

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

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 72 (1981)

**Heft:** 2

**Artikel:** Contributions au dosage de l'éthanol dans le sang = Aspects to the analysis of ethanol in blood

**Autor:** Pelletier, M. / Martin, M. / Haerdi, W.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-984614>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 18.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Contributions au dosage de l'éthanol dans le sang\*

### I. Etude de la méthode enzymatique et chromatographique en phase gazeuse et étude de la conservation des échantillons sanguins

Aspects to the Analysis of Ethanol in Blood

#### I. Enzymatic and Gas Chromatographic Methods of Analysis and the Storage of Blood Samples

*M. Pelletier, M. Martin et W. Haerdi*

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

### Introduction

Le dosage de l'éthanol dans le sang, en cas de contrôles effectués sur des conducteurs automobiles, exige une très grande précision et une très grande exactitude. En outre, l'analyse doit être simple et rapide.

Les méthodes anciennes basées sur l'oxydation de l'éthanol par le dichromate de potassium, après distillation de l'échantillon, suivie d'un titrage (1) ou d'une mesure colorimétrique (2) ne sont pratiquement plus utilisées. Elles sont remplacées par des méthodes modernes: dosage enzymatique (3, 4), chromatographie en phase gazeuse par injection directe (5) ou par la technique de l'«espace de tête» (5, 6) qui sont à la fois plus simples de manipulation, plus rapides et surtout plus sélectives.

Dans cette contribution, nous décrivons les méthodes de chromatographie par injection directe et enzymatique, telles que nous les utilisons actuellement dans notre laboratoire, en faisant ressortir l'importance de certains paramètres et la précision qu'il est possible d'atteindre avec notre mode opératoire.

La technique de l'«espace de tête» est décrite dans une deuxième contribution (6).

Etant donné l'importance que revêt légalement la détermination de l'alcoolémie sanguine, il est très important que les échantillons de sang puissent être conservés durant une période relativement longue sans altération de la teneur en alcool éthylique afin de pouvoir effectuer une contre-expertise éventuelle. Nous avons donc étudié, dans la deuxième partie de ce travail, si, dans nos conditions de conservation des échantillons, il est possible de mesurer une variation de la teneur en éthanol au cours du temps.

\* Dédié au Prof. D. Monnier à l'occasion des 25 ans d'existence du Laboratoire d'alcoolémie sanguine du canton de Genève.

## Etude analytique

### *Chromatographie en phase gazeuse*

#### *Appareillage et réactifs*

Les conditions générales sont celles proposées par *Brandenberger* (5).

Chromatographe	Hewlett-Packard 5720A
Détecteur	ionisation de flamme (DIF)
Colonne	2 m x 3 mm, phase stationnaire: Porapak Q, 100-120 mesh
Températures	— colonne: 170 °C — injecteur: 150 °C — détecteur: 250 °C
Phase mobile	azote (gaz porteur) 40 ml/min
Intégrateur	Hewlett-Packard 3380A
Réactifs	— solution aqueuse étalon d'éthanol Merck en ampoule prête à l'emploi — solution de n-propanol p. a. Merck: 300 µl/l d'eau

#### *Mode opératoire*

*Étalons:* dans un tube (1,5 ml) on pèse environ 1 ml de la solution de n-propanol, puis on ajoute, toujours en pesant, 0,1 ml de la solution étalon d'éthanol. Après mélange sur un «vibro-mixer», on injecte 1 µl de cette solution dans le chromatographe.

*Echantillons:* on procède exactement de la même manière que pour les étalons en pesant 0,1 ml de l'échantillon de sang à analyser au lieu de 0,1 ml de solution étalon éthanol. Dans les conditions décrites, la linéarité est tout à fait satisfaisante entre 0,1‰ et plus de 4‰. Un seul étalon est suffisant pour calibrer l'intégrateur (nous utilisons une solution à 2‰).

#### *Détermination de la précision*

Nous avons effectué deux séries de 10 mesures, chaque série étant effectuée sur le même échantillon de sang (voir tableau 1). Tous les résultats sont exprimés en ‰ (g d'éthanol par kg de sang).

On constate que l'on obtient une précision très satisfaisante. Cependant, pour pouvoir atteindre une telle précision, il est indispensable de peser le volume d'échantillon et d'étalon interne introduits. En effet, la reproductibilité des micro-pipettes n'est absolument pas suffisante pour ce type d'analyse. Ceci est dû aux différences de viscosité d'un sang à l'autre, d'une part, et entre les sangs et les solutions étalons aqueuses d'autre part.

Par exemple, dans les deux séries ci-dessus, si l'on ne pèse ni l'échantillon ni l'étalon interne mais ne se fie qu'au volume des micro-pipettes, on obtient les valeurs statistiques indiquées entre parenthèses ( ) dans le tableau 1.

Tableau 1. Résultats de deux séries de 10 analyses par chromatographie en phase gazeuse

Séries	Résultats en ‰ (g/kg)	Statistique		
		Valeur moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
Sang No 1	1,989–2,007–2,009 2,014–2,015–2,016 2,017–2,005–2,015 2,014	2,010 (2,102)	0,008 (0,080)	0,42 (3,8)
Sang No 2	0,771–0,768–0,768 0,774–0,765–0,769 0,772–0,772–0,769 0,766	0,769 (0,768)	0,003 (0,020)	0,37 (2,67)

( ) Valeurs obtenues en se basant sur les volumes au lieu des masses.

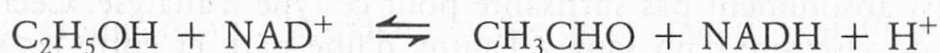
### Remarques

- L'utilisation d'un étalon interne est indispensable, la reproductibilité des seringues d'injection étant tout à fait insuffisante pour la précision exigée. Le n-propanol, en tant qu'étalon interne, convient bien mais il est aussi possible d'utiliser d'autres substances en particulier le propionitrile.
- A partir des masses de l'échantillon et de la solution d'étalon interne, on calcule des facteurs correctifs qui sont introduits directement dans l'intégrateur. La figure 1 est un exemple d'analyse.

### Dosage enzymatique

#### Principe

La méthode que nous utilisons est une adaptation de celle de la maison Boehringer (3, 4). L'alcool déshydrogénase (ADH) catalyse la réaction d'oxydation de l'éthanol par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) en éthanal:



L'absorption dans l'UV du NADH formé est plus forte que celle du NAD<sup>+</sup>. L'adjonction de semicarbazide, en réagissant avec l'éthanal formé, déplace l'équilibre vers la droite ce qui rend la réaction quantitative.

