

ZUR GASCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON ALIPHATISCHEN, SAUERSTOFFHALTIGEN SUBSTANZEN IN WASSER

IV. EINE NEUE TRENNSÄULE ZUR DIREKTEN, QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON ÄTHANOL IN WÄSSERIGER LÖSUNG FÜR FORENSISCHE ZWECKE

U. P. SCHLUNEGGER

Gerichtlich-medizinisches Institut, Universität Bern (Schweiz)

(Eingegangen den 31. Mai 1966)

EINLEITUNG

Für routinemässige forensische Alkoholbestimmung in wässrigen Lösungen sollte das gaschromatographische Verfahren unter anderem folgende Bedingungen erfüllen:

gute Auftrennung der niedern Alkohole

hohe Reproduzierbarkeit in quantitativer Hinsicht

möglichst wenig Arbeitsschritte

relativ kurze Analysendauer (d.h. weniger als 10 Min. für die Bestimmung von Äthanol)

Wasserbeständigkeit der stationären Phase (also keine Ester- oder Amid-Bindungen).

Bisher in der Literatur zugängliche Methoden genügen nicht allen aufgeführten Anforderungen. Entweder liegen unbefriedigende Trennleistungen vor¹⁻³, die stationären Phasen sind hydrolysierbar⁴⁻⁷ oder die Arbeitstechnik ist verhältnismässig kompliziert und bietet dadurch gewisse Fehlerquellen (Einbringen interner Standards, Doppelkolonnentechniken^{8,9}). Wir entwickelten deshalb ein Verfahren, das die oben geforderten Bedingungen erfüllen sollte. Im folgenden seien am Beispiel der Äthanolbestimmung die Möglichkeiten der Methode aufgezeigt.

APPARATIVES

Gaschromatograph: Beckman GC-2 mit Flammenionisationsdetektor, Betriebstemperatur 85°.

Trennsäule: 12 ft., 3/16 in. Stahlkolonne

Stationäre Phase: Gemisch von 78 Teilen Nonylphenol-Glycerinaether (NPGA, 10) und 22 Teilen Isooctyl-Resorcin-Glycerinaether (ORGA, 11) und 2 Teilen Alkaterge T. Belegungsdichte: 10%.

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

Dosierung: mit Beckman Liquid sampler (8 μ l).

Probeneinlass: Fest-Flüssig-Einlass zu Beckman GC-M mit wasser-gekühlter Dichtung.

METHODISCHES

Wahl der Probemenge

Um die Notwendigkeit eines internen Standards zu umgehen, wurde die Probemenge so gross gewählt, dass sie gut reproduzierbar abgemessen werden kann. Zur Dosierung wurde ein Beckman Liquid Sampler verwendet. Befriedigende Reproduzierbarkeiten liessen sich bei Mengen von mindestens 8 μl erzielen. Bei kleineren Volumen macht sich eine unliebsame Vergrösserung des Dosierfehlers bemerkbar.

Im weiteren arbeiteten wir deshalb mit Dosen von 8 μl . Demzufolge mussten auch die Säulendimensionen entsprechend gewählt werden (vgl. unten).

Die stationäre Phase

Wie bereits früher beschrieben wurde^{10,11}, weist NPGA gute Trennfähigkeiten für Alkohole auf. Diese stationäre Phase vereinigt Stabilität in Wasser mit guter Temperatur- und Sauerstoff-Beständigkeit in sich. Ausserdem lassen sich damit andere sauerstoffhaltige Substanzen weitgehend von Äthanol abtrennen. Auch bleiben die Analysenzeiten—selbst bei langen Chromatographiesäulen—verhältnismässig kurz¹¹. Nachteilig wirkt sich ein schwaches "tailing" des Äthanol aus, wenn reines NPGA verwendet wird. Zum Teil lässt sich diese Erscheinung durch Verwendung von Chromosorb A unterdrücken. Da sich aber bei quantitativen Bestimmungen schon ein schwaches "tailing" nachteilig auswirkt, mischten wir dem NPGA etwas ORGA zu. Diese stationäre Phase (ORGA) ermöglicht in reiner Form dank ihrer ausgeprägten Polarität sogar eine saubere Darstellung des Methanol¹², trennt aber Äthanol und Isopropanol nicht. Durch verschiedene Versuche liess sich ein Mischverhältnis von 78 Teilen NPGA und 22 Teilen ORGA als geeignet für die Trennung auch von Äthanol und Isopropanol ohne "tailing" ermitteln.

