

Détermination spectrophotométrique de l'éthanol dans le sang par FIA avec réacteur enzymatique couplé à un dialyseur = Spectrophotometric determination of ethanol in blood using a FIA system with an enzymatic reactor coupled to a dialyzer

Autor(en): **Maeder, Gabrielle / Pelletier, M. / Veuthey, J.L.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **81 (1990)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982613>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Détermination spectrophotométrique de l'éthanol dans le sang par FIA avec réacteur enzymatique couplé à un dialyseur*

Spectrophotometric Determination of Ethanol in Blood
Using a FIA System with an Enzymatic Reactor Coupled to a Dialyzer

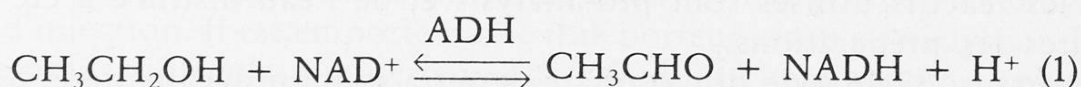
Gabrielle Maeder, M. Pelletier, J. L. Veuthey et W. Haerdi
Département de chimie minérale, analytique et appliquée,
Université de Genève, Genève

Introduction

La détermination de l'éthanol dans le sang est une des analyses les plus fréquemment pratiquées dans les laboratoires de toxicologie clinique. Les méthodes les plus couramment utilisées à ce jour sont:

- la chromatographie en phase gazeuse dite de l'«espace de tête» (Head space) (1, 2);
- la chromatographie en phase gazeuse par injection directe (1);
- la méthode enzymatique en mode discontinu («batch») (3–5).

Cette dernière se base sur le principe suivant: l'alcool déshydrogénase (ADH) catalyse la réaction d'oxydation de l'éthanol par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD⁺) en éthanal selon la réaction (1).



L'adjonction de semicarbazide, en réagissant avec l'éthanal formé, déplace l'équilibre vers la droite ce qui rend la réaction quantitative. Cette méthode présente cependant un certain nombre d'inconvénients. En effet, l'enzyme dissoute ne peut pas être utilisée à plusieurs reprises. Ainsi, le coût de l'analyse est élevé. De plus, la préparation de l'échantillon ainsi que le temps de réaction (45 min à 37 °C) sont très longs.

Le prix élevé des enzymes a conduit au développement des techniques d'immobilisation (6) permettant l'utilisation répétée du catalyseur pour l'analyse d'un

* En hommage au Professeur A. Buchs (Université de Genève) à l'occasion de ses 60 ans.

grand nombre d'échantillons. Le coût de l'analyse est ainsi diminué. Afin que l'analyse soit rapide et puisse être facilement automatisée, la FIA (flow injection analysis) est utilisée.

L'étendue des applications de la FIA avec enzymes immobilisées a été décrite dans la littérature, parmi lesquelles la détermination du glucose et de l'urée (7), du cholestérol (8) et de l'éthanol (9). Des détecteurs fluorimétriques, ampérométriques (10) et spectrophotométriques (9) ont été utilisés pour la détermination de l'éthanol dans le sang ou le sérum. Cependant, la détermination spectrophotométrique de l'éthanol dans le sang ne peut pas s'effectuer directement par mesure, à 340 nm, du NADH formé au cours de la réaction (1). En effet, l'hémoglobine absorbe à cette longueur d'onde. Ainsi, un prétraitement de l'échantillon, à savoir la précipitation des protéines, par exemple, avec de l'acide perchlorique, est nécessaire. Toutefois, cette manipulation peut être évitée. Afin d'éliminer l'hémoglobine ou d'autres protéines, un dialyseur peut être intégré au système FIA. Ainsi, avec une membrane molaire de 15 kD, par exemple, toutes les molécules interférantes seront retenues alors que les molécules à détecter seront percolées au travers de la membrane.