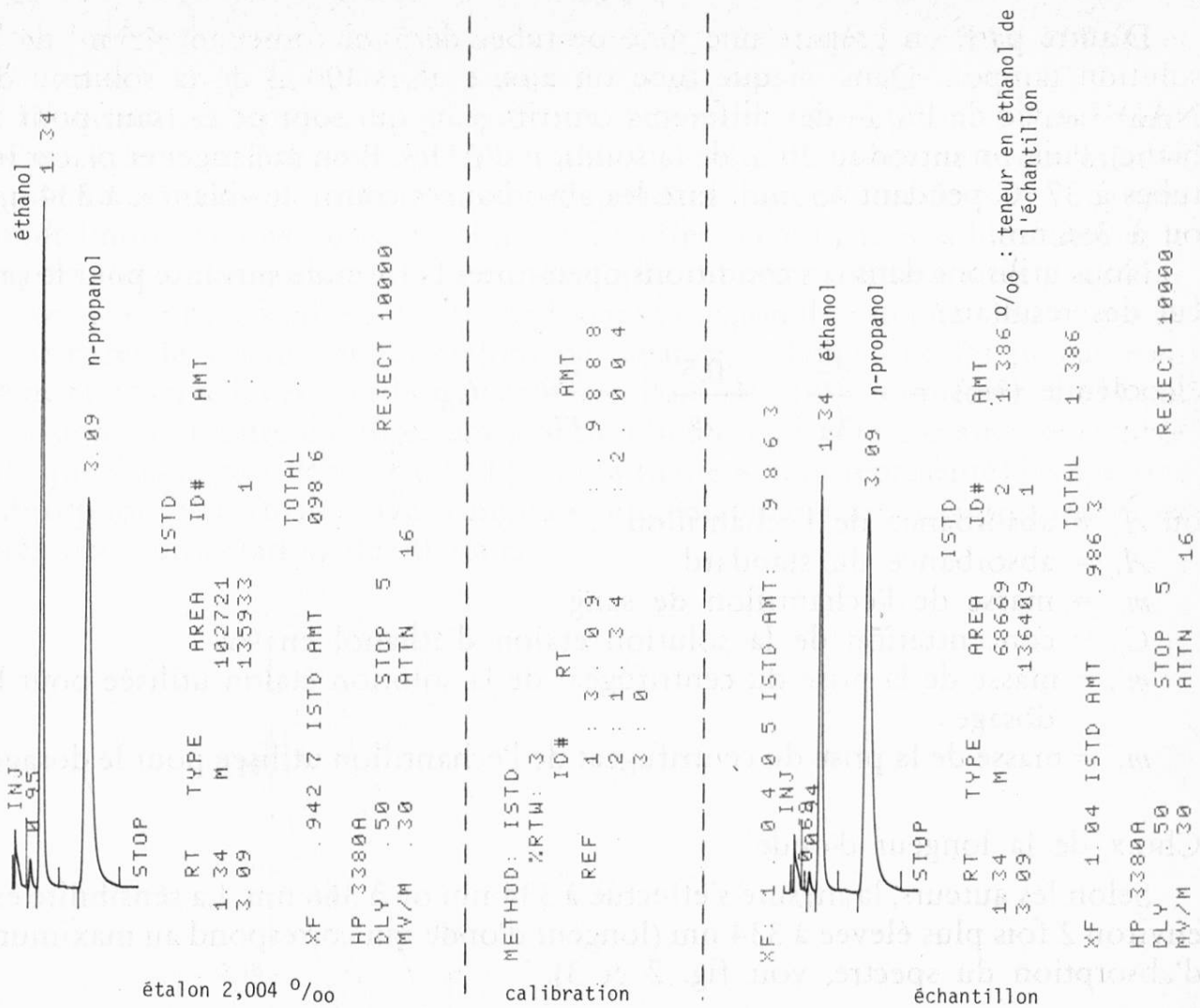


Fig. 1. Exemple de chromatogramme

### Appareillage et réactifs

- Spectrophotomètre Eppendorf avec filtre 334 nm ou 366 nm
- Solution  $\text{NAD}^+$  Merck: 16 mg/ml
- Solution ADH Merck (180 U/mg): 30 mg/ml
- Solution tampon: pour 1 litre, pyrophosphate de sodium p. a. Merck 33,2 g, glycolle p. a. Merck 1,6 g, semicarbazide p. a. Merck 8,4 g, hydroxyde de sodium p. a. Merck 2,1 g.
- Ampoule solution étalon d'éthanol Merck
- Acide perchlorique p. a. Merck 0,33 M

### Mode opératoire

Dans des tubes à centrifuger (10 ml) on introduit 9 ml d'acide perchlorique 0,33 M puis respectivement 0,5 ml d'eau ou 0,5 ml de la solution étalon d'éthanol ou 0,5 ml de l'échantillon de sang à analyser. La solution étalon et le sang sont pesés. Bien mélanger les solutions et centrifuger.

D'autre part, on prépare une série de tubes de 5 ml contenant 4,5 ml de la solution tampon. Dans chaque tube on ajoute alors 100  $\mu$ l de la solution de NAD<sup>+</sup> suivie de 100  $\mu$ l des différents centrifugeats qui sont pesés (sauf pour le blanc). Puis, on introduit 20  $\mu$ l de la solution d'ADH. Bien mélanger et placer les tubes à 37 °C pendant 45 min. Lire les absorbances contre le « blanc », à 334 nm ou à 366 nm.

Nous utilisons dans ces conditions opératoires la formule suivante pour le calcul des résultats:

$$\text{alcoolémie (\%)} = \frac{A_x}{A_{st}} \cdot \frac{0,5}{m} \cdot \frac{m_{st}}{m_x} \cdot C_{st}$$

où  $A_x$  = absorbance de l'échantillon

$A_{st}$  = absorbance du standard

$m$  = masse de l'échantillon de sang

$C_{st}$  = concentration de la solution étalon d'éthanol en ‰

$m_{st}$  = masse de la prise du centrifugeat de la solution étalon utilisée pour le dosage

$m_x$  = masse de la prise du centrifugeat de l'échantillon utilisée pour le dosage.

### Choix de la longueur d'onde

Selon les auteurs, la mesure s'effectue à 334 nm ou à 366 nm. La sensibilité est environ 2 fois plus élevée à 334 nm (longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption du spectre, voir fig. 2 et 3).

