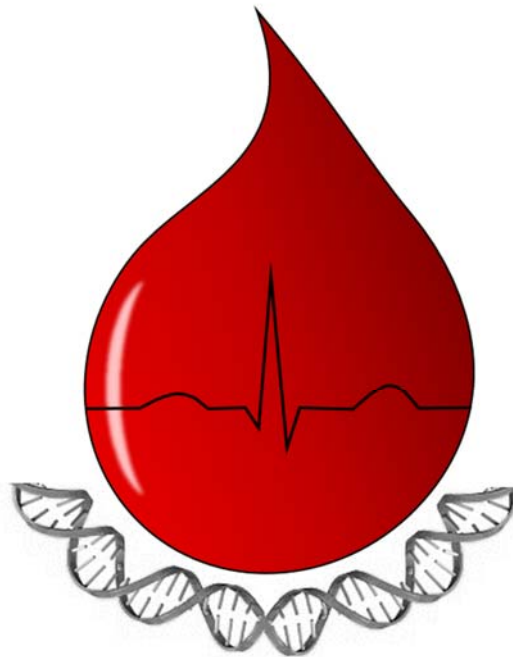




UMEÅ UNIVERSITET



BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Validering av kolonn för analys av alkoholer och glykoler med gaskromatografi

**Jämförelse av två kolonner samt fortsatt
validering för klinisk tillämpning**

Emelie Boström

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2018



Examensarbetets engelska titel

Validation of Column for Analysis of Alcohols and Glycols with Gas Chromatography

Handledare

Ylva Hedberg Fransson, Umeå universitet

Eva Sörstam, Region Västernorrland, Laboriemedicin, Örnsköldsviks sjukhus

Markus Lindqvist Odutuyo, Region Västernorrland, Laboriemedicin, Sundsvalls sjukhus

Läroproponent: Birgitta Sundström

Examinator: Mari Norgren

Datum för godkännande: 2018 06 15

Abstrakt

Alkohol- och glykolförgiftning är välkänt toxiskt och därför är en snabb och säker analys av alkoholer och glykoler en förutsättning för effektiv behandling. Gaskromatografi är en metod för att fastställa alkoholer och glykolars koncentration genom att separera ämnen från en blandning i en kapillärkolonn. Syftet var att jämföra en sedan tidigare använd kolonn med två nya kolonner vid analys av alkoholer och glykoler med gaskromatografi samt fortsatt validering av den ena för klinisk tillämpning. Gaskromatografen Trace GC användes för att jämföra Agilent J&W DB-ALC1 (Agilent) med Restek Rtx®-BAC Plus 1 (Restek) och Phenomenex® Zebron™ ZB-BAC1 (Zebron) genom att analysera kalibratorer, kontroller och spetsade serumprover med metanol, etanol, isopropanol och aceton samt etylenglykol och propylenglykol. Variationskoefficienten (CV) beräknades som ett mått på kvaliteten. Samtliga alkoholars och glykolars CV låg under den godkända gränsen, förutom det spetsade provet med 1,5 mmol/L propylenglykol. Då Restek och Zebron jämfördes erhöles bättre resultat för Restek med avseende på frekvens dubbeltoppar, baslinjeseparation, CV och analystid, vilken fortsatte att valideras. Restek visade sig vara mer fördelaktig än Agilent och dessutom erhöles Restek en godkänd validering. Slutsatsen blev att Restek var mer fördelaktig än båda kolonnerna Agilent och Zebron och därför validerades den för klinisk tillämpning.

Nyckelord

Gaskromatografi, alkohol, glykol, kolonn, validering, flamjonisationsdetektor

Introduktion

Förgiftning till följd av intag av de toxiska alkoholerna metanol, etanol, isopropanol och dess metabolit acetone, eller glykolerna etylenglykol och propylenglykol kan ge förödande konsekvenser (1).

