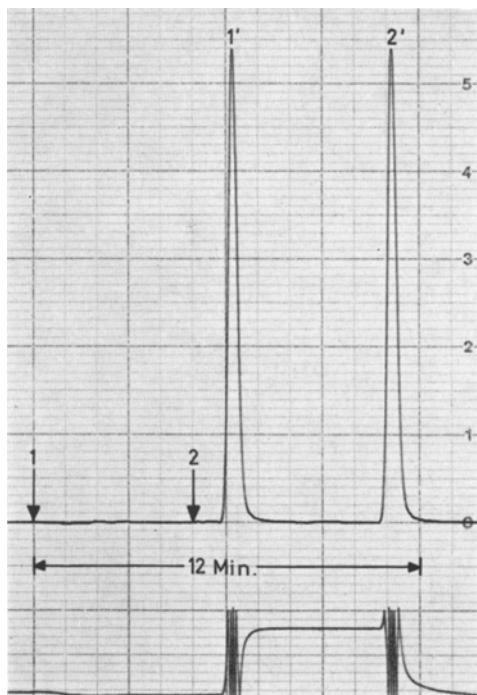


Abb. 1. Doppelbestimmung durch Überlagerung von zwei Proben auf der gaschromatographischen Säule. 1 Erste Probe-Eingabe, 1' = zu 1 gehörender Äthanol-Peak. 2 Zweite Probe-Eingabe, 2' = zu 2 gehörender Äthanol-Peak

gaschromatographischen Säule Zeit gewinnen. In der Praxis wird kurz vor dem Erscheinen des ersten Äthanol-Peaks eine zweite Blutprobe in den GC eingegeben (vgl. Abb. 1). Eine Doppelbestimmung beansprucht unter diesen Bedingungen höchstens 14 min.

Zur täglichen Eichung der Anlage wird zu Beginn jedes halben Arbeitstages eine Doppelbestimmung einer genau eingestellten und geprüften (ADH, Interferometrie) wäßrigen Lösung mit 0,8% Äthanol durchgeführt. Die Blutalkoholkonzentration kann darauf basierend folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{BAK} = \frac{0,8\% \times \text{Integratorwert der Blutprobe}}{1,06 \times \text{Integratorwert der wäßrigen Eichlösung}}$$

(1,06 = Dichte des Blutes).

Die Berechnung nach dieser Formel ist möglich, da die Eichkurve einer durch den Nullpunkt gehenden Geraden entspricht (vgl. Eichung).

C. Eigenschaften der Methode

C 1. *Trennmöglichkeiten der NPGA—ORGA-Säule.* Die Trennleistung der Säule wurde durch Blutproben mit Zusätzen von je ca. 1% an

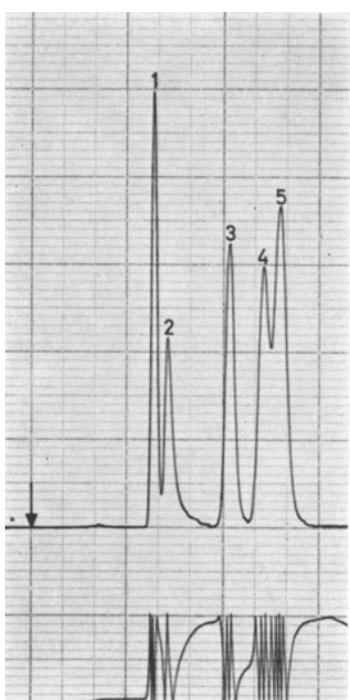


Abb. 2. Auftrennung einiger organischer
Lösungsmittel (direkt aus einer Blutprobe).

1 Aceton; 2 Methanol; 3 Äthanol
(ca. 0,5%); 4 Isopropanol;
5 tert. Butanol

bekannten Alkoholgehaltes ermittelt. Als Beispiel seien die Resultate bei 0,8 Gewichts-% aufgeführt (Tabelle 2).

Daraus lässt sich der Standardfehler

$$\sigma = \sqrt{\frac{\varepsilon (M^D - M)^2}{n-1}}$$

zu $\pm 17,0$ Integratoreinheiten bzw. zu $\pm 1,3\%$ des Gesamtwertes errechnen.