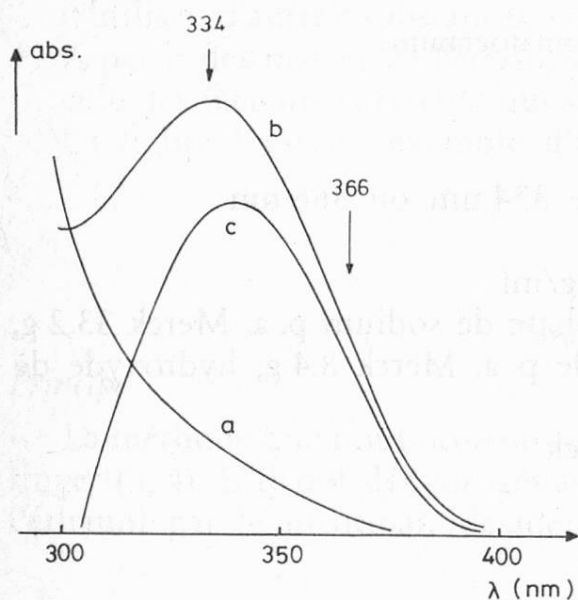


Fig. 2. Spectre d'absorption avec tungstate comme déprotéinisant  
a = blanc  
b = échantillon  
c = échantillon/blanc

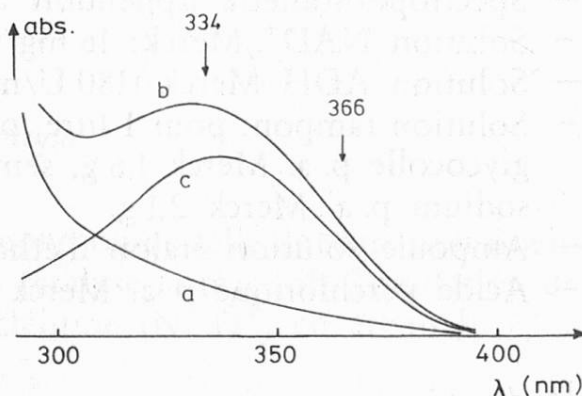


Fig. 3. Spectre d'absorption avec HClO<sub>4</sub> comme déprotéinisant  
a = blanc  
b = échantillon  
c = échantillon/blanc

Les coefficients d'extinctions molaires valent  $5590 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à  $334 \text{ nm}$  et  $3090 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à  $366 \text{ nm}$  dans nos conditions.

D'une part, le fait que l'on se trouve au maximum d'absorption et d'autre part que les valeurs de l'absorbance soient plus élevées pour la même concentration augmente la précision de la méthode. Cependant, l'utilisation de cette longueur d'onde limite le choix du déprotéinisant. En effet, il n'est pas possible d'utiliser le tungstate de sodium dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  par exemple, car cette solution n'est pas stable et, avec le temps, elle absorbe fortement dans la région de  $336 \text{ nm}$ . Cela empêche de préparer le «blanc» et les étalons par avance, il faut donc les préparer en même temps que les échantillons à analyser. Pour effectuer des mesures à  $334 \text{ nm}$  il est donc nécessaire d'utiliser une solution déprotéinisante parfaitement stable telle que l'acide perchlorique  $0,33 \text{ M}$ . Sur la figure 4, sont représentés les spectres d'absorption d'un «blanc» avec tungstate immédiatement après sa préparation et après une conservation de 10 jours.

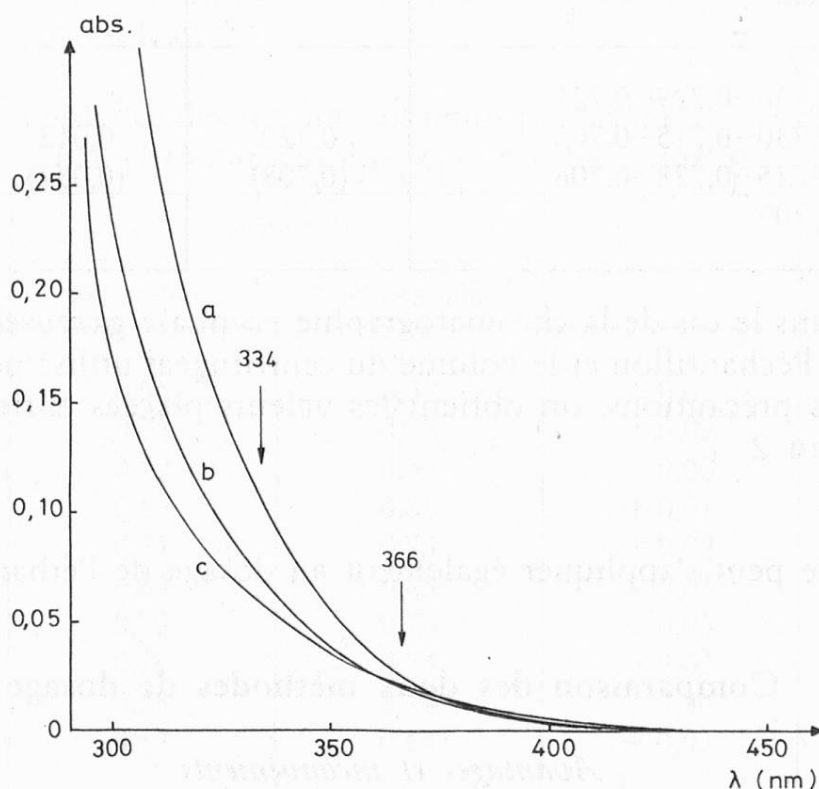


Fig. 4. Spectre d'absorption de divers blancs

a = blanc avec tungstate conservé 10 jours

b = blanc avec tungstate fraîchement préparé

c = blanc avec  $\text{HClO}_4$

En effectuant les mesures à  $366 \text{ nm}$ , ce problème ne se pose pas car les «blancs» n'absorbent pratiquement pas à cette longueur d'onde.

L'augmentation de la sensibilité à  $334 \text{ nm}$  augmentant la précision des analyses, spécialement pour les faibles alcoolémies, nous avons donc adopté cette longueur d'onde pour nos analyses de routine.

### Détermination de la précision

Ici, aussi, nous avons effectué 2 séries de 10 mesures, chaque série étant effectuée sur le même échantillon de sang. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2. Résultats de deux séries de 10 analyses par la méthode enzymatique

Séries	Résultats en ‰ (g/kg)	Statistique		
		Valeur moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
Sang No 1	2,040—2,030—2,040 2,010—2,031—2,024 2,001—2,007—2,005 2,021	2,020 (2,016)	0,014 (0,032)	0,72 (1,60)
Sang No 2	0,736—0,729—0,721 0,730—0,715—0,705 0,725—0,728—0,706 0,705	0,720 (0,708)	0,012 (0,032)	1,60 (3,78)

Comme dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse, il est indispensable de peser l'échantillon et le volume du centrifugeat utilisé pour le dosage. Si on néglige ces précautions, on obtient les valeurs placées entre parenthèses ( ) dans le tableau 2

#### Remarque

Cette méthode peut s'appliquer également au dosage de l'éthanol dans l'urine.

### Comparaison des deux méthodes de dosage

#### *Avantages et inconvénients*

Sur la base des techniques décrites et des résultats obtenus (voir tableaux 1 et 2), nous pouvons constater que les deux méthodes permettent d'obtenir une bonne précision et sont d'une exécution simple permettant de les appliquer sans difficulté aux analyses faites en séries même pour un grand nombre d'échantillons. La chromatographie en phase gazeuse présente l'avantage de pouvoir obtenir un résultat après 15 min déjà. Mais, pour un grand nombre d'échantillons, la méthode enzymatique est un peu plus rapide car tous les échantillons peuvent être traités simultanément.