Metanolförgiftning kan ge syn- och neurologiska skador och metabolisk acidosis (2), som är en förhöjd syraproduktion i kroppen och leder till sänkt pH och en sur miljö (3). Etanol är den största orsaken till alkoholförgiftning, men är inte lika farligt som de andra alkoholerna. Trots detta kan en hög mängd etanol orsaka stora problem, som koma, andningsdepression och till slut döden (4). Isopropanol är direkt toxiskt på grund av dess frätande förmåga i mag- och tarmkanalen, samt metaboliseras till bland annat acetone, som är ett depressivt medel för centrala nervsystemet (CNS-depressiv). Dock ses sällan metabolisk acidosis på grund av isopropanol och acetone, vilket kan orsakas av exempelvis metanol och etylenglykol (1). Etylenglykol är CNS-depressiv men är i sig själv inte toxiskt, dock metaboliseras det till toxiska metaboliter som orsakar systemiska- och organspecifika skador, främst på njurar. Etylenglykol finns i vanliga hushållsprodukter och intag av små mängder kan ge akut förgiftning (5). Propylenglykol är liknande etylenglykol men mindre toxiskt. Propylenglykol finns i vissa anti-frysmedel, hushållsprodukter och läkemedel och har påträffats i patienter vid förgiftning efter intag av anti-frysmedel (6). Gemensamt för de toxiska alkoholerna och glykolerna är att förgiftning kan leda till döden (7). Därför är snabb och säker analys av alkoholer och glykoler en förutsättning för effektiv behandling (1).

Alkoholer och glykolars koncentration kan fastställas med flera analysmetoder, och en av dessa är gaskromatografi (7). Idag används gaskromatografi som enda analysmetod på många sjukhus för att fastställa alkohol- och glykolförgiftning, men denna metod finns inte tillgänglig på alla sjukhus. Vissa sjukhus har ingen metod för att fastställa alkohol- eller glykolkoncentrationer i serum, utan analyserar osmolärt gap och anjonsgapet, vilka rubbas vid alkohol- och glykolförgiftning. Dock är det osäkert att analysera osmolärt- och anjonsgap för diagnos vid förgiftning, eftersom gapen varierar med tiden efter intag. Förgiftade patienter kan ha normala osmolärt- och anjonsgap kort efter intag och därför är gaskromatografi i många fall en säkrare metod (8, 9). Det finns även enzymanalyser för bestämning av alkoholer och glykoler i serum, men dessa saknar specificitet och förmågan att identifiera flera alkoholer och glykoler samtidigt. På grund av att både osmolärt-, anjonsgap och enzymatiska metoder anses osäkra, används vanligtvis gaskromatografi vid misstänkta alkohol- och glykolförgiftningar. Trots att gaskromatografi är säkrare och ger en koncentration på analyterna i serum, är det ofta en tidskrävande analys, främst för glykolerna. Metoden bör därför utvecklas för att effektivisera och göra diagnos och behandling säkrare (9).

Gaskromatografi nyttjar ämnens skillnader i egenskaper och kokpunkt för att separera och detektera ämnen i en blandning (10, 11). Separationen av analyterna sker i en kapillärkolonn, vilken är uppbyggd av ett glaskapillärrör av smält kiseldioxid. Glasröret är ömtåligt och täcks därför av polyamid som gör kapillärröret mer flexibelt och tåligt. Insidan av röret är täckt med ett skikt silikapartiklar med substituenterna fästa, den stationära fasen, där separationen sker. Substituenterna ger den stationära fasen dess specifika egenskaper och varierar beroende på vad som ska separeras. Det förångade provet transporteras genom kolonnen med en bärgas, den mobila fasen. Beroende på hur lösligt ett ämne är i

relation till den stationära fasen fastnar de förångade analyterna olika länge och kommer därför att träda ut ur kolonnen efter varierande tid, denna kallas retentionstid (11, 12). Kolonnen mynnar till detektorn, ofta en flamjonisationsdetektor (FID) där gasen bränns i en låga. När en kemisk förening bränns, bildas joner vilka detekteras i detektorn. Hur många joner som detekteras är proportionellt mot mängden ämne och en topp efter retentionstid erhålls i ett kromatogram (13).

En validering har som syfte att bevisa att metoden uppfyller ställda krav och utförs när en ny metod ska utvecklas, en befintlig metod förändras, när kvalitetskontroll visar på förändring av resultat eller när en metod ska flyttas till ett nytt laboratorium. Valideringens omfattning varierar och är en bedömningsfråga i varje enskilt fall, men den är alltid nödvändig. I denna studie är det en etablerad metod som används med annan instrumentering och då kan en begränsad eller fullständig validering utföras, vilket den analytiske kemisten beslutar. En sådan validering kan innehålla mått på precision, riktighet och specificitet. Precisionen kan bestämmas med standardavvikelsen (SD) eller variationskoefficienten (CV) och ett mått på riktighet kan vara det procentuella utbytet. En baslinjeupplösning på minst 1,5 från alla studerade interferenser är ett specificitetskrav (14).

Syftet var att jämföra en sedan tidigare använd kolonn med två nya kolonner för analys av alkoholer och glykoler med gaskromatografi samt fortsatt validering av den ena för klinisk tillämpning.

