

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



DEPTO. DE PASANTES
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ETANOL EN SANGRE POR
CROMATOGRAFIA DE GASES UTILIZANDO MUES-
TRAS CAPILARES POR EL METODO DE ESPACIO-
ALTURA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

SILVIA PINEDA DIAZ

MEXICO, D. F.

1980

M-21733



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres:

Simón Pineda Vergara

y Ma. Antonieta D. de Pineda

Con inmenso cariño y agradeci-
miento por su confianza en mí.

Con Amor a mis hijas:

Iliana

Wendy

Con cariño a mis hermanos:

Simón

Fernando

Ma. Antonieta

Sandra Luz

Ma. Elena

Ma. Eleiza

A mis abuelitas y tíos:

Eleisa de Pineda

Lina de Sánchez

Lic. María

Fausto

Carlota

Enrique

Sofía

Graciela (q.p.d.)

A mis primos:

Carmen

Regelio

José Luis

Maximino

Jesús Enrique

Juan José

José Alfredo

Victor Hugo

Pedro

Marce Antonio

A mis sobrines:

Vanessa

Cynthia

Erika

Oscar E.

Julieta

Laura

Roberto

Al Dr. Juan José Gómez C.
con infinito agradecimiento
por su gran ayuda durante -
mis estudios y por su amistad.

Al Sr. Alfonso García M. y
a mis queridas amigas:
Luz Alba
Ma. Esmeralda
Luisa Andrea.

A todas aquellas personas
que siempre tuvieron una
palabra de estímulo para mí.

Al Q.F.B. Ignacio Diez de Urdanivia
con agradecimiento por su colabora-
ción en este trabajo.

Al Ing. Filadelfo García
por su gran ayuda y a su
esposa Q.F.B. Raquel de G.
porque siempre me motivó a
seguir adelante.

Al Honorable Jurado.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA
VOCAL	ENRIQUE CALDERON GARCIA
SECRETARIO	ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES
1er. SUPLENTE	CESAR A. DOMINGUEZ CAMACHO
2o. SUPLENTE	ANA MA. MENDEZ CHAVEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO EN MEXICO, D.F.

SUSTENTANTE SILVIA PINEDA DIAZ *Silvia P.*

ASESOR DEL TEMA *Ignacio Diez de Urdanivia* IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA

SUPERVISOR TECNICO ING. FILADELFO GARCIA CALVO *Filadelfo*

I N D I C E

T E M A S .

CAPITULO I .- INTRODUCCION

CAPITULO II .- GENERALIDADES

CAPITULO III .- TECNICA Y DESCRIPCION DEL APARATO

CAPITULO IV .- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

CAPITULO V .- BIBLIOGRAFIA

C A P I T U L O I.- INTRODUCCION

Debido a que el etanol es una sustancia comunmente - involucrada en hechos ilícitos, ya que no solo es mortal por si mismo, sino que generalmente es un factor que contribuye a acci- dentes y hechos ilícitos de todos tipos, se ha llevado a cabo - este trabajo, con el objeto de proporcionar mayor información y técnicas más precisas sobre uno de los problemas que ha venido a ocupar a últimas fechas uno de los primeros lugares en nues- tro medio socio-económico, tal es el alcoholismo.

Probablemente se han publicado más métodos para la - determinación de etanol sanguíneo que para cualquier otra sus- tancia tóxica. Pero en cuanto se refiere a especificidad y rapi- dez, el método ideal es el de Cromatografía de gases.

La técnica empleada para realizar este trabajo fué - precisamente por Cromatografía de gases inyección "espacio-altu- ra", que es un método relativamente nuevo, de gran precisión, - confiabilidad y exactitud. Además la determinación se lleva a - cabo en muestras de sangre capilar, que son las que más se apro- ximan a la concentración de etanol en sangre arterial, por lo - que con esto nos da otra ventaja más sobre otros métodos.

La concentración de etanol que se puede detectar por esta técnica está encima de un rango de 0.003-1.2 mg/ml con un promedio de precisión de 4.6 % y utilizando de 20-50 ~~ml~~ de mues- tra sanguínea y apreciamos comparativamente con otras técnicas en las cuales la cantidad de muestra es más grande y lleva todo un proceso para purificarla.