A notre point de vue, la chromatographie en phase gazeuse est la méthode qui présente la plus grande sécurité, toutes les perturbations ou interférences pouvant être facilement décelées par examen du chromatogramme. L'inconvénient



de la méthode enzymatique réside dans la difficulté de connaître l'origine d'une perturbation éventuelle (par exemple, perte d'activité de l'enzyme, décomposition de la solution tampon) bien que dans nos conditions de travail, une telle éventualité ne se produise pratiquement jamais. La précision de la méthode enzymatique est un peu moins bonne en raison des plus nombreuses manipulations qu'elle exige.

### Concordance des résultats d'analyses

Nous avons choisi au hasard 10 analyses parmi celles que nous avons effectuées, en série, durant l'année 1980, au moyen des deux méthodes décrites ci-dessus. Avec les résultats obtenus, nous avons effectué un test de  $t$  (comparaison des moyennes des écarts selon Student) afin de déterminer s'il y a une différence significative entre elles (hypothèse: moyenne des écarts = 0). Les valeurs sont consignées dans le tableau 3.

Tableau 3. Concordance des résultats obtenus par les méthodes enzymatiques et par chromatographie par injection directe

Echantillon* No	%o Ethanol		$D$	Données statistiques
	Enzymatique	Chromatographique		
1	0,55	0,56	+ 0,01	$\bar{D} = 0,007$ $s_{(n-1)} = 0,031$ $n = 10$
2	0,78	0,76	- 0,02	
3	0,59	0,59	0,00	
4	0,87	0,88	+ 0,01	
5	0,71	0,73	+ 0,02	
6	0,84	0,85	+ 0,01	
7	0,73	0,76	+ 0,03	
8	0,76	0,74	- 0,02	
9	0,78	0,74	- 0,04	
10	0,57	0,64	+ 0,07	

\* Les échantillons choisis ont intentionnellement une teneur en éthanol proche de la limite actuelle de tolérance en Suisse (0,8‰).

Ayant vérifié par un test de  $F$  (comparaison des variances selon Fisher) que l'écart-type des deux méthodes ne se différencie pas de manière significative, nous avons alors calculé  $t$  au moyen de la relation suivante:

$$t = \frac{\bar{D}}{s_{(n-1)}} \cdot \sqrt{n} = \frac{0,007}{0,031} \cdot \sqrt{10} = 0,714$$

Sachant que:  $\bar{D}$  = 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  $t$  théorique pour 9 degrés de liberté ( $n-1$ ) et 95% de probabilité se monte à 2,262. La valeur de  $t$  pratique obtenue est donc très nettement inférieure à la valeur théorique. Nous pouvons alors, avec une grande probabilité, conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus au moyen des deux méthodes actuellement utilisées pour le dosage de l'éthanol sanguin selon les techniques décrites.

### Conservation des échantillons de sang

Les échantillons sont, après analyse, conservés dans un frigidaire à une température d'environ 5 °C durant 2 à 3 semaines. Les tubes sont ensuite stockés dans un congélateur à - 18 °C. Nous avons tout d'abord étudié l'influence de l'ouverture répétée des tubes, pour le prélèvement à fin d'analyse, sur la teneur en éthanol des échantillons. Puis l'influence de la conservation au frigidaire et enfin l'influence du stockage à long terme au congélateur sur la teneur en éthanol.

#### *Influence du nombre d'opérations d'ouverture du tube*

A plusieurs reprises nous avons ouvert 2 tubes (env. 5 ml de sang), correspondant à deux échantillons différents, en les laissant chaque fois ouverts durant 5 minutes. La durée d'ouverture choisie est bien entendu nettement supérieure à celle nécessaire pour le prélèvement avant l'analyse (enzymatique ou chromatographique). Les résultats obtenus sont reproduits dans les tableaux 4 et 5.

On constate que dans des conditions normales de travail, le fait d'ouvrir les tubes n'a pas d'influence sur la teneur en éthanol de l'échantillon.

Tableau 4. Mesures effectuées par chromatographie dans la même journée, à 2 heures d'intervalle (durée d'ouverture: 5 min)

Période de 2 heures	Échantillon 1 (‰)	Échantillon 2 (‰)
1ère	2,59	1,42
2ème	2,41	1,44
3ème	2,46	1,43
4ème	2,51	1,44
5ème (10 h.)	2,42	1,42
Pente de la droite de régression	- 0,024	0,000

Tableau 5. Mesures effectuées une fois chaque jour (échantillons conservés au frigidaire; durée d'ouverture: 5 min)

Jour	Échantillon 3 (‰)	Échantillon 4 (‰)
1er	0,75	2,63
2ème	0,76	2,61
3ème	0,74	2,47
4ème	0,73	2,59
5ème	0,80	2,74
6ème	0,72	2,62
Pente de la droite de régression	- 0,001	+ 0,013

*Influence de la conservation au frigidaire*

Deux échantillons ont été étudiés sur une période de 10 semaines. Pour chacun d'entre eux (5 ml): d'une part sans ouverture intermédiaire et, d'autre part, avec 6 ouvertures des tubes (température moyenne de conservation: + 5 °C) (voir tableau 6).

Nous constatons en moyenne une très légère variation en éthanol pour ces conditions de conservation prolongée dans un frigidaire à + 5 °C environ. Ceci est confirmé pour une deuxième série d'expériences effectuées sur 3 échantillons de 5 ml chacun: (a) = 0,78‰; (b) = 2,10‰; (c) = 3,14‰ sur une période de 15 semaines. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5 dont les droites sont tracées par régression linéaire. Les différences entre les séries sont proba-

Tableau 6. Mesures effectuées sur une période de 10 semaines sur deux échantillons de sang conservés au frigidaire

Semaine	Échantillon 5 (‰)		Échantillon 6 (‰)	
0	1,65	1,65	2,54	2,54
3ème	pas ouverts	1,72	pas ouverts	2,72
4ème		1,70		2,50
5ème		1,75		2,66
7ème		1,55		2,30
10ème		1,66		1,62
Droite de régression ordonnée à l'origine pente	1,71 + 0,009		2,63 - 0,021	