Tabelle 1
*Trennmöglichkeiten der verwendeten
Gaschromatographie-Kolonne*

Lösungsmittel	Abtrennung von Äthanol
Hexan	vollständig
Perchlöräthylen	vollständig
Aceton	vollständig
Methanol	vollständig
Chloroform	vollständig
Tetrachlorkohlenstoff	vollständig
Benzol	zu ca. 30%
Propylformiat	zu ca. 95%
Äthylacetat	zu ca. 95%
Äthanol	—
Methyl-äthyl-keton	zu ca. 90%
iso-Propanol	zu 98%
tert. Butanol	vollständig
Trichlöräthylen	vollständig

organischem Lösungsmittel überprüft. Die erreichten Auftrennungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Außerdem ist in Abb. 2 ein Beispiel einer Auftrennung abgebildet.

C 2. *Reproduzierbarkeit.* Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen wurde durch je zehn Doppelbestimmungen an Blutproben

Tabelle 2. Bestimmungsfehler bei einer Blutalkoholkonzentration von 0,8 Gew.-%

<i>n</i>	<i>I</i>	<i>I</i> — <i>M</i>	<i>R</i> in %	<i>M^D</i>	<i>M^D</i> — <i>M</i>	<i>R^D</i> in %
1	1270	—34	—2,6	1310	+ 6	+0,5
	1350	+44	+3,4			
2	1290	—14	—1,1	1280	—24	—1,8
	1270	—34	—2,6			
3	1275	—29	—2,2	1288	—16	—1,2
	1300	— 4	—0,3			
4	1315	+11	+0,8	1317	+13	+1,0
	1320	+16	+1,2			
5	1350	+44	+3,4	1325	+21	+1,6
	1300	+ 4	+0,3			
6	1280	—24	—1,8	1290	—14	—1,1
	1300	— 4	—0,3			
7	1317	+13	+1,0	1316	+12	+0,9
	1315	+11	+0,8			
8	1335	+31	+2,4	1324	+20	+1,5
	1312	+ 8	+0,6			
9	1280	—24	—1,8	1285	—19	—1,5
	1290	—14	—1,1			
10	1300	— 4	—0,3	1307	+ 3	+0,2
	1315	+11	+0,8			

I = Integratorwert; *M* = Mittelwert aus 20 Bestimmungen; *M^D* = Mittelwert der Doppelbestimmung; *R* = relativer Fehler der Einzelbestimmung; *R^D* = relativer Fehler der Doppelbestimmung.

Tabelle 3. Fehlergrenzen bei verschiedenen Alkoholgehalten

BAK-Bereich	Einzelbestimmung			Doppelbestimmung		
	Höchstwert	Tiefstwert	Standardfehler	Höchstwert	Tiefstwert	Standardfehler
0,4%/ ₀₀	+4,2%	—3%	±1,9%	+2,9%	—2,3%	±1,5%
0,8%/ ₀₀	+3,4%	—2,6%	±1,8%	+1,6%	—1,8%	±1,3%
1,6%/ ₀₀	+3,6%	—3,9%	±2,0%	+1,6%	—3,6%	±1,6%
2,4%/ ₀₀	+1,7%	—2,4%	±1,0%	+1,4%	—1,5%	±0,85%
3,2%/ ₀₀	+4,1%	—5,1%	±1,6%	+3,2%	—2,3%	±1,6%
	max. 4%	max. 5%	rund 2%	max. 3%	max. 4%	rund 1,5%

Der höchste gemessene Wert liegt 1,6% oberhalb, der tiefste Wert 1,8% unterhalb des Mittelwertes aus den zehn Doppelbestimmungen.

Analog wurden auch die Fehlergrenzen bei anderen Blutalkoholkonzentrationen bestimmt. In Tabelle 3 sind die entsprechenden Angaben ersichtlich.

C 3. *Eichung*. Durch die Analyse mehrerer Blutproben bekannten Alkoholgehaltes (bestimmt nach Nicloux modif. und mit der ADH-Methode) wurde die Eichkurve ermittelt. Sie ist in Abb. 3 dargestellt.