Material och metoder

Kolonner och provmaterial

Kolonnerna Agilent J&W DB-ALC1 (Santa Clara, CA, USA), Restek Rtx®-BAC Plus 1 (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) och Phenomenex® Zebron™ ZB-BAC1 (Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA) användes. Kolonnerna definieras härmed som Agilent, Restek samt Zebron.

Aidentifierade negativa serumprover insamlade vid laboriemedicin, Sundsvalls sjukhus Region Västernorrland, Sverige spetsade med analyterna metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Storbritannien), etanol (Kemetyl AB, Haninge, Sverige), isopropanol (VWR International, Tyskland), aceton (Fisher Scientific/Scharlab S.L, Spanien), etylenglykol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) och propylenglykol (Merck, Darmstadt, Tyskland) i olika koncentrationer. Även låg alkoholkontroll, propylenglykolkontroll, alkoholkalibrator och glykolkalibrator (samtliga från Sundsvalls sjukhus) samt hög alkoholkontroll och etylenglykolkontroll (båda från Bio-Rad Laboratories AB, Irvine, CA, USA) analyserades.

Gaskromatografi

Vid alkoholanalys användes vätgas med ett flöde på 6,3 mL/min som bärgas. I gaskromatografen (Trace GC, Thermo Scientific, Milano, Italien) injicerades 0,5 µl prov med splitflöde 42 mL/min och en injektortemperatur på 250°C. Ugnstemperaturen var 40°C under analysen som varade i 3,5 min. Vid alkoholanalys tillsattes provet 1:11 till internstandard (1,66 mmol/L 1-propanol).

Vid glykolanalys användes vätgas som bärgas med ett flöde på 3,15 mL/min. Injektionen av 0,5 µl prov utfördes med ett splitflöde på 30 mL/min och en injektionstemperatur på 250°C. Nålen förvärmades två sek i injektorn innan injektionen, även kallat "hot needle injection". Ugnstemperaturen var 110°C och analysen varade i 5 min. Vid glykolanalys tillsattes provet 1:2 till internstandard (13,1 mmol/L 1,3-propandiol, 15 mmol/L zinksulfat). Prover och kontroller innehållande serum centrifugeras och supernatanten analyseras på grund av fällningsreaktionen som sker och för att skona injektionssprutan och rena provet. Chromeleon Console 7 (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) användes som dataprogram.

Jämförelse av Restek och Zebron

Alkoholer analyserades med både Restek och Zebron, där fem kalibratorer (20,0 mmol/L metanol, 20,0 mmol/L etanol, 20,0 mmol/L isopropanol, 20,0 mmol/L aceton), fem höga kontroller (Bio-Rad, Liquichek Serum Volatiles Control, level 2, lot 38712), fem låga kontroller (5,0 mmol/L metanol, 5,0 mmol/L etanol, 5,0 mmol/L isopropanol, 5,0 mmol/L aceton) och enbart MQ H₂O analyserades. Glykoler analyserades med kolonnerna Restek och Zebron med fem kalibratorer (20,0 mmol/L etylenglykol, 20,0 mmol/L propylenglykol), fem propylenglykolkontroller (10,0 mmol/L), fem etylenglykolkontroller (Bio-Rad, Liquichek Serum Volatiles Control, level 2, lot 38712). Dessutom analyserades enbart internstandard och enbart MQ H₂O.

Baslinjeseperation beräknades mellan topparna isopropanol och aceton, samt mellan etylenglykol och propylenglykol för Restek och Zebron. Separationen beräknades med formeln (15):

$$R \text{ (baslinjeupplösning)} = \frac{\Delta t}{W_2 + W_1} \times 1,18. \quad t = \text{retentionstid} \quad W = \text{bredden vid halva höjden}$$

Validering av mätområde för insättande i klinisk verksamhet för Restek

Kolonnen Restek validerades av mätområdet genom att analysera prover i hela mätintervallet för både alkoholer och glykoler. För alkoholer analyserades koncentrationerna 1,5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L och 190 mmol/L av metanol, etanol, isopropanol och aceton. För glykoler analyserades koncentrationerna 1,5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 50 mmol/L och 90 mmol/L av etylenglykol och propylenglykol.

Fullständig validering av Restek för klinisk tillämpning

För alkoholer analyserades 17 kalibratorer, tolv höga kontroller, tolv låga kontroller och sex av vardera koncentration 1,5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L och 190 mmol/L av metanol, etanol, isopropanol och aceton. För glykoler analyserades 17 kalibratorer, tolv etylenglykolkontroller, tolv propylenglykolkontroller och sex av vardera koncentration 1,5 mmol/L, 2,5 mmol/L, 50 mmol/L och 90 mmol/L av etylenglykol och propylenglykol. Det procentuella utbytet beräknades för de spetsade serumproverna.