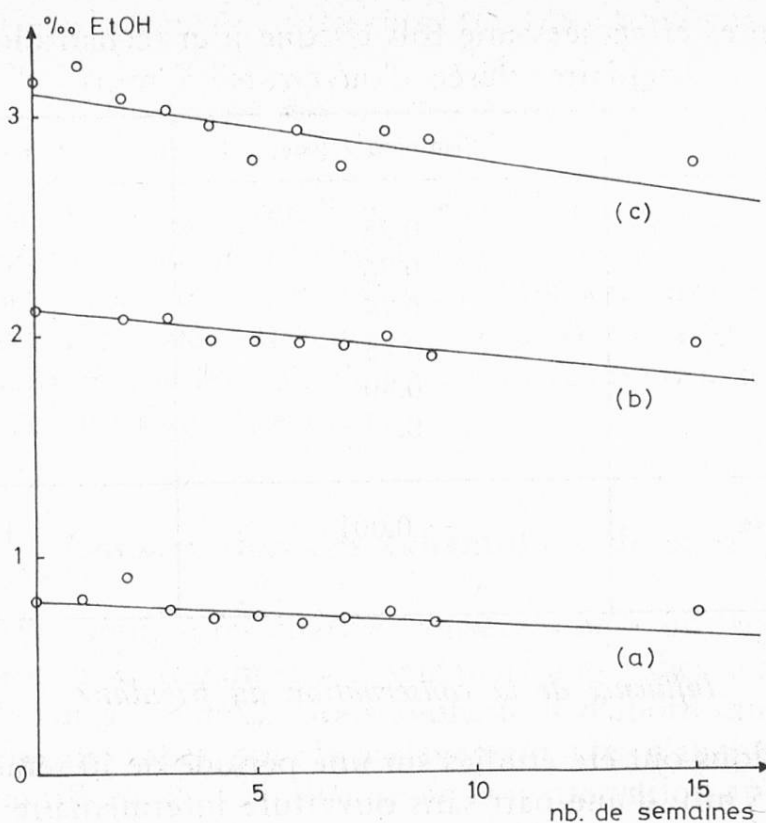


Fig. 5. Evolution de la teneur en éthanol de 3 échantillons conservés au frigidaire (5 °C).  
 Pente des droites de régression: (a) = 0,01  
 (b) = 0,02  
 (c) = 0,03

blement dues à des différences dans les conditions expérimentales: température de conservation, manière de refermer les tubes après prélèvement.

Remarquons toutefois que cette étude a été effectuée sur un espace de temps relativement long par rapport à nos conditions de travail ordinairement adoptées. En effet, nous conservons, comme déjà indiqué, nos échantillons au maximum 3 semaines au frigidaire (après quoi ils sont stockés au congélateur). Dans ces conditions nous constatons que les pertes en éthanol peuvent être considérées comme étant nulles.

#### *Influence de la conservation au congélateur*

Après 2 semaines au frigidaire (+ 5 °C), deux séries de trois échantillons (5 ml) ont été conservées au congélateur (− 18 °C) durant environ respectivement 10 et 38 semaines. Les résultats obtenus sont les suivants:

Temps	Échantillon 1 (‰)	Échantillon 2 (‰)	Échantillon 3 (‰)
0 (1er j.)	3,13	2,18	0,78
10 semaines (73e j.)	3,21	2,17	0,08

Temps	Échantillon 4 (‰)	Échantillon 5 (‰)	Échantillon 6 (‰)
0 (1er j.)	2,00	1,30	0,75
38 semaines (268e j.)	1,88 (?)	1,30	0,72

On constate qu'il est parfaitement possible de conserver des échantillons de sang pendant plusieurs mois sans variation significative de la teneur en éthanol (perte ou décomposition).

Ces résultats ont été obtenus en conservant les échantillons de sang dans des tubes de verre. Nous n'avons pas effectué d'études au moyen de tubes en plastique (polystyrène, polyéthylène et autres), cependant la perméabilité de ces matériaux est bien connue. A notre avis, l'emploi de tubes en verre pour le prélèvement et la conservation du sang destiné à un dosage de l'alcoolémie s'impose absolument.

### Conclusion

Dans ce travail, nous avons décrit deux méthodes de détermination de l'alcoolémie sanguine, telles que nous les pratiquons en routine dans notre laboratoire. L'exécution des analyses par deux méthodes différentes doit permettre d'éviter tout risque d'erreur significative, ce qui est bien le cas en appliquant les techniques des méthodes proposées. En effet, nous pouvons constater qu'en prenant certaines précautions expérimentales il est possible d'atteindre une précision élevée et tout à fait suffisante. La concordance des résultats obtenus par ces deux méthodes est excellente.

D'autre part, la conservation des échantillons de sang dans des tubes de verre pour une contre-expertise éventuelle est parfaitement possible et ceci sans risque de variation appréciable de son alcoolémie, même après plus de deux mois de stockage.

### Remerciements

Nous tenons à remercier le Département de justice et police de la République et Canton de Genève pour l'instrumentation qu'il nous permet régulièrement d'acquérir afin de mener à bien nos analyses ainsi que les recherches y relatives.

### Résumé

Deux méthodes de détermination de l'alcoolémie sanguine, la chromatographie en phase gazeuse par injection directe et le dosage enzymatique, sont décrites. L'étude de la précision et de la concordance entre les deux méthodes est entreprise. Dans une deuxième partie, la conservation des échantillons de sang et les variations éventuelles de la teneur en éthanol sont étudiées.

## Zusammenfassung

Zwei Methoden für die Bestimmung des Alkoholgehaltes im Blut werden beschrieben, die Gaschromatographie mit Direktinjektion und die enzymatische Bestimmung. Die Genauigkeit und die Übereinstimmung der beiden Methoden wird studiert. Die Aufbewahrung der Blutproben und die eventuellen Schwankungen im Alkoholgehalt werden in einem zweiten Teil besprochen.

## Summary

Two methods, direct injection gas chromatography and enzymatic methods for the determination of alcohol in blood have been described. The precision of the results obtained by these methods is studied. In addition, the storage of the samples and any possible variation in the alcohol content have also been examined.

## Bibliographie

1. Wenger, P. E., Monnier, D. et Ruedi, W. F.: Etude critique du dosage de l'alcool dans le sang. *Trav. chim. aliment. hyg.* 45, 528–552 (1954).
2. Monnier, D. et Fasel, M.: Dosage spectrophotométrique de l'alcool dans le sang. *Trav. chim. aliment. hyg.* 47, 141–148 (1956).
3. Alcohol in blood. Biochemica test combination. Feuille d'information Boehringer GmbH, Mannheim 1973.
4. Alcool sanguin dosage avec l'alcool-déshydrogénase. Fascicule d'information E. Merck, Darmstadt 1974.
5. Brandenberger H.: Clinical biochemistry. Principles and methods, p. 1436. Ed. Curtius-Roth, Walter De Gruyter, Berlin 1974.
6. Martin, M., Pelletier, M. et Haerdi, W.: Voir contribution II, p. 207–215.