Gleichsinnig wirkt ausserdem ein kleiner Zusatz von Alkaterge T.

Säulendimensionen

Die Trennsäule wurde für die Analyse von Proben in der Grösse von ca. 10 μl ausgelegt. Die besten Resultate liessen sich mit 3/16 in.-Kolonne erzielen. 1/4 in.-Säulen ergaben eine zu lange Analysendauer, 1/8 in.-Kolonne durchwegs schlechtere Auftrennungen (Überlastung der kleinen Säule durch das viele Wasser).

Die besten Resultate bezüglich Trennleistung, "tailing", Belastbarkeit und Analysendauer liessen sich mit einer Belegung des Chromosorb A (60/80 Mesh) mit 10 % NPGA-ORGA-Gemisch erzielen.

Einstellung der Empfindlichkeit des Detektors

Im Verlaufe der Arbeiten zeigte sich, dass bei der gewählten Apparateanordnung der Fehler des Disc-Integrators bei kleinen Banden grösser wurde als die übrigen Fehler von Detektor, Dosierung und Verstärkung zusammen. Die besten Resultate liessen sich bei Banden erzielen, die grösser als 50 % der Schreiberbreite ausmachten. Da für unsere Belange—forensische Äthanolbestimmungen—0.8 Gew. %/100 Äthanol in Wasser von Bedeutung sind, wählten wir die Detektorempfindlichkeit so, dass 8 μl

einer solchen Lösung einen Ausschlag von *ca.* 80 % der Schreiberskala ergaben (durch geeignete Wahl des N_2/H_2 -Verhältnisses im Brenner bei einer 5000-fachen Signalabschwächung).

CHARAKTERISTIKA DER METHODE

Trennfähigkeit der NPGA-ORGA-Säule

Die Trennfähigkeit der verwendeten Trennsäule wurde durch die Analyse von Stoffgemischen in wässrigen Lösungen ermittelt (Konzentrationen je *ca.* 1⁰/₀₀ pro Substanz). In Tabelle I sind die ermittelten Trennfaktoren aufgeführt. Ausserdem ist in Fig. 1 die Auftrennung von Methanol, Äthanol, Isopropanol und Aceton dargestellt.

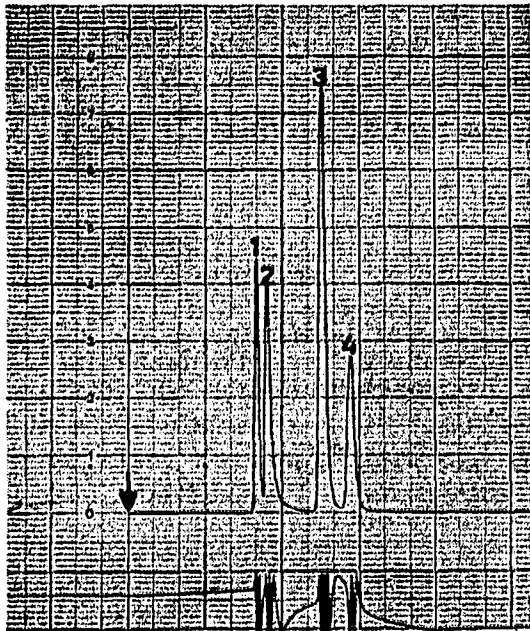


Fig. 1. Auftrennung von Methanol (1), Aceton (2), Äthanol (3) und Isopropanol (4) in Wasser (Konzentration je *ca.* 1⁰/₀₀).