Dans cette étude, nous avons intégré un dialyseur à un système FIA pour l'analyse de l'éthanol dans le sang et nous avons étudié l'influence de divers paramètres (débit du flux porteur, température du réacteur et volume d'injection) sur le profil du diagramme. Une fois les conditions optimales choisies, nous avons testé la linéarité de la réponse. Nous avons également analysé les interférences dues aux alcools aliphatiques supérieurs. Afin de connaître la validité de notre méthode, nous l'avons comparée aux méthodes d'analyse précitées.

Mode expérimental

Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont pro-analysis et de l'eau distillée a été utilisée pour toutes les préparations.

- Flux porteur: 33,46 g de diphosphate de tetra-sodium décahydraté; 8,03 g de chlorhydrate de semicarbazide; 1,57 g de glycine; 8,75 g de chlorure de sodium et 0,8 g de NAD sont dissous dans de l'eau distillée et complétés à 1 l après avoir ajusté le pH à 9,0 avec du NaOH 1 mol·l⁻¹. La solution est filtrée à travers une membrane de 0,45 µm (Schleicher and Schuell).
- Solution étalon: solution aqueuse d'éthanol Merck en ampoule 1 g·l⁻¹.
- Standards: préparés à partir de la solution étalon par dilution avec le flux porteur.
- Les échantillons de sang ont été obtenus de l'Institut de médecine légale à Genève. Ces échantillons sont dilués cent fois avec le flux porteur.
- L'alcool déshydrogénase Sigma et du verre à porosité contrôlée (CPG-02000, 80–120 mesh) (Electro Nucleonics, Fairfield, NY, USA) ont été utilisés.

Appareillage

La configuration du système utilisé pour cette étude est représentée sur la figure 1. Le système est constitué d'une pompe péristaltique Gilson Minipuls 3, d'une vanne d'injection Reodyne 5020 avec une boucle d'injection de 110 μl , d'un dialyseur Gilson (100 μl), d'un réacteur cylindrique en plexiglass contenant l'enzyme greffée et d'un détecteur spectrophotométrique SSI-500 équipé d'une cellule à flux continu de 6 mm de longueur et d'un volume de 9 μl , couplé à un intégrateur HP 3390 A.

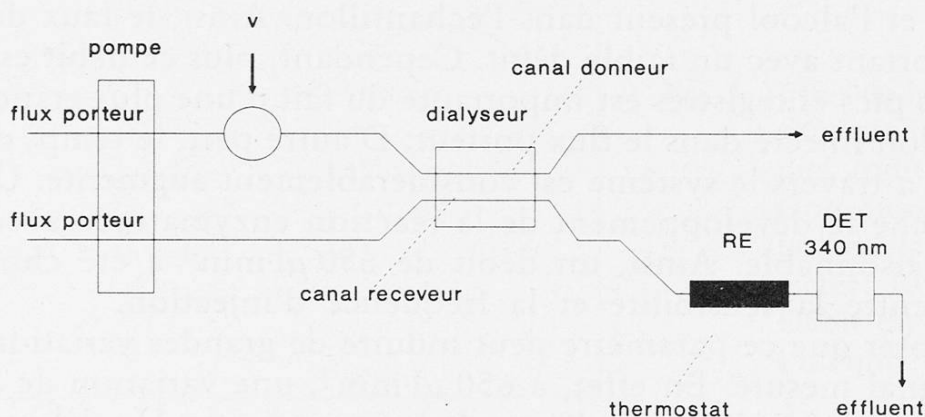


Fig. 1. Configuration du système FIA utilisé pour la détermination de l'éthanol dans le sang, RE = réacteur enzymatique, V = vanne d'injection

Le dialyseur est constitué d'une membrane en Cuprophane, ayant un seuil de 15 kD, placé entre deux blocs de plexiglass. Le réacteur (d.i 1,5 mm; 7,5 cm de long) est rempli de verre à porosité contrôlée sur lequel l'enzyme a été préalablement immobilisée (9). La phase est maintenue en place à l'aide d'un tamis de nylon (100 microns) placé de chaque côté du réacteur.