Statistik

Medelvärde, standardavvikelse och CV beräknades med Microsoft Excel för Mac, version 16.11, Microsoft.

Etiska överväganden

Endast aidentifierade negativa serumpooler, spetsade med analyterna användes. Kontroller och kalibratorer var vattenlösningar spetsade med analyterna. Detta var ett kliniskt utvecklingsarbete, och etiskt provning var därför ej nödvändigt.

Resultat

Analys med kolonnen Agilent

Koncentrationen av olika alkoholer och glykoler mättes med gaskromatografi där den tidigare rutinkolonnen Agilent användes. Den gav en variationskoefficient (CV) i spannet 2,7 – 4,6 % för alkoholerna metanol, etanol, isopropanol och aceton. Detta räknat från kontroller analyserade det senaste året. För glykolerna gav Agilent ett CV på 14,4 % för propylenglykolkontrollen räknat från kontroller analyserade det senaste året och 12,5 % för etylenglykolkontrollen.

Jämförelse av Restek och Zebron

Vid analys med kolonnerna gav Restek ett CV i spannet 1,7 – 6,4% för alkoholkontrollerna samt ett CV på 10,0% för propylenglykolkontrollen och 7,9% för etylenglykolkontrollen. Zebron gav ett CV i spannet 0,4 – 4,4% för alkoholkontrollerna samt ett CV på 6,0% för propylenglykolkontrollen och 3,7% för etylenglykolkontrollen (Tab.1). Jämfört med Restek gav Zebron fler dubbeltoppar för metanol. Visuellt sågs att topparna för isopropanol och aceton låg närmre varandra för Zebron än för Restek (Fig.1A och 1C) och detta bekräftades med baslinjeseparationsberäkning. Restek gav en baslinjeseparation på 3,09 och Zebron 2,19 mellan isopropanol och aceton. För etylenglykol- och propylenglykoltopparna erhöles en baslinjeseparation på 5,61 för Restek och 4,05 för Zebron.

Validering Restek

Valideringen av Restek för alkoholer gav ett CV för både den låga och höga kontrollen inom spannet 1,5 – 5,7%. Serumproverna spetsade med metanol, etanol, isopropanol och aceton i olika koncentrationer gav ett CV i spannet 0,7 – 6,6% för hela mätintervallet, utom för 1,5 mmol/L etanol där CV var 7,1% (Tab.2). Visuellt sågs inga dubbeltoppar, endast en antydning till en eftersläpande dubbeltopp för metanol på en av 190 mmol/L analyserna. Dock sågs en topp direkt efter metanol på samtliga kromatogram, vilket identifierats som acetaldehyd. Denna topp är baslinje-separerad på samtliga kromatogram och interfererar inte med metanol.

För glykoler erhöles ett CV på 7,1% för propylenglykolkontroll och 6,7% för etylenglykolkontroll. För de spetsade serumproverna i olika koncentrationer erhöles ett CV i spannet 4,5 – 12,2 % för både propylenglykol och etylenglykol i hela mätintervallet, utom för 1,5 mmol/L propylenglykol där CV uppgick till 24,0% (Tab.3).

Valideringen gav ett procentuellt utbyte i spannet 83,8% - 106,5% för de spetsade serumproverna, både för alkoholer och glykoler. Medelvärdet av de spetsade provernas procentuella utbyte beräknades till 98,2%.

Diskussion

Vid misstänkta alkohol- och glykolförgiftningar är en snabb och riktig analysmetod viktig. Idag är gaskromatografi den mest önskvärda analysmetoden för alkohol- och glykolbestämning vid laboratorier på grund av dess känslighet, noggrannhet, relativa specificitet och enkla automatisering (16). Många sjukhus använder gaskromatografi och därför är det viktigt för samhället att metoden fungerar bra, då snabbt insättande av behandling vid förgiftning ger större chans till överlevnad. Snabb och rätt behandling kan förkorta vårdtiderna, vilket även är ekonomiskt fördelaktigt.