Eichung

Die Apparatur wurde durch die Analyse einer Konzentrationsreihe von 0.4 bis 3⁰/₀₀ Äthanol im Wasser geeicht. Die Bandenflächen wurden mit einem Disc-Integrator ermittelt. In Fig. 2 sind die erhaltenen Werte gegen die Äthanolkonzentrationen aufgetragen. Daraus ist ersichtlich, dass im untersuchten Bereich ein praktisch linearer Zusammenhang zwischen Äthanolmenge und peak-Grösse besteht.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde durch die Analyse von 20 Proben (8 μ l) mit 0.8 Gew. ⁰/₀₀ Äthanol geprüft. Die Analysen wurden nach der Doppel-Bestimmungsmethode (vgl. unten) durchgeführt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass der maximale, relative Fehler der Einzelbestimmung 2.13 % und der Doppelbestimmung 1.36 % betrug. Der Standard-Fehler

TABELLE I

AUFLÖSEFAKTOREN FÜR SCHWIERIGER ZU TRENNENDE SUBSTANZEN
(Je ca. 10/00 in Wasser).

| Substanzen | Auflösefaktor |
|---------------------|---------------|
| Aceton | 0.88 |
| Methanol | 1 |
| Methanol | 1 |
| Äthanol | 1 |
| Äthanol | 0.98 |
| Isopropanol | 0.98 |
| Äthanol | 1 |
| tert.-Butanol | 1 |
| Äthanol | 0.95 |
| Methyl-Aethyl-Keton | 0.95 |
| Äthanol | 0.98 |
| Äthylacetat | 0.98 |
| Äthanol | 1 |
| Propylformiat | 1 |

TABELLE II

RESULTATE VON 10 DOPPELBESTIMMUNGEN

8 μ l mit 0.8% Äthanol in Wasser. I = Integratorwert der peaks; M = Mittelwert aus den 20 Bestimmungen = 1312; M* = Mittelwert aus der Doppelbestimmung. Standardfehler für die einzelne Bestimmung $\pm 1.04\%$; Standardfehler für die Doppel-Bestimmung (siehe S. 3): $\pm 0.804\%$.

| Nr. | I | I — M | Rel. Fehler (%) | M* | M* — M | Rel. Fehler der Doppelbestimmung |
|-----|------|-------|-----------------|------|--------|----------------------------------|
| 1 | 1320 | 8 | +0.61 | 1330 | +18 | +1.36 |
| 2 | 1340 | 28 | +2.13 | 1330 | +18 | +1.36 |
| 3 | 1305 | 7 | -0.53 | 1302 | -10 | -0.76 |
| 4 | 1300 | 12 | -0.91 | 1302 | -10 | -0.76 |
| 5 | 1285 | 27 | -2.05 | 1308 | -4 | -0.3 |
| 6 | 1330 | 18 | +1.36 | 1308 | -4 | -0.3 |
| 7 | 1315 | 3 | +0.23 | 1315 | +3 | +0.23 |
| 8 | 1315 | 3 | +0.23 | 1315 | +3 | +0.23 |
| 9 | 1310 | 2 | -0.15 | 1307 | -5 | -0.38 |
| 10 | 1305 | 7 | -0.53 | 1307 | -5 | -0.38 |
| 11 | 1299 | 13 | -0.99 | 1305 | -7 | -0.53 |
| 12 | 1310 | 2 | -0.15 | 1305 | -7 | -0.53 |
| 13 | 1300 | 12 | -0.91 | 1300 | -12 | -0.91 |
| 14 | 1300 | 12 | -0.91 | 1300 | -12 | -0.91 |
| 15 | 1320 | 8 | +0.61 | 1314 | +2 | +0.15 |
| 16 | 1307 | 5 | -0.38 | 1314 | +2 | +0.15 |
| 17 | 1330 | 18 | +1.36 | 1330 | +18 | +1.36 |
| 18 | 1330 | 18 | +1.36 | 1330 | +18 | +1.36 |
| 19 | 1320 | 8 | +0.61 | 1310 | -2 | -0.15 |
| 20 | 1300 | 12 | -0.91 | 1310 | -2 | -0.15 |