Dr M. Pelletier  
Dr M. Martin  
Prof. W. Haerdi  
Département de chimie minérale,  
analytique et appliquée de l'Université  
de Genève  
Laboratoire d'alcoolémie sanguine  
Sciences II  
30, quai Ernest-Ansermet  
CH-1211 Genève 4

## II. Amélioration de la méthode chromatographique en phase gazeuse dite de l'«espace de tête» (Head space)

Aspects to the Analysis of Ethanol in Blood

### II. Improvement of Head Space Gas Chromatographic Technique

*M. Martin, M. Pelletier et W. Haerdi*

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

#### Introduction

La technique dite de l'«espace de tête» (Head space) est, depuis quelques années déjà, mise en oeuvre pour chromatographier en phase gazeuse l'éthanol dans le sang. Les laboratoires de contrôle tendent de plus en plus à utiliser cette technique en tant que deuxième méthode d'analyse car elle est relativement simple d'emploi, notamment lorsqu'il s'agit d'effectuer des déterminations de routine en grande série.

Le principe de cette technique consiste à chauffer au préalable à des températures relativement basses, de faibles quantités d'échantillons dans des flacons de petites dimensions munis d'un bouchon de caoutchouc et hermétiquement scellés (type «flacon pénicilline»). La phase gazeuse surmontant cette solution est ainsi enrichie en composés volatils. Il en est prélevé une aliquote à l'aide d'une seringue à gaz pour l'injecter dans le chromatographe.

Certaines difficultés subsistent dans le cas de l'éthanol dans le sang. En effet, une thermostatisation très rigoureuse à 40 °C ou 60 °C (1, 2) nécessite une installation d'injection automatique et, par ailleurs, les concentrations en sels du sang lui-même après addition d'anticoagulant, peuvent gêner la reproductibilité des dosages. Notons aussi que la calibration des échantillons de sang avec des standards aqueux n'est souvent pas possible sans l'utilisation de facteurs de correction qui doivent être déterminés expérimentalement, ce qui limite la précision de la méthode (2).

Dans cette étude, il est proposé certaines modifications consistant en des simplifications instrumentales ainsi que l'élaboration d'un mode opératoire rendant, dans certaines limites, la méthode indépendante de paramètres tels que la température, la concentration en électrolyte et la composition de l'échantillon (anticoagulant, sang, urine, etc.).


## Etude analytique

### Appareillage et réactifs

Les conditions générales proposées par *H. Brandenberger* (3) ont été reprises et modifiées comme suit:

Colonne	200 cm x 2 mm, 300 g/kg carbowax 20 M/chromosorb
Gaz porteur	azote: 23 ml/min
Température	colonne: 110 °C
Injection	bouche à gaz: 0,1 ml (possibilité d'utiliser un système d'injection automatique ou une seringue à gaz)
Détecteur	ionisation de flamme
Standard interne	1,4-dioxanne: 1% dans l'eau
Réactif ionique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M saturé en (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Solution étalon	solution aqueuse d'éthanol Merck en ampoule prête à l'emploi.

### Mode opératoire

0,5 ml de sang et 0,1 ml de solution de dioxanne (utilisé comme standard interne) sont pesés dans des flacons type «pénicilline» de 10 ml. On ajoute 0,5 ml de réactif ionique et l'on bouche rapidement les flacons (il est inutile de sceller les bouchons). On mélange au moyen d'un agitateur (type Vortex), puis on laisse reposer les flacons à la température ambiante (20 °C environ) jusqu'au moment du prélèvement des composés volatils. Les prélèvements (2 ml environ) sont effectués au moyen d'une seringue médicale en plastique.

### Influence du temps écoulé avant les prélèvements

Sur un même échantillon de sang, on a prélevé le volume de gaz nécessaire pour l'injection, à des temps (*t*) différents comptés à partir du moment où l'on a ajouté le réactif (tableau 1).

On constate que le prélèvement peut être effectué moins d'une minute après l'adjonction du réactif. En effet, l'équilibre entre les phases (liquide et gazeuse) est très rapidement atteint, ceci grâce à la composition du réactif, aux faibles volu-

Tableau 1. Concentration de l'éthanol (‰) dans la phase gazeuse en fonction du temps à partir de l'adjonction du réactif

<i>t</i> (min)	0,5	1	5	10	30
‰ éthanol (mg/kg sang)	0,84	0,83	0,81	0,81	0,80



mes mis en jeu et à la relativement grande surface de contact liquide-gaz. L'action du réactif peut s'expliquer par un effet de sel (4) qui augmente la tension de vapeur de l'éthanol et du dioxanne; la sensibilité et la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint sont ainsi améliorés. Ce réactif joue aussi le rôle d'agent déprotéinisant. Il faut remarquer qu'un prélèvement effectué 5 heures après l'adjonction du réactif ne modifie pour ainsi dire pas les résultats comme on peut le constater à la vue du tableau 2.

*Tableau 2.* Comparaison des résultats d'analyses (‰) de différents échantillons effectuées à des temps différents

Echantillon No	1	2	3	4
prélèvement immédiat	1,60	2,24	1,95	1,85
prélèvement après 5 h	1,58	2,25	1,95	1,91

Il faut relever que les surfaces des pics de l'éthanol et du dioxanne sont réduites d'environ 30%. Cette diminution peut être attribuée à un phénomène d'adsorption sur les septums ou d'une variation non contrôlée de la température ambiante lors de l'analyse. Néanmoins, le rapport *R* des deux surfaces restant identique, les résultats obtenus sont valables, comme on peut le constater dans le tableau 2.

#### *Influence de la température*

Trois échantillons de sang de provenances différentes ont été étudiés. Le chromatographe a été calibré au moyen d'un standard maintenu à 20 °C et les différents échantillons ont été thermostatés successivement à 15 °C, 20 °C et 25 °C. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3 et comparés aux valeurs obtenues par les méthodes enzymatique (ADH) et chromatographique en phase gazeuse par injection directe (CPGD) (5).

Il apparaît que les résultats sont assez peu dépendants de la température entre 15 ° et 25 °C. Il est donc possible de travailler, sans précaution particulière, à la température ambiante du laboratoire. Ceci est dû au fait que les pressions de vapeur de l'éthanol et du dioxanne varient pratiquement de la même manière dans cet intervalle de température. Nous avons calculé (sans tenir compte de l'ef-

*Tableau 3.* Influence de la température sur les résultats d'analyses. Comparaison avec les méthodes ADH et CPGD

Echantillon de sang No	15 °C	20 °C	25 °C	ADH	CPGD
1	0,78	0,82	0,81	0,81	0,81
2	1,32	1,32	1,37	1,40	1,37
3	2,40	2,47	2,51	2,49	2,52

fet de sel) ces pressions partielles (6) ainsi que leur rapport ( $r$ ) aux températures de 15 °C, 20 °C et 25 °C. Il apparaît dans le tableau 4 que ce rapport ne varie pas plus de +3,5% pour une augmentation de température de 5 °C.

