

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Blutalkoholbestimmung mit Dampfraumanalyse und d₆-Ethanol als internem Standard

J. Haißer, G. Schmitt, R. Aderjan

Abstract

A fast, sensitive and specific method for headspace blood alcohol analysis with deuterated internal standard was developed and validated. 120 blood samples were measured and the retrieved data were analysed statistically and compared with the common used techniques (ADH- and GC-FID-method). Gas chromatography was performed in isothermal mode (50°C) with a GC run time of 2,6 min. (Ion-Trap GC/MS Varian Saturn 2000, GC 3800). The samples were incubated for 20 min. at 72°C and then injected with an auto sampler (CTC Analytics COMBIPAL). After chromatographic separation (Column: Rtx-VMS 30m; 0,32mm ID; 1,8µm df) the quantification was performed using scan mode with three ions for ethanol and internal standard (d₆-ethanol) in each case. The method was linear ($R > 0,99$, in the concentration range 0,1-4,0 g/l), specific (no interference with suggested substances), sensitive (limit of quantification and limit of detection of 0,05 and 0,17 g/l) and precise (inter- and intra-assay coefficient of variation less than 2%).

The method was compared with the routinely used ADH- and Headspace GC-FID-methods. The GC/MS-method correlates slightly better with the GC-FID-method than the ADH-method. BIAS: GC/MS against ADH averages -1,7% and GC/MS against GC-FID averages +0,6%. Deuterated Ethanol as internal standard has some advantage: Practically identical vapour pressure and retention time of internal standard and ethanol and reduction the cycling time in serial analysis. Using mass spectrometry, disturbances can be realised and eliminated, if necessary. D₆-ethanol enables miniaturization. Special requirements: relatively small headspace affords high precision in sample preparation and measurement.

1. Einleitung

Zur Ergänzung der bestehenden Routineverfahren in der forensischen Blutalkoholanalytik wurde ein massenspektrometrisches Verfahren mit d₆-Ethanol als internen Standard entwickelt. Ziel war die Anwendung eines beweissicheren Bestimmungsverfahrens, bei dem Ethanol über die Retentionszeit und Substanzeigenschaften identifiziert wird.

2. Material und Methoden

In einer Pilotstudie wurden 120 Blut- bzw. Serumproben mit den routinemäßig angewandten ADH- und GC-FID-Verfahren [1], sowie einem neu entwickelten GC/MS-Verfahren jeweils 2-fach bestimmt.

Die Ausführung der massenspektrometrischen Dampfdruckanalyse erfolgte mit einem Ion-Trap GC/MS (Varian Saturn 2000, GC 3800). Hierzu wurden die Proben für 20 Minuten auf 72°C erwärmt und mit einem Autosampler (CTC Analytics COMBIPAL) in den GC überführt. Nach chromatographischer Trennung (Kapillare: RTX-VMS 30m; 0,32mm ID; 1,8µm df) bei 50°C wurde die Summe von drei Ionen im Massenspektrometer detektiert (Ethanol: $m/z = 31, 45$ und 47 ; d_6 -Ethanol: $m/z = 33, 49$ und 52). Die Quantifizierung erfolgte über den Abgleich der Ionensumme der registrierten Fragmente mit einem im System hinterlegten Referenzspektrum.

Die Validierung des GC/MS-Verfahrens erfolgte nach den Richtlinien der GTFCh [2, 3] mit der hierfür empfohlenen Auswertesoftware und entspricht der neuen Regelung zum §24c StVG mit dem Grenzwert von 0,2 Promille. Prüfpunkte waren Spezifität, Lagerungsstabilität des deuterierten internen Standards, Varianzhomogenität, Linearität, analytische Grenzwerte, Präzision und Richtigkeit [4-9].

Die Kalibrierung erfolgte mit wässrigen Standards der Fa. DiaSys, Holzheim (ehemals Fa. Merck). Die Kalibration wurde vor jeder Analysenserie neu durchgeführt (Leerwert, 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 und 4,0 g/l). Die Kalibratoren bei 0,2 und 0,1 g/l wurden durch Verdünnung aus 1,0 g/l selbst hergestellt. Zur Prüfung der Varianzhomogenität und der Linearität wurden der Leerwert und die übrigen wässrigen Kalibratoren 6-fach bestimmt.