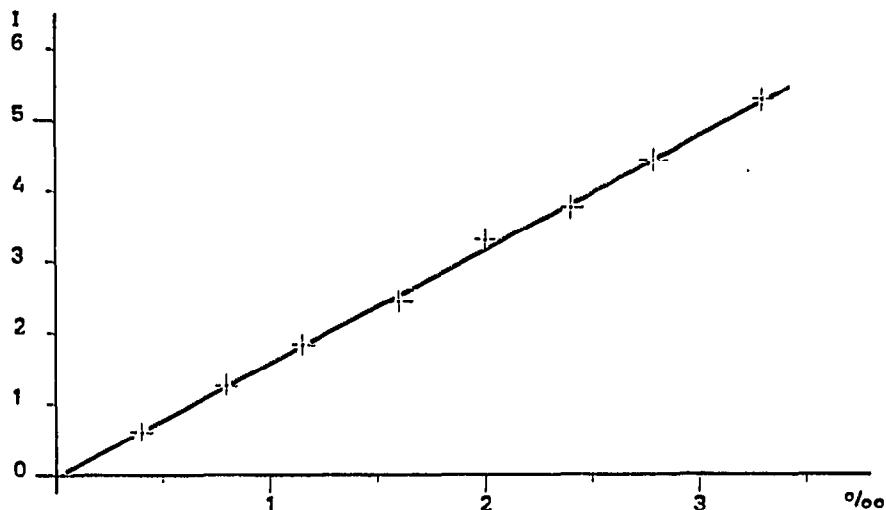


Fig. 2. Eich-Kurve für 0.4–3.3‰ Äthanol in Wasser (Dosiermenge 8 μ l).

der Doppelbestimmung liegt mit $\pm 0.804\%$ unter demjenigen der Einzelbestimmung mit $\pm 1.04\%$.

Analysendauer:

Die Retentionszeit für Äthanol beträgt auf der vorgeschlagenen Trennsäule *ca.* 7 Min. Das Wasser erscheint etwa nach 9 Min., wird aber durch den Flammenionisations-Detektor nicht angezeigt. Die Trennsäule ist daher unmittelbar nach dem Durchgang des Äthanols — d.h. *ca.* 8 Min. nach dem Start — wieder betriebsbereit. Um Zeit zu sparen, kann sogar noch vor dem Austritt des Äthanols eine neue Probe eingegeben werden. Allerdings darf das Äthanol der zweiten Probe nicht mit dem Wasser der ersten Dosierung zusammen in den Detektor gelangen, da dadurch Fehler

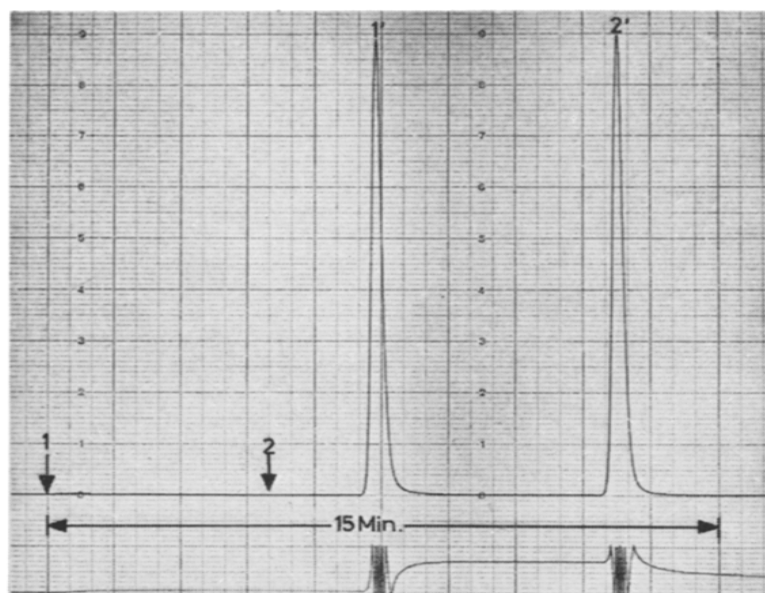


Fig. 3. Doppelbestimmung von Äthanol (*ca.* 1‰ in Wasser) durch Überlagerung der beiden Proben. 1-2 = 5 Min; 1-1' = *ca.* 7 Min.

in quantitativer Hinsicht entstehen. Gute Reproduzierbarkeiten erhält man bei einem Abstand von 5 Minuten zwischen erster und zweiter Dosierung. In Fig. 3 ist ein Chromatogramm einer solchen Doppelbestimmung mit Überlagerung der Proben dargestellt. Auf diese Art ist es möglich, eine zweifache Bestimmung von Äthanol in weniger als 14 Minuten durchzuführen.