Así como en el desarrollo de la técnica es mejor la de Cromatografía de gases inyección espacio-altura, igual suce- de con los resultados que se obtienen con mayor rapidez y más - exactitud mediante la interpretación de una gráfica.

El presente trabajo se realizó en el Instituto Mexi- cano del Petróleo en Czda. Atzacapozalco-La Villa esquina Av. de los 100 metros; lo hice como una ayuda a la Química Forense y -

con el de séo de que se aplique ó se considere su aplicación --
evitando así lo que ocurre en algunos laboratorios oficiales en
el sentido de que inventan los resultados.

C A P I T U L O I I .- GENERALIDADES

La Cromatografía de Gas es una técnica para separar sustancias volátiles por medio de la filtración de una corriente de gas sobre una fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido se habla de Cromatografía de Gas Sólido (CGS) si es un líquido, se habla de Cromatografía de Gas Líquido (CGL).

En 1905 el Químico Ramsey empleó la Cromatografía, separando mezclas de gases y vapores. Estos primeros experimentos usaron adsorción selectiva en, ó desorción de sólidos adsorbentes tales como carbón activado.

En 1906 Tswett Químico alemán, describió la primera forma de "Elusión", líquido-sólido, la cual explicó y aplicó a la separación de pigmentos coloridos en una columna cromatográfica y obtuvo bandas discretamente coloridas. Su técnica se utilizó durante mucho tiempo, pero las separaciones no podían controlarse con facilidad hasta que se introdujo el concepto de desplazamiento, que es la separación controlada de los compuestos absorbidos por un material, efectuada por una sustancia de mayor afinidad.

James y Martin en 1952, introdujeron la Cromatografía de Gas al publicar sus artículos sobre la separación de mezclas de ácidos orgánicos mediante el proceso de partición Gas-Líquido.

Partes básicas de un cromatógrafo:

- 1.- Una fuente de gas portador puro a presión alta.
- 2.- Un controlador exacto de flujo.
- 3.- Entrada de muestra universal.
- 4.- Empaque de columna (termostato).
 - a).-Fase líquida de distribución constante.
 - b).-Soporte sólido inerte con un área de superficie grande.
- 5.- Detector.
- 6.- Registrador.
- 7.- Termostato para inyección, columna y detector.

Gas portador.- El gas usado para transportar la muestra a través de la columna. Un cilindro de gas a alta presión - sirve como la fuente del gas portador. Se usa un regulador de presión para asegurar una presión uniforme en la entrada de la columna y por lo tanto una tasa de flujo constante de gas.

El gas portador debe ser: inerte, capaz de minimizar la difusión gaseosa, puro y fácil de obtener; barato y conveniente para uso del detector.

Los gases más comunmente usados son: Hidrógeno, Helio y Nitrógeno.

Introducción de la muestra.- La muestra debe introducirse en forma instantánea como un "tapón" en la columna. Una buena revisión en la técnica de muestra, es subir la temperatura de inyección y reducir el tamaño de la muestra.

Los gases se introducen generalmente por medio de jeringas de cierre hermético ó por válvulas con anillos desviadores de muestras. Los líquidos se manejan con jeringas y para la inyección directa de sólidos se usan unos dispositivos.

Columnas.- La tubería de la columna puede ser de cobre, acero inoxidable, aluminio ó vidrio; en forma recta; doblada ó en espiral. En general se usan columnas de acero inoxidable.

Los diámetros de las columnas varían desde un 0.01" a 2" I.D. Columnas más anchas muestran efectos de difusión destructivos ; demasiado angostas presentan problemas de empaque y requieren altas presiones y tamaños de muestra aún más pequeños.

Algunos términos usados.-

Fase Líquida.- Es un líquido no volátil a la temperatura de operación de la columna, el cual se utiliza para cubrir el soporte sólido y así disolver los compuestos de la muestra.

Soporte sólido.- Este provee el medio de distribución de la fase líquida en forma uniforme sobre una gran superficie, debe ser inerte, de fuerza de opresión alta, de área de super-

ficie grande, de forma regular y tamaño uniforme.

Fase estacionaria.- La selección correcta del solvente a usarse, es quizá, el parámetro más importante en Cromatografía de Gas-Líquido.