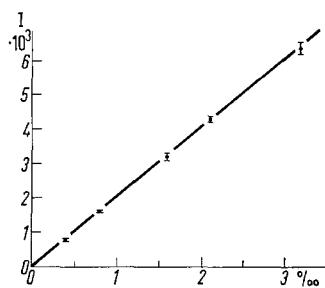


Abb. 3. Eichgerade mit eingezeichneten Streubereichen (maximale Einzelabweichungen bei zehn Doppelbestimmungen)

Es handelt sich dabei um eine den Nullpunkt schneidende Gerade. Veränderungen der Apparateempfindlichkeit — durch Variation des Gasflusses — verursachen eine mehr oder weniger starke Neigung der Eichgerade. Die Erfahrung zeigte, daß diese Erscheinung — eine Folge der Trennsäulenalterung — leicht durch die Analyse einer genau eingestellten wäßrigen Äthanollösung ermittelt und in Rechnung gestellt

werden kann. Wir verwenden dazu in der Regel eine geeichte Lösung mit 0,8% Alkohol, die vorgängig jeder Analyseserie mitbestimmt wird (vgl. B. 4.).

III. Diskussion

1. Wie aus den Tests betreffend die Trennmöglichkeiten (C 1) ersichtlich ist, läßt sich der Äthylalkohol sehr selektiv erfassen. Sämtliche anderen Alkohole sind praktisch vollständig abtrennbar, ebenso die bekanntesten organischen Lösemittel. Einzig Benzol und in geringerem Maße Methyl-äthyl-keton läßt sich nicht voll abtrennen. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß diese Substanzen bereits im Konzentrationsbereich von nur 0,1% teilweise hochtoxisch wirken oder sich zumindest klinisch deutlich manifestieren. Die Selektivität der Methode ist folglich weitgehend gewährleistet.

2. Die ermittelten Fehlergrenzen (C 2) sind als klein zu werten. Größte Fehler „nach oben“ von weniger als 2% im kritischen Meßbereiche — bei einer Blutalkohol-Konzentration von 0,8% — dürfen als vertretbar bezeichnet werden, da ohnehin die physiologischen Schwankungen eine wesentlich größere Unsicherheit in die Beurteilung des Einzelfalles bringen.

3. Zur Ausschaltung von vielen Meßfehlern und nicht zuletzt auch von subjektiven Einflüssen wurde die Methode so angelegt, daß pro Bestimmung nur eine einzige Messung durch die untersuchende Person vorgenommen werden muß, nämlich die Dosierung von 8 µl Blut.

Die Präzision dieser Messung ist durch die Fehlergrenzen (C 2) hinreichend belegt.

Alle anderen Manipulationen, wie Einbringen interner Standards, Extraktionen, Destillationen oder Betätigen von Kolonnenschaltventilen fallen weg und das Resultat wird durch das Chromatogramm dokumentiert. Es wird damit eine größere Sicherheit erzielt.

4. Die Analysedauer für die Doppelbestimmung in einer Blutprobe ist mit einer Viertelstunde tragbar, bringt sie doch eine wesentliche Verkürzung gegenüber einer Destillation, einer Diffusionsmethode oder einer fermentativen Bestimmung.

Abschließend läßt sich feststellen, daß die eingangs an eine forensische Blutalkoholbestimmung gestellten Forderungen durch die beschriebene Methode weitgehend erfüllt werden.

Zusammenfassung

Ein Verfahren zur direkten gaschromatographischen Bestimmung von Blutalkoholkonzentrationen wurde beschrieben. Die einfache Arbeitsweise — eine einzige Dosierung — erlaubt eine Doppelbestimmung innerhalb einer Viertelstunde mit einem Standardfehler von höchstens $\pm 2\%$ (bei $0,8\%_{\text{vo}}$ Alkoholgehalt). Sämtliche anderen Alkohole sowie die gebräuchlichsten organischen Lösemittel und/oder physiologischen Substanzen werden vom Äthylalkohol abgetrennt.

Dank

Meinen Mitarbeitern Fräulein CHR. BECKER und Herrn A. BUSSLINGER sei für die Durchführung der Untersuchungen bestens gedankt. Der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern, die die Entwicklung der Methode unterstützte, sei an dieser Stelle ebenfalls unser Dank ausgesprochen.