DISKUSSION

Aus dem Abschnitt "Die stationäre Phase" geht hervor, dass die eine der gestellten Anforderungen an die Trennsäule — die Wasserbeständigkeit — mit dem von uns gewählten Trennmaterial erfüllt ist, da die stationären Phasen weder Ester- noch Amid-Bindungen enthalten. Eine Spaltung der Phenolätherbindung liess sich im wässrigen Milieu nicht beobachten. Auch die Forderung nach der Trennung von Alkohol ist erfüllt. Ausserdem lassen sich andere sauerstoffhaltige Substanzen gut von Äthanol abtrennen.

Durch die direkte Dosierung eines relativ grossen Volumens von 8 μ l wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit erreicht, wie aus einer Serie von 10 Doppelbestimmungen bei 0.8⁰/₀₀ ergab. Potentielle Fehlerquellen, die in Manipulationen, wie Abwägen, Einbringen eines internen Standards, Umschaltungen von Ventilen bei 2-Kolonnenverfahren, wurden mit der vorgeschlagenen Methodik zum vorneherein ausgeschaltet. Die resultierende, sehr einfache Arbeitsweise erlaubt auch ein rasches Arbeiten, ist doch eine quantitative Doppelbestimmung in weniger als 14 Min. möglich. Die vorgeschlagene Technik eignet sich somit in hohem Masse für forensische Äthanolbestimmung in wässrigem Milieu.

DANK

Meinen Mitarbeitern, Frl. CRISTA BECKER und Herrn A. BUSSLINGER, sei für die Hilfe bei der Synthese und der gaschromatographischen Überprüfung der beschriebenen Trennmaterialien bestens gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren zur direkten, quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Äthanol in stark verdünnten wässrigen Lösungen (0⁰/₀₀-Bereich) beschrieben. Die verwendete Trennsäule (NPGA/ORGA/Chromosorb A) erlaubt eine vollständige Abtrennung anderer Alkohole, Ketone und Ester von Äthanol, einfachste Arbeitstechnik, relativ kurze Analysendauer und hohe Reproduzierbarkeit (Standardfehler der Doppelbestimmung *ca.* \pm 0.8 %).

SUMMARY

A method for the direct, quantitative gas-chromatographic determination of ethanol in dilute aqueous solutions (0⁰/₀₀-range) is described. The chromatographic column is stable in water and permits separation of other alcohols, ketones and esters from ethanol (NPGA/ORGA/Chromosorb A). A double determination in 14 minutes gave a standard deviation of about \pm 0.8 %.

LITERATUR

- 1 J. E. FOX, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 97 (1958) 236.
- 2 G. MACHATA, *Mikrochim. Acta*, (1962) 691.
- 3 L. MARIQ UND L. MOLLE, *Bull. Acad. Méd. Belg.*, 24 (1959) 199.
- 4 K. D. PARKER, C. R. FONTAN, J. L. YEE UND P. L. KIRK, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1234.
- 5 M. ROGOZINSKI, L. M. SHORR UND A. WARSHAWSKY, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 429.
- 6 P. W. WEST, S. BUDDHADEV, B. R. SAUT, W. L. MALLIK UND J. G. SEN GUPTA, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 220.
- 7 W. M. McCORD, *J. Gas Chromatog.*, 2 (1964) 38.
- 8 W. J. CADMAN UND TH. JOHNS, *J. Forensic Sci.*, 5 (1960) 369.
- 9 H. BOBER, *Beckman Report 1965*, Heft. 2, S. 24.
- 10 U. P. SCHLUNEGGER, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 23.
- 11 U. P. SCHLUNEGGER, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 165.
- 12 U. P. SCHLUNEGGER, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 229.

J. Chromatog., 26 (1967) 1-7