Procédure

L'échantillon à analyser est introduit dans le flux porteur au moyen d'une boucle d'injection. Il est emporté par le flux porteur jusqu'au dialyseur. Les molécules de poids moléculaire supérieur à 15 000, dont l'hémoglobine, sont retenues, les autres passent à travers la membrane. Le flux porteur les transporte jusqu'au réacteur où la réaction (1) a lieu. Le NADH formé au cours de la réaction est détecté à 340 nm.

Résultats et discussion

Etude de l'influence de divers paramètres

Le débit du flux porteur, la température du réacteur ainsi que le volume injecté sont des paramètres influençant le profil du pic obtenu. Nous avons donc étu-

dié l'influence de ces paramètres afin d'obtenir les conditions optimales pour la détermination de l'éthanol dans le sang.

Débit

La figure 2 représente en ordonnée la hauteur mesurée du pic en fonction du débit du flux porteur, le débit dans les deux canaux étant identique. Nous pouvons constater que plus le débit diminue, plus la hauteur des pics augmente. Cela s'explique simplement par une augmentation du temps de contact entre l'enzyme immobilisée et l'alcool présent dans l'échantillon. Ainsi, le taux de conversion est plus important avec un faible débit. Cependant, plus ce débit est faible, plus la largeur des pics enregistrés est importante du fait d'une plus grande dispersion de l'échantillon injecté dans le flux porteur. D'autre part, le temps de passage de l'échantillon à travers le système est considérablement augmenté. Un débit trop rapide empêche le développement de la réaction enzymatique avec un taux de conversion raisonnable. Ainsi, un débit de $650 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a été choisi. C'est un compromis entre la sensibilité et la fréquence d'injection.

Il est à noter que ce paramètre peut induire de grandes variations quant à la valeur du signal mesuré. En effet, à $650 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, une variation de $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ du débit provoque une variation de 1% sur la hauteur du pic. Un débit extrêmement constant est donc nécessaire afin que la reproductibilité soit bonne.

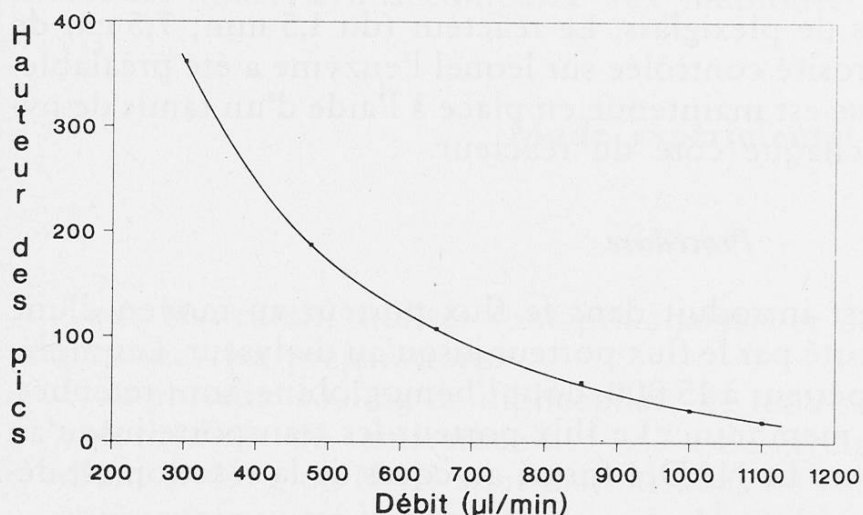


Fig. 2. Influence du débit ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) sur la hauteur des pics (unité arbitraire)

Concentration en éthanol de la solution injectée: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Température du réacteur: 25°C

Température

Toute réaction enzymatique est fonction de la température. Nous avons donc représenté sur la figure 3 la hauteur du pic en fonction de la température avec la configuration du système FIA représentée sur la figure 4. Nous constatons une augmentation de la hauteur du pic jusqu'à 40°C , puis une brusque diminution due à la dénaturation de la protéine. Ainsi, la sensibilité maximale serait obtenue

à 40 °C. Cependant, nous avons choisi une température de 25 °C, température à laquelle la sensibilité est suffisante et la durée de vie du réacteur prolongée.