Die Berechnung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32645 (Signifikanz=99%, Messungen=2, k=3) [10].

Zur Ermittlung von systematischen und zufälligen Fehlern (Genauigkeit) wurden zwei Serumkontrollproben an 8 Arbeitstagen jeweils doppelt bestimmt. Als Qualitätskontrollproben wurden zwei Serumkontrollproben 0,81 g/l und 1,15 g/l (Fa. Medichem, Steinenbronn) eingesetzt.

Die Spezifität wurde mit 11 Leerseren sowie 18 speziell hierfür ausgewählte Substanzen untersucht (Tab.2). In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss hoher Methanolwerte auf die Blutalkoholbestimmung untersucht. Hierzu wurden je 20 µl von 16 Serumkontrollproben (Fa. Medichem, Steinenbronn) mit vom Hersteller angegebenen Referenzwerten (0,81 g/l und 1,15 g/l) mit 1µl Methanol entsprechend einer Extremkonzentration von 40 g/l versetzt (99,9%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und jeweils Einzelbestimmungen vorgenommen.

Zur Prüfung der Lagerungsstabilität wurden d_6 -Ethanol (99%, Deutero GmbH, Kastellaun) mit bidest. Wasser auf 1,0 g/l verdünnt. Die Lösung wurde vierfach untersucht und die Absolutwerte der Flächenintegrale registriert. Die verbliebenen Reste wurden in verschlossenen Glasgefäßen für 3 Monate bei Raumtemperatur gelagert und danach erneut untersucht.

Zum Verfahrensvergleich mit GC-FID und ADH wurden die Ergebnisse, jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung, gegeneinander abgetragen und auf Übereinstimmung geprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Spezifität

Für die 16 getesteten Serumkontrollproben war eine relevante Störung durch Methanol auch bei Konzentrationen von 40 g/l nicht feststellbar (Tab.1). Störungen durch weitere, in Tab.2 aufgeführten Alkohole und Lösungsmittel wurden nicht registriert.

Tab.1: Einfluss einer extrem hohen Methanolkonzentration

Serumkontrolle $0,81 \pm 0,05$ g/l ¹		Serumkontrolle $1,15 \pm 0,06$ g/l ¹	
MW \pm SD g/l		MW \pm SD g/l	
mit Methanol	ohne Methanol	mit Methanol	ohne Methanol
$0,83 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,02$

Tab. 2: Ausgeschlossene Störfaktoren der BAK-Bestimmung

Alkohole Dotierter Wert 5 g/l	Lösungsmittel Dotierter Wert 5 g/l
1-Butanol	Aceton
2-Butanol	Diethylether
Isobutanol	Ethylacetat
2-Methyl-1-butanol	Eisessig
3-Methyl-1-butanol	Ethylchlorid
1-Propanol	Dimethylsulfoxid
1-Pentanol	Ethylenglycolmonomethylether
Ethylenglycol	Ethylenglycoldiethylether
	Ethylenglycoldimethylether

¹ Mittelwert und Standardabweichung der GC-Ethanolbestimmung mit diesen Kontrollseren betragen nach unserer eigens für die forensische Ethanolbestimmung mit je zwei Messwerten von zwei Verfahren entwickelten Qualitätskontrollkarte $0,79 \pm 0,01$ g/l bzw. $1,12 \pm 0,02$ g/l.

3.2 Lagerungsstabilität

Für die Flächenintegrale ergaben sich keine über der natürlichen Streubreite (Mittelwert ± 3 SD) liegenden Werte. Eine relevante Ethanolneubildung wurde nicht beobachtet.