Tableau 4. Pressions partielles de l'éthanol et du dioxanne, ainsi que leur rapport à différentes températures

T °C	15 °C	20 °C	25 °C
$p_{\text{éthanol}}$ (mm Hg)	35,3	47,12	62,27
$p_{\text{dioxanne}}$ (mm Hg)	24,0	30,96	39,61
$r$	1,47	1,52	1,57

#### *Influence du volume de l'échantillon de sang*

Le mode opératoire décrit plus haut fait mention d'une prise correspondant à 0,5 ml de sang. Il a été prélevé, sur un même échantillon, divers volumes de sang (0,1 à 1 ml). Les mesures ont été effectuées en tenant compte, lors de la calibration du chromatographe, du facteur multiplicatif  $XF = \frac{0,5}{p}$ , ( $p$  étant la masse de sang en g). Les résultats obtenus sont les suivants:

Volumes de sang pesé (ml)	0,1	0,2	0,5	0,7	1
‰ éthanol trouvé	0,74	0,75	0,81	0,77	0,81

Nous constatons donc qu'une variation d'un facteur 10 du volume de sang pesé n'influence pas les résultats.

#### *Droite d'étalonnage*

La linéarité de la réponse du chromatographe a été vérifiée au moyen de solutions aqueuses d'éthanol de concentrations comprises entre 0,01 et 5‰. Il faut remarquer que cette linéarité est confirmée jusqu'à des teneurs relativement fortes en éthanol (10‰), teneurs qui ne présentent évidemment qu'un intérêt théorique dans la cas de l'alcoolémie sanguine. La figure 1 représente la droite  $R = f(\text{‰})$ ,  $R$  étant défini comme suit:

$$R = \frac{\text{surface du pic de l'éthanol}}{\text{surface du pic du dioxanne}} \times 10.$$

Le coefficient de régression de cette droite est de 0,9995 (sur 18 points). On remarquera par ailleurs que  $R$  est parfaitement constant d'un jour à l'autre, pour autant que les mêmes solutions de dioxanne et de réactif soient utilisées.

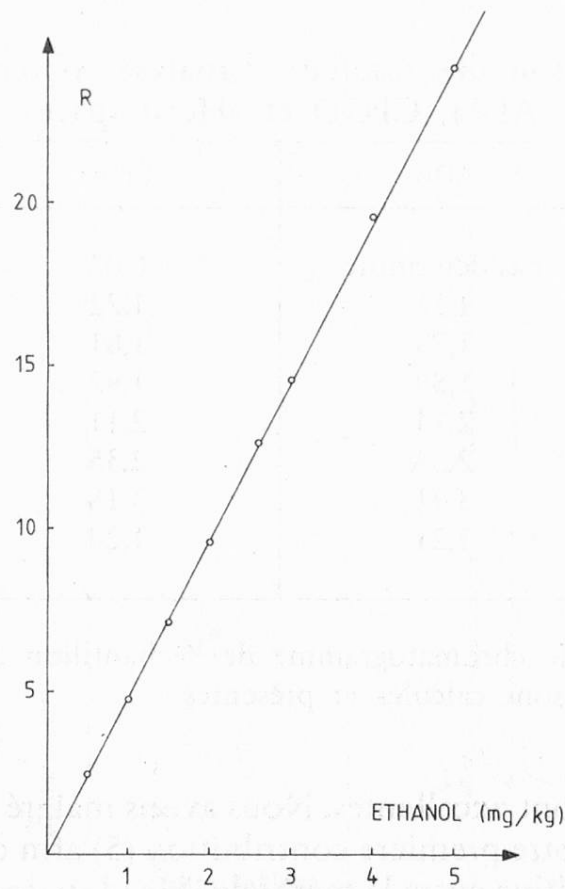


Fig. 1. Droite d'étalonnage  $R = f$  (‰)

## Résultats pratiques

### *Precisions des mesures*

Pour une série de 10 mesures sur un échantillon de sang dont l'alcoolémie est voisine de 0,80‰ et en s'assurant une probabilité de 95%, les résultats obtenus sont les suivants:

déviatiun standard  $s = 0,0204‰$   
 coefficient de variatiun  $c_v = 2,4\%$   
 limite de confiance  $\Delta x = 0,05‰$

Nous avons effectué la même série de détermination sur un autre échantillon de sang (alcoolémie voisine de 2,20‰). On obtient:

$s = 0,0585‰$        $c_v = 2,3\%$        $\Delta x = 0,12‰$

## Tableau comparatif d'analyses d'échantillons divers

Le tableau 5 résume quelques résultats obtenus dans nos laboratoires en appliquant la méthode enzymatique (ADH), la chromatographie en phase gazeuse par injection directe (CPGD) et la méthode «Head space» décrite dans ce travail.

Tableau 5. Comparaison des résultats d'analyses obtenus avec les méthodes ADH, CPGD et «Head space»

Echantillons	ADH	CPGD	«Head space»
sang 1	pas déterminé	0,02	0,03
2	1,21	1,22	1,21
3	1,79	1,81	1,79
4*	1,89	1,92	1,94
5	2,14	2,11	2,12
6	2,34	2,35	2,30
7	3,21	3,18	3,20
urine 1	1,21	1,20	1,21

\* La figure 2 reproduit le chromatogramme de l'échantillon de sang No 4 et montre comment les résultats sont calculés et présentés.

Les concordances sont excellentes. Nous avons malgré tout effectué un test de  $t$  comme décrit dans notre première contribution (5) afin de déterminer s'il existe une différence significative entre la méthode «Head space» et la chromatographie en phase gazeuse par injection directe (CPGD). Les résultats de 10 analyses, choisies au hasard, nous ont permis de déterminer un  $t$  pratique (1, 11) bien inférieur au  $t$  théorique (2,262) et ceci pour 9 degrés de liberté  $n-1$ ) et une probabilité de 95%. Nous pouvons donc affirmer qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus par ces deux méthodes.

### Conclusion

La méthode décrite répond aux exigences d'exactitude et de précision désirées pour la détermination de l'éthanol dans le sang. De plus, sa simplicité d'utilisation et son indépendance vis-à-vis de divers paramètres (température, volume de sang prélevé, temps, nature de l'échantillon, etc.) grâce à la composition du réactif proposé et du rôle du dioxanne comme étalon interne, en font une méthode rapide et pratique, notamment dans son application en analyse de routine.