Vid gaskromatografianalys av glykoler och alkoholer i Region Västernorrland är den godkända CV-gränsen för alkoholkontrollerna 7,5% och 15% för glykolkontrollerna. De två kolonnerna Restek och Zebron undersöktes och resultaten jämfördes i relation till den tidigare använda Agilentkolonnen. Resultatet visade att kolonnerna Restek och Zebron båda gav ett CV under 7,5% respektive 15% som angivits ovan. Zebron hade generellt ett lägre CV, men trots detta valdes Restek för fortsatt validering med avseende på andra faktorer, som att Zebron hade en högre frekvens av dubbeltoppar för metanol. Faran med en dubbeltopp är om programmet splittar toppen till två separata, trots att det är samma ämne (17). Med anledning av problematiken vid dubbeltoppar, undviks de i största utsträckning för att inte splittning ska inträffa. Restek hade en längre analystid, med ca 3,1 min mot Zebrons ca 2,5 min och i och med detta påträffades ett nytt problem, att topparna hamnade närmare varandra för Zebron. I vissa fall när toppar hamnar för nära varandra kan de interferera, vilket medför felaktiga analysresultat (8). Då tiden inte skiljde extremt mycket var det bättre med en högre baslinjeseperation, som Restek hade, eftersom det minskar risken för att topparna ska interferera.

Med Resteks och Zebrons CV, förekomst av dubbeltoppar, analystider och baslinjeseperation som bakgrund gjordes valet att fortsätta valideringen med Restek, och en validering av hela mätområdet gjordes. Detta för att på goda grunder införa den nya kolonnen i klinisk verksamhet eftersom gaskromatografen inte innehöll två separata kanaler. Vid valideringen av mätområdet analyserades alkoholer och glykoler i hela mätintervallet; 2 – 200 mmol/L för alkoholer och 2 – 100 mmol/L för glykoler. Denna validering gav goda resultat och insättande i klinisk verksamhet godkändes.

Valideringen av kolonnen Restek gav både den låga och höga alkoholkontrollen ett CV under 7,5%, vilket är gränsen för godkänt. Dock erhöles ett lägre CV för alkoholkontrollerna vid analys av Agilentkolonnen, men då de var relativt nära ansågs Restek vara en bättre kolonn när även resultat för glykolproverna vägdes in. För de spetsade proverna låg båda kontrollerna under gränsen för alla alkoholer. Etanol 1,5 mmol/L hade ett CV på 7,1%, vilket var högt men ändå godkänt, dock ligger denna i normalfallet utanför mätintervallet och kan därför bortses.

För glykolerna gav valideringen av Restek ett CV på 6,7% respektive 7,1% för glykolkontrollerna, vilket var en stor skillnad från kolonnen Agilent som tidigare hade använts i klinisk verksamhet. Agilent hade ett CV på 14,4% för propylenglykolkontroll och 12,5% för etylenglykolkontroll. Även de spetsade glykolproverna låg under gränsen. Dock uppgick CV för provet som var spetsat med 1,5 mmol/L propylenglykol till 24,0%, men detta kan bortses ifrån då den koncentrationen ligger utanför

mätintervallet. Det höga CV för 1,5 mmol/L propylenglykol visade på att den nuvarande lägsta detektionsgränsen på 2 mmol/L är en godtagbar gräns och att mätintervallet inte ska sänkas.

Valideringen av Restek gav även väl överensstämmande medelvärden mot referensvärden (18) för kontroller och spetsade serumprover för både alkoholer och glykoler. Medelvärdena visade på god riktighet vilket främjar insättande i klinisk verksamhet. För att ytterligare värdera Resteks riktighet beräknades det procentuella utbytet för respektive spetsat serumprov, för alkoholer och glykoler. Medelvärdet av det procentuella utbytet beräknades till 98,2%. Det optimala utbytet är 100%, eftersom metoden då har en exakt riktighet och det analyserade värdet överensstämmer helt med det sanna värdet. Ett procentuellt utbyte på 98,2% är något lägre än optimalt, men ändå nära och kolonnen visade på god riktighet (14).

Den kortare retentionstiden av analyterna i Restek med 3,1 min jämfört med Agilent's ca 3,7 min för alkoholerna, har effektiviserat metoden med 30 sek för alkoholerna och 60 sek för glykolerna, vilket ger en effektivare metod och ett snabbare analysvar.

I och med Resteks låga CV för glykoler och kortare analysid visade den sig vara en bättre kolonn, som gav säkrare och snabbare analysvar jämfört med kolonnerna Agilent och Zebron. Dock har inte Restek testats över en längre tidsperiod, vilket ger en missvisande jämförelse med Agilent där kontrollerna samlats in det senaste året. Desto längre tidsperiod kolonnen varit i rutin och kontrollerna samlats in, desto större risk att kontroller och kalibratorer varierar. Det går därför inte att säga om kolonnen kommer vara bättre efter en viss tidsperiod.