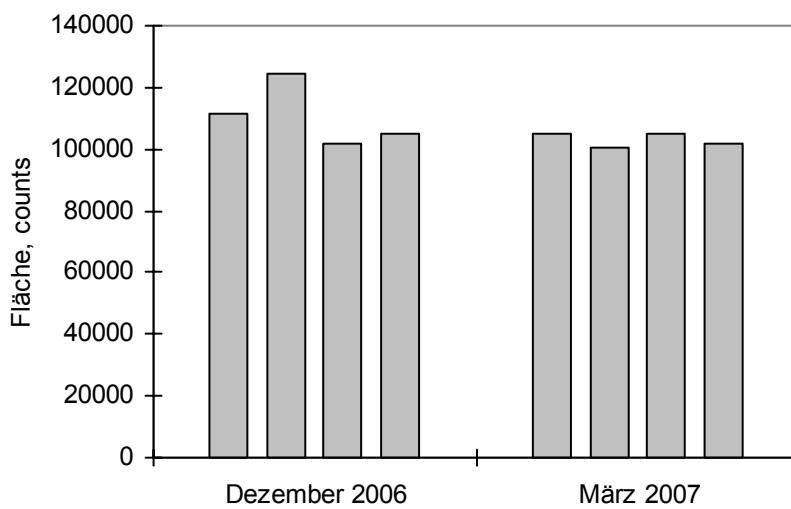


Abb.1: Überprüfung der Lagerungsstabilität für d_6 -Ethanol (1,0 g/l)

3.3 Varianzhomogenität und Kalibrationsmodell

Die Prüfung ergab, dass die Daten ausreisserfrei (Grubbs-Test, Signifikanz = 99%) und die Varianzen zwischen dem untersten (0,1 g/l) und dem höchsten Kalibrator (4,0 g/l) als homogen zu betrachten sind (Cochran-Test, Signifikanz = 99%). Die Anwendbarkeit des linearen Kalibrationsmodells wird mit dem Mandel-Test (Signifikanz = 99%) belegt.

3.4 Analytische Grenzwerte

Nach DIN 32645 errechnet sich für die Nachweisgrenze 0,05 g/l, für die Erfassungsgrenze 0,099 g/l und für die Bestimmungsgrenze 0,17 g/l. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass diese Werte noch niedriger liegen, wenn nur, wie in der DIN-Norm eigentlich vorgesehen, Kalibratoren um die analytischen Grenzwerte selbst berücksichtigt werden.

3.5 Präzision und Richtigkeit (Genauigkeit)

Die für die Qualitätskontrollproben nach den Richtlinien der GTFCh errechneten Ergebnisse werden in Tab.3 und Tab.4 dargestellt.

Tab. 3: Validierungsparameter für die Qualitätskontrollprobe mit Sollwert = 0,81 g/l

Kenndaten		Wiederholpräzision		Laborpräzision		Richtigkeit	
MW, g/l	0,805	SD, g/l	0,016	SD, g/l	0,016	Bias, g/l	-0,005
SD, g/l	0,015	RSD, %	1,96	RSD, %	1,96	Bias, %	-0,65
RSD, %	1,92						

Tab. 4: Validierungsparameter für die Qualitätskontrollprobe mit Sollwert = 1,15 g/l

Kenndaten		Wiederholpräzision		Laborpräzision		Richtigkeit	
MW, g/l	1,12	SD, g/l	0,02	SD, g/l	0,02	Bias, g/l	-0,03
SD, g/l	0,02	RSD, %	1,67	RSD, %	1,67	Bias, %	-2,22
RSD, %	1,48						

Abkürzungen: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung

3.6 Vergleich mit ADH- und GC-FID Verfahren

Der Vergleich der Ergebnisse aus dem GC- und ADH-Verfahren ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,998, der nur unwesentlich von dem Idealwert 1 bzw. der Winkelhalbierenden abweicht (Abb.2).

Der Vergleich des ADH-Verfahrens mit dem GC-Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,996 (Abb.3).

Der Vergleich der beiden chromatographischen Verfahren mit flammenionisations- oder massenspektrometrischer Detektion ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,997 (Abb.4).

4. Diskussion

Die Anwendbarkeit der massenspektrometrischen Dampfdruckanalyse auf die forensische Blutalkoholbestimmung wurde untersucht und belegt.

Ein routinemäßiger Einsatz ist mit einer 10 Meter Kapillarsäule, bei einer Analysenzeit unter 1 Minute möglich. Der hohe Probendurchsatz wird durch das gleichzeitige Erwärmen aller Proben erreicht. Matrixeffekte sind praktisch ausgeschlossen und wurden nicht beobachtet.