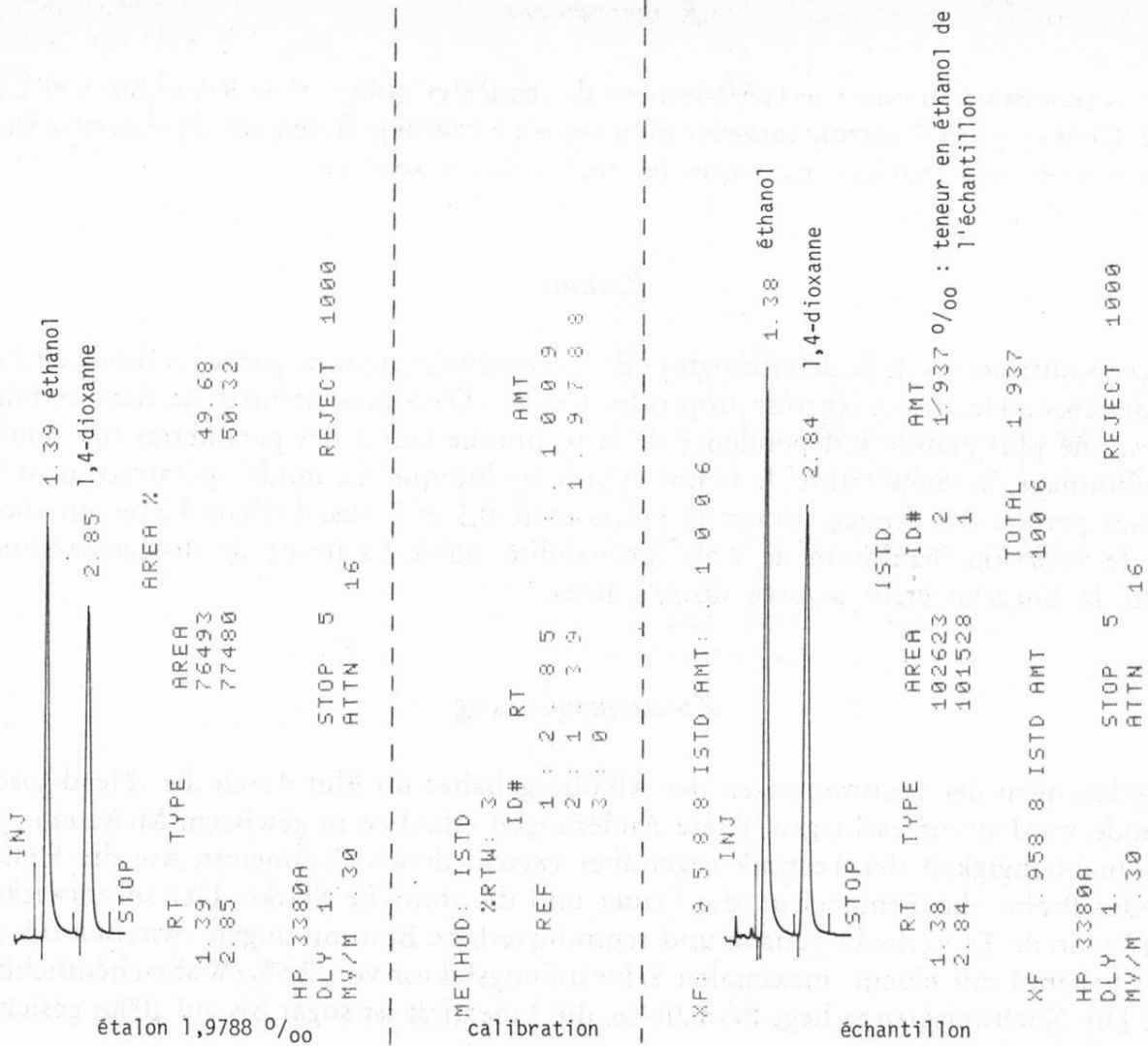


Fig. 2. Exemple de chromatogramme avec calibration et analyse.

Le premier chromatogramme est celui du standard Merck 2 mg/ml. On calibre alors l'intégrateur en lui fournissant les données et en proposant un calcul par étalonnage interne.

Pour chaque échantillon on introduit les données correspondant à la masse du sang prélevé ( $XF = \frac{0,5}{p}$ ) ainsi que celle du standard interne ajoutée dans le flacon (ISTD, AMT). L'intégrateur donne alors directement la concentration de l'éthanol dans le sang analysé en g/kg de sang.

## Remerciements

Nous tenons à remercier le Département de justice et police de la République et Canton de Genève pour l'instrumentation qu'il nous permet régulièrement d'acquérir afin de mener à bien nos analyses ainsi que les recherches y relatives.

## Résumé

Des modifications de la détermination de l'alcoolémie sanguine par la méthode de l'«espace de tête» («Head space») sont proposées. Ces modifications permettent, dans certaines limites, une plus grande indépendance de la technique face à des paramètres tels que l'échantillonnage, la température, le temps et la force ionique. Le mode opératoire ainsi mis au point permet des dosages exacts et précis entre 0,5 et 2,5‰ d'éthanol avec un coefficient de variation maximum de 2,5% (probabilité: 95%). La limite de dosage se situe à 0,01‰, la linéarité étant assurée jusqu'à 10‰.

## Zusammenfassung

Änderungen der Bestimmungen des Alkoholgehaltes im Blut durch die «Head-space»-Methode werden vorgeschlagen. Diese Änderungen erlauben in gewissem Maße eine größere Unabhängigkeit der Technik gegenüber verschiedenen Parametern wie die Herstellung der Probe, die Temperatur, die Dauer und die ionische Stärke. Der so entwickelte experimentelle Teil erlaubt genaue und reproduzierbare Bestimmungen zwischen 0,5 und 2,5‰ Ethanol mit einem maximalen Schwankungsfaktor von 2,5% (Wahrscheinlichkeit: 95%). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,01‰, die Linearität ist sogar bis auf 10‰ gesichert.

## Summary

Several modifications have been proposed in the «Head space» method for the determination of alcohol in blood. These modifications, to some extent, offer a greater technical flexibility with regards to physical parameters such as sampling, temperature, time and ionic strength. An accurate and precise determination of ethanol in the range of 0.5‰–2.5‰ can be made with a maximum coefficient of variation of 2.5% (95% probability). The detection limit is about 0.01‰ and the calibration graph is linear up to 10‰.

## Bibliographie

1. *Machata, G.*: Determination of alcohol in blood by gas chromatographic headspace analysis. *Clin. chem. Newslett.* 4, 29–32 (1972).
2. *Hauck, G. und Terfloh, H. P.*: Untersuchungen zur automatischen Blutalkoholbestimmung nach der «head space» Methode. *Chromatographia* 2, 309–315 (1969).
3. *Brandenberger, H.*: Clinical biochemistry. Principles and methods, p. 1437. Ed Curtius-Roth, Walter De Gruyter, Berlin 1974.

4. *Hachenberg, H. and Schmidt, A. P.*: Gas chromatographic headspace analysis, p. 12. Heyden, London 1977.
5. *Pelletier, M., Martin, M. et Haerdi, W.*: Voir contribution I, p. 194—206.
6. Handbook of chemistry and physics, 57th Edition, p. D-162. CRC Press, Cleveland 1973.

Dr M. Martin  
Dr M. Pelletier  
Prof. W. Haerdi  
Département de chimie minérale,  
analytique et appliquée de l'Université  
de Genève  
Laboratoire d'alcoolémie sanguine  
Sciences II  
30, quai Ernest-Ansermet  
CH-1211 Genève 4