Comme pour le débit, la hauteur du pic est sensible à une faible variation de la température. Ainsi une variation de 0,1 °C à 25 °C produit une variation sur la hauteur du signal de 1%. Il est donc indispensable d'utiliser une enceinte thermostatée autour du réacteur.

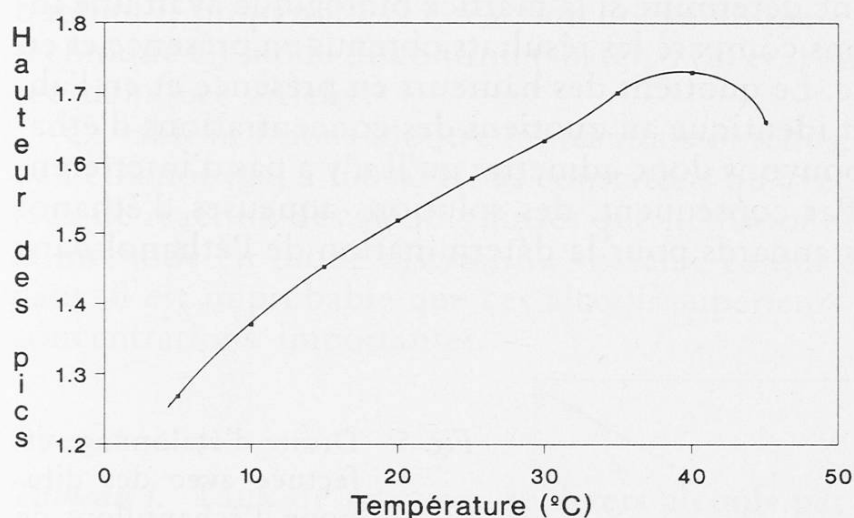


Fig. 3. Effet de la température (°C) sur la hauteur des pics (unité arbitraire) Concentration en éthanol de la solution injectée: $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Débit du flux porteur: $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

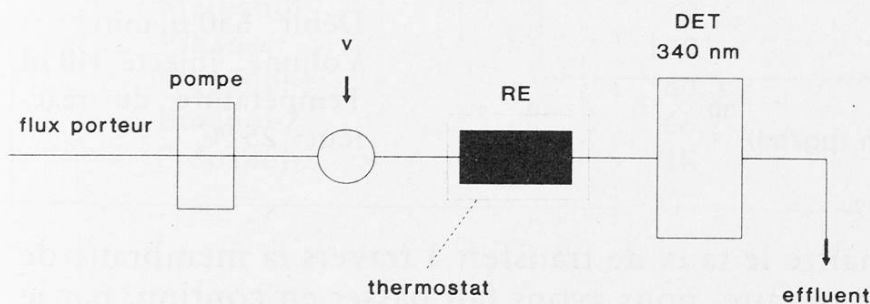


Fig. 4. Configuration du système FIA utilisé pour étudier l'effet de la température ainsi que pour la détermination du taux de conversion du réacteur

Volume d'injection

En ce qui concerne le volume d'injection, nous avons choisi un volume de $110 \mu\text{l}$ qui est un compromis entre la sensibilité, la largeur des pics et la fréquence d'injection. En effet, une augmentation du volume d'injection implique une plus grande quantité d'éthanol dans le réacteur. Cette dernière n'affecte pas la largeur du pic à mi-hauteur, mais uniquement la hauteur. Cependant, le volume affecte la largeur des pics. Un autre désavantage des grands volumes est la diminution de la fréquence d'injection due à une durée d'analyse plus grande en raison de l'élargissement des pics.