Vid fortsatta studier har det förslagits att byta internstandard till tert-butanol i stället för 1,3-propandiol. Detta eftersom 1,3-propanol har setts i flera postmortem fall, vilket visar att det är möjligt att inta denna alkohol och även att retentionstiden för tert-butanol är något kortare än 1,3-propandiol, och metoden kommer då att kunna effektiviseras ytterligare (19). Toppen för tert-butanol kommer att hamna på ett bättre ställe med Restek-kolonnen än med Zebron-kolonnen, vilket var ännu en anledning till varför Restek valdes för vidare validering.

I en studie som gjorts där två olika metoder och internstandarder för gaskromatografi vid analys av alkoholer i blodet jämfördes, användes Restek som en av kolonnerna. Studien visade att Restek med tert-butanol som internstandard gav de mest exakta och precisa resultaten. Studiens slutsats kan visa dels på att valet av Restek som kolonn i detta arbete var ett bra beslut, samt den eventuellt fortsatta studien att byta internstandard till tert-butanol kan vara fördelaktig (20).

Slutsatsen var att Restek var mer fördelaktig än båda kolonnerna Agilent och Zebron och därför validerades för klinisk tillämpning.

Tack tillägnas

Jag vill tacka min handledare Ylva Hedberg Fransson för bra handledning samt Markus Lindqvist Odutuyo och Eva Sörstam för bra handledning med den laborativa delen i detta arbete. Jag vill även tacka Region Västernorrland, laboratoriemedicin för utlåning av material, gaskromatograf och arbetsplats.

Referenser

1. Williams RH, Shah SM, Maggiore JA, Erickson TB. Simultaneous Detection and Quantitation of Diethylene Glycol, Ethylene Glycol, and the Toxic Alcohols in Serum using Capillary Column Gas Chromatography. *J Anal Toxicol.* 2000;24(7):621-626.
2. Gupta N, Sonambekar AA, Daksh SK, Tomar L. A rare presentation of methanol toxicity. *Ann Indian Acad Neurol.* 2013; 16(2): 249–251.
3. Medibas. Metabol acidosis. <https://medibas.se/handboken/kliniska-kapitel/akut/patientinformation/diverse/metabol-acidos/>. (2018-05-10)
4. Church AS, Witting MD. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. *J Emerg Med.* 1997;15(5):687-692.
5. Fraser AD. Clinical toxicologic implications of ethylene glycol and glycolic acid poisoning. *Ther Drug Monit.* 2002;24(2):232-238.
6. Ehlers A, Morris C, Krasowski MD. A rapid analysis of plasma/serum ethylene and propylene glycol by headspace gas chromatography. *Springerplus.* 2013;2(1):203
7. Kraut JA. Diagnosis of toxic alcohols: limitations of present methods. *Clin Toxicol (Phila).* 2015;53(7):589-595.
8. Ng PCY, Long BJ, Davis WT, Sessions DJ, Koyfman A. Toxic alcohol diagnosis and management: an emergency medicine review. *Intern Emerg Med.* 2018;13(3):375-383.
9. Orton DJ, Boyd JM, Affleck D, Duce D, Walsh W, Seiden-Long I. One-step extraction and quantitation of toxic alcohols and ethylene glycol in plasma by capillary gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID). *Clin Biochem.* 2016;49(1-2):132-138.
10. Nationalencyklopedin. Gaskromatografi. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/gaskromatografi>. (2018-04-24).
11. Nationalencyklopedin. Kromatografi. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/kromatografi>. (2018-04-24).
12. Rahman M, El-Aty A, Choi JH, Shin HC, Shin SC, Shim JH. 2015. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science.* JL Anderson, A Berthod, VP Estévez, and AM Stalcup, editors. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 823-834.
13. SALE. TRACE GC 2000 Service Manual. <https://s-a-le.nl/wp-content/uploads/2016/07/TRACE-GC-Service-Manual-M31709270-Rev-C.pdf>. (2018-04-24)

14. Swedac. Validering av kemiska analysmetoder. https://www.swedac.se/wp-content/uploads/2016/06/SWEDAC-DOC-00_32.pdf. (2018-04-24).
15. Shimadzu. About Resolution, Part 1. <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/resol-1.html>. (2018-04-24)
16. Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT, Shan X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *J Anal Toxicol*. 2011;35(7):501-511.
17. Chromatography Online. Split Peaks — A Case Study. [http://www.chromatographyonline.com/split-peaks-case-study?id=&pageID=1&sk=&date=.](http://www.chromatographyonline.com/split-peaks-case-study?id=&pageID=1&sk=&date=) (2018-05-14)
18. QC-Net Bio-Rad. Liquichek™ Serum Volatiles Control Levels 1 and 2. http://myeinserts.qcnet.com/EI_customselection.aspx. (2018-05-17)
19. O'Neal CL, Wolf CE 2nd, Levine B, Kunsman G, Poklis A. Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Sci Int*. 1996;83(1):31-38.
20. Westland JL, Dorman FL. Comparison of SPME and static headspace analysis of blood alcohol concentration utilizing two novel chromatographic stationary phases. *Forensic Sci Int*. 2013;231(1-3):50-56.