El solvente debe tener las siguientes características: Las muestras deben exhibir diferentes coeficientes de distribución, deben tener una solubilidad razonable en el solvente y este debe tener una presión de vapor imperceptible bajo temperaturas de operación.

Detector.- Indica la presencia y mide la cantidad de componentes en el afluente de la columna.

Registrador.- Nos indica un registro permanente de los resultados en la forma de picos.

Temperatura.- Se debe describir la temperatura de la cámara de inyección, de la columna y del detector.

Temperatura de la cámara de inyección.- Debe estar suficientemente caliente como para vaporizar la muestra tan rápidamente de manera que no haya pérdida de eficiencia en las técnicas de inyección y suficientemente baja como para evitar descomposición ó rearrreglo térmico.

Temperatura de la columna.- Debe ser suficientemente alta como para que el análisis se obtenga en un lapso de tiempo razonable y suficientemente baja como para obtener la separación deseada.

Temperatura del detector.- La influencia de la temperatura sobre el detector depende considerablemente en el tipo de detector usado, pero sin embargo en general puede decirse que el detector y las conexiones de la salida de la columna al detector deben estar suficientemente calientes de manera que no se produzca la condensación de la muestra y/o de la fase líquida.

Definición de términos en Cromatografía de Gas.

Cromatograma.- Es la representación gráfica de la respuesta del detector contra el tiempo ó volumen del gas de arrastre.

Area del pico.- Es el área encerrada entre el pico

y la línea base.

Línea base.- Es la porción del cromatograma registrado cuando sólo está fluyendo gas de arrastre por el detector

Pico.- Es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente está pasando por el mismo.

Ancho del pico a la mitad de la altura.- Es la distancia paralela a la línea base que divide a la altura del pico en dos partes iguales.

Volúmen de retención.- Es el volúmen de gas medido a la presión atmosférica necesaria para transportar la muestra hasta el detector.

Volúmen de retención corregido.- Es el volúmen de retención corregido de un componente no absorbido tal como el aire y representa el volúmen de gas de arrastre requerido para transportar tal componente desde el punto de inyección hasta el punto de detección.

Tiempo de retención.- Es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta el máximo pico del compuesto en consideración.

Procedimientos de calibración.

- 1.- Altura y área del pico.
- 2.- Calibración directa.
- 3.- Estandarización interna.
- 4.- Normalización interna.

Usos de la Cromatografía de Gas.

Puede usarse para aislar compuestos puros en cantidades de gramos; para identificar y determinar cualquier material que tenga una presión de vapor apreciable (1 a 1000 mm.); para investigar muchas propiedades físicas como superficie de área, adsorción isoterma, temperatura de solución, coeficiente de partición, peso molecular y presión de vapor.

En análisis cuantitativo la precisión cuantitativa

con la cual las muestras pueden ser analizadas es uno de los factores que se ha llevado al rápido desarrollo de la Cromatografía de Gas en Análisis instrumental.

En el análisis cuantitativo existen varios factores importantes que son: Introducción exacta de la muestra, parámetros de operación constante, exactitud al medir el área de los picos, factores de sensibilidad de cada compuesto, linealidad de los detectores y columnas que dan picos bien resueltos.

Ventajas y Desventajas.

Ventajas.- Que es un método exacto, preciso, tiempo de análisis corto, generalmente los componentes de la muestra se separan completamente y se mezclan sólo con un gas inerte, haciendo fácil la colección y determinación cuantitativa; la columna se regenera continuamente por la fase de gas inerte.

Desventajas.- Una es que componentes que se retienen fuertemente se mueven muy lentamente ó permanecen inmóviles. Pero esto se puede superar programando la temperatura de la columna.

Generalidades referentes al Etanol.

El etanol pertenece a la familia de los alcoholes y también se le conoce como Alcohol Etilico. Los alcoholes en general son sustancias muy solubles en agua, debido a la gran polaridad que les proporciona el grupo oxhidrilo que contienen en su molécula. Pueden ser monovalentes, divalentes ó polivalentes según contenga uno, dos ó más oxhidrilos en la molécula del compuesto.

La fórmula del etanol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, alcohol monovalente que es una de las sustancias químicas conocidas quizá de las más antiguas y también de las más importantes.