Literatur

- [1] McCORD, W. M., and R. H. GADSDEN: The identification and determination of alcohols in blood by GLC. J. Gas Chrom. **2**, 38 (1964).
- [2] RAY, N. H.: Gas chromatography. I. The separation and estimation of volatile organic compounds by GLC. J. appl. Chem. **4**, 21 (1954).
- [3] FOX, J. E.: Gas chromatographic analysis of alcohol and certain other volatiles in biological material for forensic purposes. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **97**, 236 (1958).
- [4] CADMAN, W. J., and TH. JOHNS: The application of gas chromatography in forensic science. In: Methods of forensic science, vol. II, p. 157. London u. New York: Interscience Publishers 1963.
- [5] ROCKERBIE, R. A.: Ethanol in blood by gaschromatography. Canad. pharm. J. Sci. Sect. **96**, 38 (1963).

- [6] LYONS, H., and J. BARD: Gas chromatographic determination of lower alcohols in biologic sampler. *Clin. Chem.* **10**, 429 (1964).
- [7] OSTERHAUS, E., u. K. JOHANNSMEIER: Gaschromatographische Bestimmung von Alkoholen, Äther und Aceton in Blut und Urin. *Blutalkohol* **2**, 65 (1963).
- [8] MARIQ, L., and L. MOLLE: Investigations on the determination of alcoholism by gas chromatography. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.* **6**, 199 (1959).
- [9] MATUMOTO, H.: Studies on the micro-determination of alcohol. III. Gas-chromatographic analysis of ethanol. *Jap. J. leg. Med.* **14**, 420—425 (1960).
- [10] DURITZ, G., and E. B. TRUITT: A rapid method for the simultaneous determination of acetaldehyde and ethanol in blood using gas-chromatography. *Quart. J. Stud. Alcohol* **25**, 498 (1964).
- [11] PARKER, K. D., CH. R. FONTAN, J. L. YEE, and P. L. KIRK: Gas chromatographic determination of ethyl alcohol in blood for medicolegal purpose. Separation of other volatiles from blood or aqueous solution. *Analyt. Chem.* **34**, 1234 (1962).
- [12] HESSEL, D. W., and F. R. MODGLIN: The quantitative determination of ethanol and other volatile substances in blood by gas-liquid partition chromatography. *J. forens. Sci.* **9**, 255 (1964).
- [13] MACHATA, G.: Die Routineuntersuchung der Blutalkoholkonzentration mit dem Gaschromatographen. *Mikrochim. Acta* **4**, 691 (1962).
- [14] FREUDIGER, J. B., and J. A. VIGNAU: Determination of alcohols in body fluids by GLC. *J. forens. Sci.* **10**, 73 (1965).
- [15] CHUNDELA, B., and J. JANAK: Quantitative determination of ethanol and other volatile substances in blood and other body liquids by GLC. *J. forens. Med.* **7**, 153 (1960).
- [16] BOBER, H.: Die gaschromatographische Bestimmung von Alkoholen im Blut nach der Methode der Zweikolonnen-technik. *Beckman Report* **2**, 24 (1965).
- [17] SCHLUNEGGER, U. P.: Zur gaschromatographischen Trennung von aliphatischen, sauerstoffhaltigen Substanzen in Wasser. I. Eine neue polare, flüssige Phase. *J. Chromatogr.* **20**, 23 (1965).
- [18] — Zur gaschromatographischen Trennung von aliphatischen, sauerstoffhaltigen Substanzen in Wasser. III. Ein neues Trennmaterial zum Nachweis kleiner Methanolmengen in wässriger Lösungen. *J. Chromatogr.* **22**, 229 (1966).
- [19] — Ein Probeneinlaß zur direkten gaschromatographischen Bestimmung von leicht-flüchtigen Bestandteilen im Vollblut. *J. Chromatogr.* **27**, 237 (1967).
- [20] — Zur gaschromatographischen Trennung von aliphatischen, sauerstoffhaltigen Substanzen in Wasser. IV. Eine neue Trennsäule zur direkten, quantitativen Bestimmung von Äthanol in wässriger Lösung für forensische Zwecke. *J. Chromatogr.* **26**, 1 (1967).

Dr. U. P. SCHLUNEGGER
Institut für gerichtliche Medizin der Universität
Ch-3000 Bern