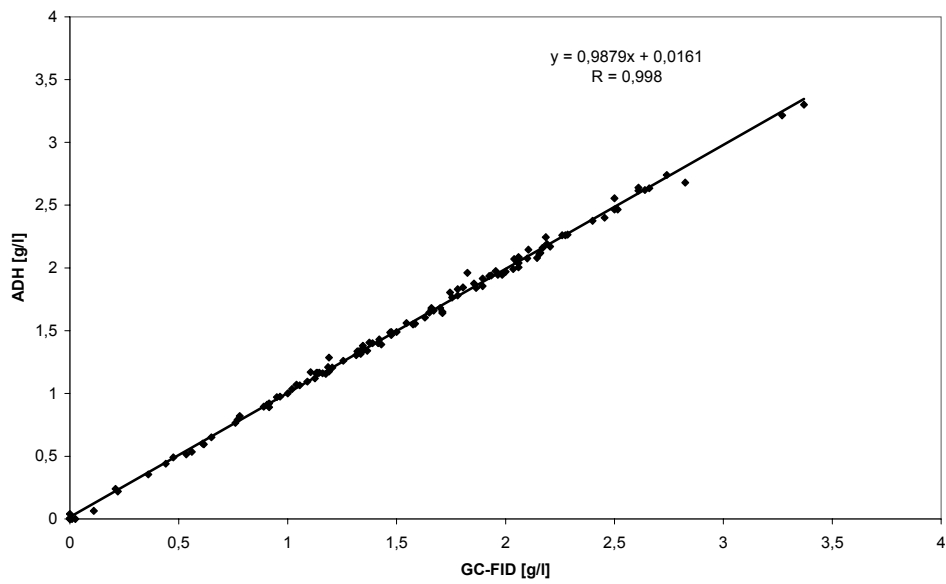


Abb.2: Korrelation des ADH- mit dem GC-FID-Verfahren

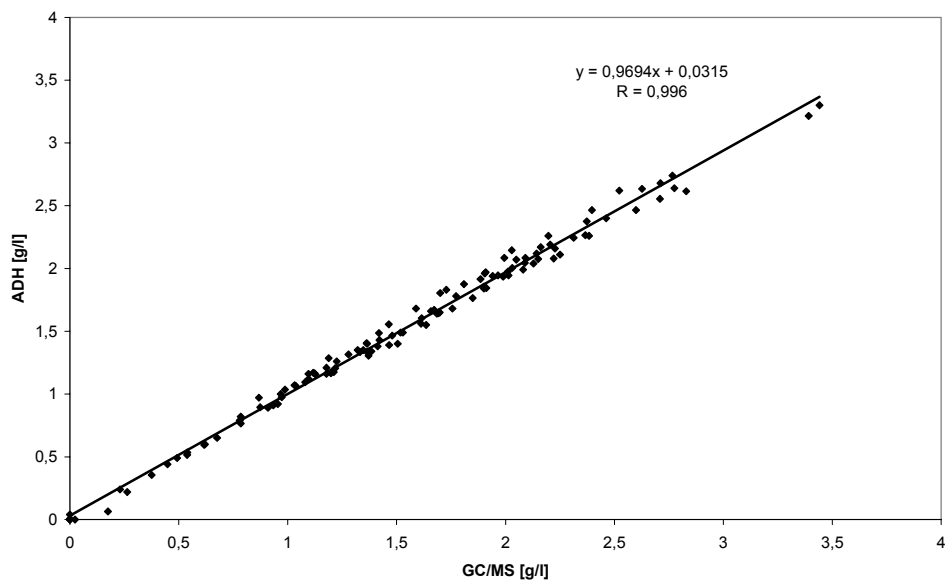


Abb.3: Korrelation des ADH- mit dem GC/MS-Verfahren

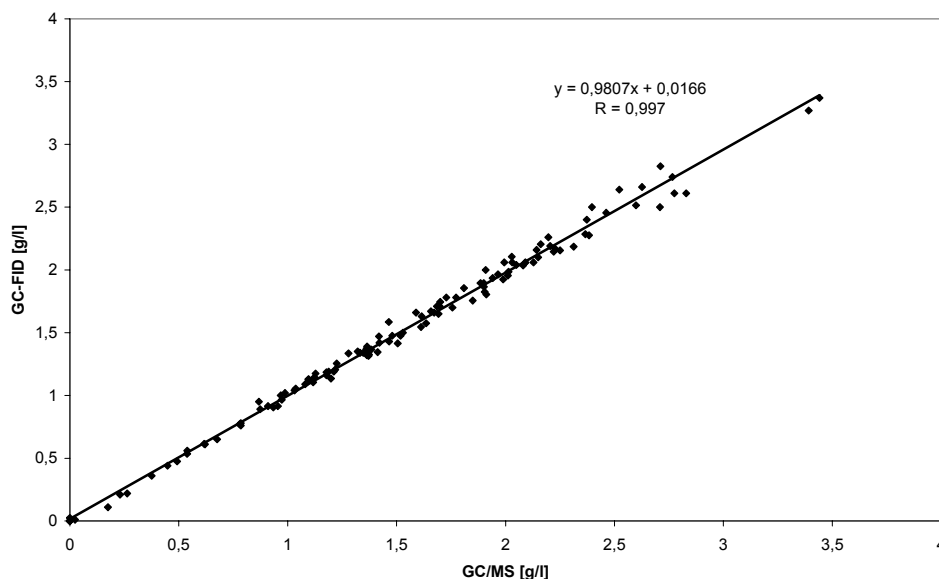


Abb.4: Korrelation des GC-FID- mit dem GC/MS-Verfahren

Die Analysendurchführung mit d_6 -Ethanol als internem Standard ist sinnvoll, da dieser die mit Ethanol am besten vergleichbaren physikalisch-chemischen Eigenschaften besitzt. Dies wäre beispielsweise bei Anwendung von tert-Butanol als internen Standard nicht gegeben.

Besondere Anforderungen werden an die Probenvorbereitung gestellt, insbesondere dann, wenn das üblicherweise bei Anwendung des GC-FID-Verfahrens benötigte Probenvolumen von 200 μ l auf 20 μ l reduziert wird. Der kleinere Dampfraum und die geringe Probenmenge stellen Anforderungen an die Präzision von Dosierung und Messdurchführung, die bereits mit der Drogenanalytik zu vergleichen sind.

Die Validierung wurde nach den Richtlinien der GTFCh, die eigentlich für gaschromatographische und massenspektrometrische Verfahren vorgesehen ist, durchgeführt.

Querstörungen waren im Rahmen der Spezifitätsprüfung nicht festzustellen. Dies gilt auch für den deuterierten internen Standard, für den in einem Überwachungszeitraum von etwa 3 Monaten keine lagerungsbedingten Veränderungen, insbesondere keine Ethanolbildung, festzustellen war. Obwohl andere flüchtige