Droite d'étalonnage

La linéarité de la réponse du spectrophotomètre a été vérifiée au moyen de sept dilutions (100 fois) d'échantillons de sang de concentration en éthanol comprise entre 0,3 à 4 g pour 1000 g de sang, avant dilution. Nous avons porté en ordonnées la hauteur des pics en fonction des concentrations respectives d'éthanol. La figure 5 représente cette droite dont le coefficient de régression est de 0,9997.

Cependant, il est peu commode d'utiliser des sangs standards, étant donné leur coût élevé. Nous avons donc déterminé si la matrice biologique avait une influence. Pour ce faire, nous avons comparé les résultats obtenus en présence et en l'absence de matrice biologique. Le quotient des hauteurs en présence et en l'absence de matrice biologique est identique au quotient des concentrations d'éthanol de ces échantillons. Nous pouvons donc admettre qu'il n'y a pas d'interférences dues à l'effet de matrice. Par conséquent, des solutions aqueuses d'éthanol peuvent être utilisées comme standards pour la détermination de l'éthanol dans le sang.

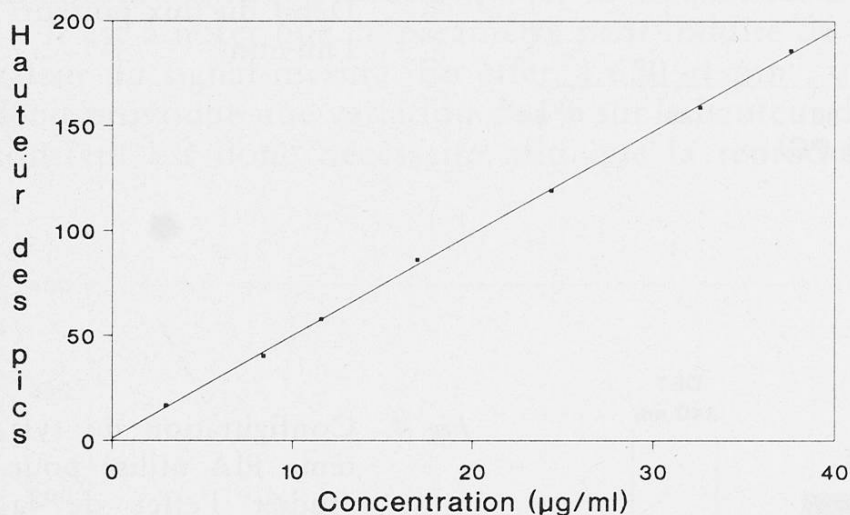


Fig. 5. Droite d'étalonnage effectuée avec des dilutions d'échantillons de sang. Ces dilutions (100 fois) ont des concentrations en éthanol comprise entre 3–40 µg·ml
Débit: 650 µl·min⁻¹
Volume: injecté 110 µl
Température du réacteur: 25 °C

Il était intéressant de connaître le taux de transfert à travers la membrane de Cuprophan du dialyseur. Pour ce faire, nous avons fait passer en continu, par le canal donneur du dialyseur, une solution d'éthanol. Nous avons analysé, par GC, la concentration en éthanol à l'entrée du canal donneur et à la sortie du canal receveur. Le rapport de ces deux concentrations nous donne le taux de transfert qui est dans nos conditions de 13,6%.

Le taux de conversion du réacteur a également été étudié avec l'appareillage de la figure 4. Nous avons injecté une solution de NADH d'une part et d'EtOH d'autre part, de concentration connue. La hauteur du pic enregistré pour la solution de NADH nous permet de calculer la «hauteur théorique» si l'éthanol réagissait à 100%. Le quotient de la «hauteur pratique» mesurée pour l'éthanol par la «hauteur théorique» nous donne le taux de conversion. Ainsi, nous avons trouvé 17% de conversion.