Tabell 1. Jämförelse av kolonnerna Restek och Zebron med avseende på medelvärde och CV med referensvärden för respektive analyt och kontroll.

		Restek	Zebron		Restek	Zebron
		Medelvärde	Medelvärde	Ref ^a	CV	CV
		(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(%)	(%)
Hög alkoholkontroll	Metanol	22,53	22,71	25,1	3,9	4,2
	Etanol	30,25	30,30	31,1	3,0	1,8
	Isopropanol	12,45	12,75	13,2	3,8	1,5
	Aceton	11,92	13,39	13,9	6,4	4,1
Låg alkoholkontroll	Metanol	4,77	4,86	5,0	2,8	4,4
	Etanol	4,89	4,85	5,0	2,2	2,4
	Isopropanol	5,03	5,04	5,0	1,7	0,4
	Aceton	5,00	5,09	5,0	2,3	2,0
Glykolkontroll	Propylenglykol	9,98	9,50	10,0	10,0	6,0
	Etylenglykol	5,07	4,79	5,0	7,9	3,7

a) Referensvärde

Tabell 2. Medelvärde, SD, CV och referensvärden för alkoholkalibrator, hög och låg alkoholkontroll samt serumprover spetsade med metanol, etanol, isopropanol och aceton i olika koncentrationer, analyserade med Restek.