Stoffe, z.B. Methanol in toxischen Konzentrationen die Dampfdruckverhältnisse über der Probe maßgeblich verändern, war eine Beeinflussung der Dampfdruckverhältnisse zwischen Ethanol und d_6 -Ethanol nicht festzustellen.

Die Datenanalyse belegte Varianzenhomogenität im Bereich von 0,1 bis 4,0 g/l (Cochran-Test, Signifikanz = 99%) und Linearität (Mandel-Test, Signifikanz = 99%). Nach DIN 32645 errechnet sich eine Nachweisgrenze von ca. 0,05

g/l und eine Bestimmungsgrenze von ca. 0,17 g/l entsprechend ca. 0,04 und ca. 0,13 Promille Blutalkohol (Signifikanz = 99%, k=3). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass analytische Grenzwerte tagesaktuellen Schwankungen unterliegen und die Grenzwerte insgesamt eher überschätzt berechnet werden, wenn nicht, wie in der DIN-Norm eigentlich vorgesehen, die Kalibratoren in einem engen Bereich um die zu erwartenden Grenzwerte gesetzt werden. Auf weiterführende Experimente zur Verbesserung wurde verzichtet, da die Ergebnisse auch so praxistauglich und akzeptabel waren.

Die Vergleichbarkeit der in Doppelbestimmung erhaltenen Ergebnisse wurde für alle drei Verfahren belegt. Hierzu wurden jeweils zwei Verfahren gegeneinander aufgetragen. Die Abweichung zur Winkelhalbierenden ergab einen Bias von -1,7% (gegen ADH) und +0,6% (gegen GC-FID). Vergleichbar waren auch die nach Prüfung zweier Qualitätskontrollproben erhaltenen Ergebnisse für Präzision und Richtigkeit.