Etude des interférences dues aux alcools supérieurs

L'alcool déshydrogénase est une enzyme de faible spécificité. Elle oxyde certains alcools aliphatiques supérieurs en leurs aldéhydes ou cétones correspondantes. Cependant, la vitesse de réaction de ces derniers est plus lente que celle de l'éthanol.

Afin d'étudier ces interférences, nous avons préparé différents échantillons aqueux ne contenant qu'un des alcools suivants: méthanol, éthanol, propanol-1, butanol-1, propanol-2. La réaction enzymatique a été effectuée d'une part par la technique en mode discontinu («batch») (2) et d'autre part par la méthode proposée dans cet article.

Le tableau 1 nous montre les résultats obtenus, en prenant le taux de réaction de l'éthanol égal à 100%. Nous constatons qu'avec la méthode proposée (FIA), le taux de réaction des alcools autres que l'éthanol est beaucoup plus faible qu'avec la méthode en mode discontinu «batch», ce qui est un grand avantage. Cependant, il est improbable que ces alcools supérieurs se trouvent dans le sang à des concentrations importantes.

Tableau 1. Taux de réaction de divers alcools par FIA et méthode enzymatique en mode discontinu

Alcool	Taux de réaction (%)	
	«Batch»	«FIA»
Méthanol	0	0
Ethanol	100	100
Propanol-1	80,5	24
Butanol-2	66,2	6
Propanol-2	18	0

Comparaison de quatre méthodes de dosage

Le tableau 2 résume les résultats obtenus dans nos laboratoires en appliquant la méthode enzymatique en mode discontinu («batch») (2), la chromatographie en phase gazeuse par injection directe et par «head space» et la FIA décrite dans ce travail. Les concordances sont bonnes. Pour confirmation, nous avons effectué un test de τ permettant de vérifier s'il y a une différence significative entre les résultats obtenus par FIA et ceux obtenus par la méthode enzymatique en mode discontinu d'une part et avec la moyenne des résultats des deux chromatographies d'autre part.

Nous avons calculé τ au moyen de l'équation suivante:

$$\tau = \frac{\bar{D}}{S_{(n-1)}} \cdot \sqrt{n}$$

\bar{D} = moyenne des différences (D) entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

$S_{(n-1)}$ = écart-type des différences (D).

n = nombre d'échantillons.

On sait que le τ théorique pour 4 degrés de liberté ($n - 1$) et 95% de probabilité est égal à 2,78.

Les τ pratiques calculés sont:

1) FIA - GC: 1.17

2) FIA - Batch: 1.29

Les valeurs de τ pratiques obtenues sont nettement inférieures au τ théorique, ce qui permet de conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus par les trois méthodes.

Afin de déterminer la reproductibilité des injections, nous avons injecté chaque sang cinq fois nous permettant de calculer le coefficient de variation (voir tableau 2).

Tableau 2. Résultats obtenus par quatre méthodes pour la détermination de l'éthanol dans le sang

Sang No	FIA		Méthode enzymatique en «batch»		GC injection directe		GC «Head space»	
	‰ a)	CV (%) b)	‰	CV (%)	‰	CV (%)	‰	CV (%)
1	1,59	1	1,49	4,3	1,56	0,40	1,54	0,56
2	2,64	1,6	2,48	1,96	2,57	0,65	2,64	0,35
3	3,22	0,59	3,26	2,85	3,22	0,36	3,29	0,52
4	1,91	0,81	1,93	1,34	1,87	0,72	1,94	0,49
5	0,78	1,43	0,74	5,04	0,74	1,21	0,74	0,54

a) g d'éthanol pour 1000 g de sang

b) CV = coefficient de variation

On constate que les résultats obtenus par FIA sont tout à fait comparables aux autres méthodes et que la reproductibilité des injections est très satisfaisante.

Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'éthanol dans le sang peut être déterminé spectrophotométriquement avec une bonne précision sans prétraitement, en utilisant un système FIA avec un dialyseur.

La comparaison avec d'autres méthodes montre la bonne concordance des résultats. Cette méthode serait donc applicable pour l'analyse de l'éthanol dans le sang. Du fait que légalement, une analyse d'alcoolémie doit être effectuée par deux méthodes différentes, cette technique «FIA-dialyseur» peut être introduite comme méthode complémentaire à l'analyse GC traditionnelle.

Résumé

Une nouvelle technique pour la détermination de l'éthanol dans le sang, utilisant la FIA couplée à un réacteur enzymatique et à un dialyseur est décrite. Les conditions optimales de travail sont étudiées.

De plus, les résultats obtenus par la méthode proposée ont été comparés à ceux obtenus par GC et par la méthode enzymatique en mode discontinu, montrant la bonne concordance des résultats.

Zusammenfassung

Hier wird eine neue Technik zur Bestimmung von Ethanol im Blut beschrieben, welche die FIA mit einem enzymatischen Reaktor und einem Dialysator verbindet. Die optimalen Arbeitsbedingungen wurden erforscht.

Ausserdem wurden die mit der vorgeschlagenen Methode erzielten Ergebnisse mit den durch GC und der enzymatischen Methode erhaltenen verglichen, was die gute Konkordanz der Resultate bestätigt.

Summary

A novel technic for the determination of alcohol in blood using FIA with an immobilized enzyme reactor coupled to an on-line dialyzer is described. The optimal working conditions are studied.

Moreover, the results obtained by the proposed method have been compared to those obtained by GC and batch enzymatic method which confirms a good agreement between the results.

Bibliographie

1. *Jain, N. C. and Cravey, R. H.*: Analysis of alcohol. II. A review of gas chromatographic methods. *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 263–267 (1972).
2. *Martin, M., Pelletier, M. et Haerdi, W.*: Contributions au dosage de l'éthanol dans le sang. II. Amélioration de la méthode chromatographique en phase gazeuse dite de l'«espace de tête» (Head space). *Trav. chim. aliment. hyg.* **72**, 194–215 (1981).
3. *Jones, D., Gerber, L. P. and Drell, W.*: A rapid enzymatic method for estimating ethanol in body fluids. *Clin. Chem.* **16**, 402–407 (1970).

4. *Bonnichsen, R. K. and Theorell, H.*: An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **3**, 58–62 (1951).
5. Alcohol in blood. Biochemical test combination. Feuille d'information Boehringer GmbH, Mannheim 1973.
6. *Carr, P. W. and Bowers, L. D.*: Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Wiley-Interscience, New York 1980.
7. *Gorton, L. and Ögren, L.*: Flow injection analysis for glucose and urea with enzyme reactors and on-line dialysis. *Anal. Chim. Acta* **130**, 45–53 (1981).
8. *Mascom, M. and Townshend, A.*: Determination of cholesterol by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase. *Anal. Chim. Acta* **174**, 293–297 (1985).
9. *Ruz, J., Luque de Castro, M. D. and Valcarcel, M.*: Flow injection analysis. Use of immobilized enzymes for the determination of ethanol in serum. *Analyst.* **112**, 259–261 (1987).
10. *Ruz, J., Luque de Castro, M. D. and Valcarcel, M.*: Flow injection determination of ethanol in whole blood using immobilized enzymes. *Microchem. J.* **36**, 316–322 (1987).

Gabrielle Maeder

Dr M. Pelletier

Dr J. L. Veuthey

Prof. W. Haerdi

Département de Chimie minérale, analytique et appliquée
de l'Université de Genève

Sciences II

30, Quai Ernest-Ansermet

CH-1211 Genève 4