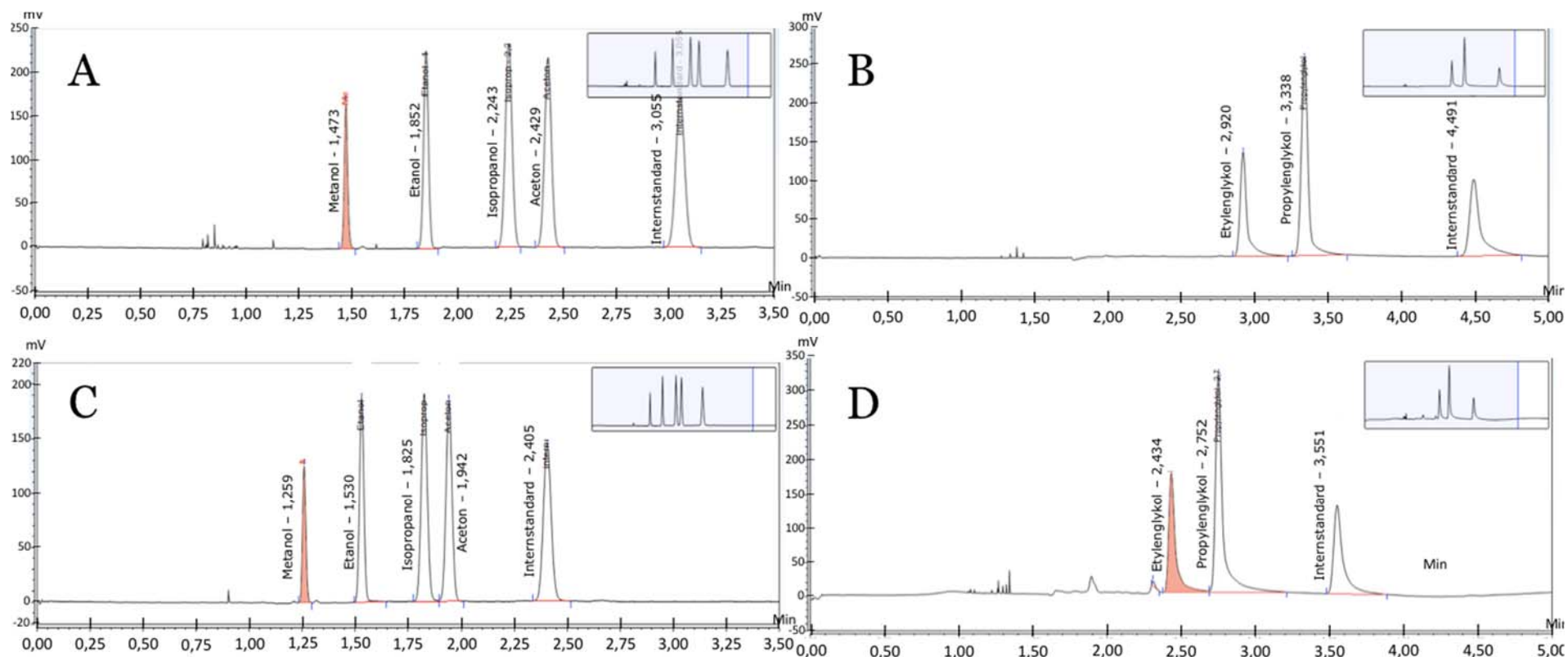
		Medelvärde (mmol/L)	Ref ^a (mmol/L)	SD	CV (%)	Antal
Alkoholkalibrator	Metanol	19,98	20,0	0,51	2,6	17
	Etanol	20,03	20,0	0,30	1,5	17
	Isopropanol	19,97	20,0	0,20	1,0	17
	Aceton	20,00	20,0	0,43	2,1	17
Hög alkoholkontroll	Metanol	23,40	25,1	1,15	4,9	12
	Etanol	31,29	31,1	1,19	3,8	12
	Isopropanol	12,87	13,2	0,43	3,4	12
	Aceton	13,00	13,9	0,74	5,7	12
Låg alkoholkontroll	Metanol	5,16	5,0	0,16	3,0	12
	Etanol	5,02	5,0	0,08	1,5	12
	Isopropanol	5,22	5,0	0,20	3,8	12
	Aceton	5,07	5,0	0,18	3,5	12
Metanolkoncentration (mmol/L)	1,5	1,57	1,5	0,10	6,4	6
	2,5	2,55	2,5	0,15	6,0	6
	50	48,24	50,0	2,06	4,3	6
	100	97,71	100,0	2,88	2,9	6
	190	198,80	190,0	9,35	4,7	6
Etanolkoncentration (mmol/L)	1,5	1,57	1,5	0,11	7,1	6
	2,5	2,48	2,5	0,07	2,9	6
	50	48,95	50,0	0,85	1,7	6
	100	97,84	100,0	1,77	1,8	6
	190	200,53	190,0	2,62	1,3	6
Isopropanolkoncentration (mmol/L)	1,5	1,46	1,5	0,01	1,0	6
	2,5	2,50	2,5	0,11	4,2	6
	50	49,69	50,0	0,71	1,4	6
	100	99,29	100,0	1,66	1,7	6
	190	202,42	190,0	1,49	0,7	6
Acetonkoncentration (mmol/L)	1,5	1,56	1,5	0,09	5,8	6
	2,5	2,51	2,5	0,17	6,6	6
	50	48,82	50,0	0,92	1,9	6
	100	97,69	100,0	2,45	2,5	6
	190	201,45	190,0	3,85	1,9	6

a) Referensvärde

Tabell 3. Medelvärde, SD, CV och referensvärden för glykolkalibrator, kontroller samt serumprover spetsade med etylenglykol och propylenglykol i olika koncentrationer, analyserade med Restek.

		Medelvärde (mmol/L)	Ref ^a (mmol/L)	SD	CV (%)	Antal
Kalibrator	Propylenglykol	19,74	20,0	2,27	11,5	17
	Etylenglykol	19,75	20,0	2,05	10,4	17
Kontroll	Propylenglykol	10,62	10,0	0,75	7,1	12
	Etylenglykol	4,83	5,0	0,32	6,7	12
Koncentration etylenglykol (mmol/L)	1,5	1,25	1,5	0,13	10,2	6
	2,5	2,36	2,5	0,29	12,2	6
	50	48,06	50,0	3,73	7,8	6
	90	87,49	90,0	3,97	4,5	6
Koncentration propylenglykol (mmol/L)	1,5	1,42	1,5	0,34	24,0	6
	2,5	2,15	2,5	0,14	6,7	6
	50	49,32	50,0	4,23	8,6	6
	90	85,26	90,0	4,45	5,2	6

a) Referensvärde



Figur 1. Kromatogram på kalibratorer med retentionstid angivet för respektive analyt. A) Alkoholkalibrator med Restek Rtx-BAC Plus 1. B) Glykolkalibrator med Restek Rtx-BAC Plus 1. C) Alkoholkalibrator med Zebron ZB-BAC1. D) Glykolkalibrator med Zebron ZB-BAC1.