Bei Anwendung der massenspektrometrischen Detektion ist, wie im Bereich der forensischen Drogenanalytik, von einer ethanol-spezifischen und beweissicheren Bestimmung auszugehen. Diese Voraussetzungen gelten allerdings nicht für das GC-FID- und ADH-Verfahren, bei denen verfahrensspezifische Querstörungen prinzipiell nicht auszuschließen sind. Störungen können sich beispielsweise für das ADH-Verfahren durch lagerungsbedingte Veränderungen des Probenmaterials und für das GC-FID-Verfahren durch Ethylchlorid ergeben. Derartige Störungen können nur durch den Vergleich der Ergebnisse aus beiden Bestimmungsverfahren erkannt werden.

Die derzeit in den Richtlinien zur Bestimmung der Blutalkoholkonzentration für forensische Zwecke festgeschriebene Verfahrenskombination sollte überdacht werden, wenn das massenspektrometrische Verfahren aufgenommen wird, da dieses auch ohne Kombination mit einem anderen Verfahren beweisend ist. Denkbar wäre beispielweise eine von zwei Personen getrennt durchgeführte Probenvorbereitung, Messung und Auswertung. Anschließend könnten 4 Messwerte kombiniert und wie bisher einzeln und als Mittelwert mitgeteilt werden. Diese Verfahrensweise wäre zudem betriebswirtschaftlich sinnvoll, da die Aufrechterhaltung eines zweiten Bestimmungsverfahrens entfällt.

Das gaschromatographisch und massenspektrometrische Dampfraumverfahren ist zur Umsetzung der neuen Regelung zum §24c StVG mit einem Grenzwert von 0,1 Promille zuzüglich eines Sicherheitszuschlages von 0,1 Promille geeignet. Für forensische Fragestellungen wurde belegt, dass bei einer Bestimmung von 0,2 Promille auch der Grenzwert von 0,1 Promille sicher erreicht bzw. überschritten ist. Dies ergibt sich aus der nach DIN 32645 im Bereich der Bestimmungsgrenze anzunehmenden Ergebnisunsicherheit von 33%. Der Bias wurde hierbei zwar nicht berücksichtigt, ist aber im Hinblick auf die Ergebnisse der Validierung auch ohne praktische Relevanz.

5. Zusammenfassung

Die Pilotstudie belegt, dass die forensische Blutalkoholbestimmung durch Anwendung eines gaschromatographisch und massenspektrometrischen Verfahrens mit Dampfphaseanalyse routinemäßig möglich ist. Im Gegensatz zum GC- und ADH-Verfahren ist die massenspektrometrische Blutalkoholbestimmung beweissicher. Wir empfehlen die Aufnahme in die Richtlinien zur Bestimmung der Blutalkoholkonzentration für forensische Zwecke.

Wir danken dem Bund gegen Alkohol und Drogen im Straßenverkehr e.V. (B.A.D.S.) für die Unterstützung dieser Arbeit.

6. Literatur

1. Bundesgesundheitsamt (1966) Richtlinien für die Blutalkoholbestimmung für forensische Zwecke.
2. Schmitt G, Aderjan R (2004) Blutalkoholbestimmung - Validierung und Ermittlung der Messunsicherheit gemäß internationalen Standards Blutalkohol 41: 299-318.
3. Peters FT, Hartung M, Herbold M, et al. (2004) Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen T+K 71: 146-154.
4. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anhang A (1998) Anforderungen an einzelne Analysenmethoden T+K 65 18-24.
5. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anhang B1 (2000) Qualitätsstandards für spezielle Analyte T+K 67 78-80.
6. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anhang B2 (2002) T+K 69 32-34.
7. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Anhang C (2003) Anforderungen an eine Validierung T+K.
8. International Organization for Standardization. ISO 5725-2 (1994) Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen.
9. Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen (1991) T+K 58 43-47.
10. DIN 32645 (1994) Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen: Beuth Verlag, Berlin.

Dipl.-Chem. Jörg Haißer
Dr. Georg Schmitt
Prof. Dr. Rolf Aderjan
Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin
Universitätsklinikum Heidelberg
Voßstrasse 2
D-69115 Heidelberg