En la Industria, el alcohol etílico es muy usado como solvente para lacas, barnices, perfumes y como medio para reacciones químicas; en recristalizaciones. En materia prima pa

ra la preparación de una gran cantidad de compuestos de todas - clases.

Este alcohol no se encuentra libre en la naturaleza, - pero se puede preparar ya sea sintéticamente a partir de clorhidrina, cloruro de etilo, etc. ó por fermentación a partir de hidratos de carbono, fermentables por la acción de enzimas, que - son catalizadores bioquímicos.

Acción fisiológica.

Ejerce acción hipnótica, antibiótica, analgésica, es droga que actúa sobre el sistema nervioso autónomo.

Metabolismo del alcohol.- Absorción, distribución y eliminación.

Factores que afectan la absorción del etanol.- Cantidad de etanol ingerida, concentración en la bebida, naturaleza y cantidad de los materiales diluyentes en el estómago, duración del alcohol en el estómago.

El etanol es una de las pocas sustancias que se absorben a través del estómago. Se distribuye rápidamente a todos -- los tejidos, en concentraciones aproximadamente igual de acuerdo con su contenido acuoso.

El peso del cuerpo por dos terceras partes (parte líquida) por el porcentaje de alcohol en la sangre ó en la orina, da la cantidad calculada de alcohol absorbido. En situación de equilibrio, el cerebro suele contener algo más de alcohol que - la sangre; la orina, 1-3 veces más que en la sangre.

Menos del 10 % del alcohol ingerido se elimina no --- transformado, en parte por los pulmones (0.5 al 5%) y en parte por los riñones (0,2 al 10%). El restante es oxidado en el organismo a $CO_2 + H_2O$, a una velocidad de 8 gr/hora. Varía de persona a persona pero es razonablemente constante.

El mecanismo exacto de la destrucción del alcohol no está completamente dilucidado, pero se ha observado que el acetaldehido y el ácido acético son productos intermediarios en su

oxidación. La fase inicial de la oxidación tiene lugar fundamentalmente en el hígado.

La cantidad de alcohol en la sangre ó en la orina que se ha tomado como máximo es de 150 mg/%, arriba de esta cifra se considera que hay intoxicación alcohólica.

C A P I T U L O III.- TECNICA Y DESCRIPCION DEL APARATO

Objeto.- En Cromatografía de Gas-Líquido, los componentes a separarse son llevados a través de la columna por un gas inerte que es el Gas portador. La mezcla de muestra se reparte entre el gas portador y el solvente no volátil ó sea la "Fase estacionaria" apoyado en un sólido inerte de tamaño controlado ó "Soporte".

El solvente selectivamente retarda los componentes de la muestra de acuerdo a un coeficiente de distribución, hasta que estos forman bandas separadas en el gas portador. Estas bandas componentes dejan la columna en la corriente de gas y son registradas como una función de tiempo por un detector.

Este método utilizando muestras capilares, nos proporciona varias ventajas sobre otros, ya que la recolección de dichas muestras son las que más se aproximan a la concentración de etanol en sangre arterial, que según Forney reportó que puede ser 50-100 % más grande de lo que en la sangre venosa.

Otra ventaja, es que permite la colección de gran número de muestras, evitando numerosas pinchaduras al paciente.

Por otro lado, la técnica cromatográfica de inyección -- espacio-altura, ofrece distintas ventajas sobre métodos de inyección directa. La Más importante es la prevención de contaminación de la columna, incremento en la sensibilidad producida por equilibrio de las muestras de sangre a 60°C; mejora la precisión debido a el uso de una jeringa para gas compacta encaquetada con agua a temperatura constante; el uso de Nitrito de sodio, el cual previene la oxidación del etanol y acumulación de acetaldehído, conduciendo además a un completo enriquecimiento de etanol de las soluciones de sangre; la utilización de --- fluoruro de sodio, el cual detiene falsos niveles de etanol causados por el desarrollo de microorganismos en sangre almacenada.

La introducción de polímeros aromáticos porosos como empaque en la columna cromatográfica, ha facilitado grandemente -

la microdeterminación cuantitativa de compuestos orgánicos volátiles, estos son ilustrados en forma de picos simétricos con bajos volúmenes de retención.

Los compuestos hidroxilados tienen poco ó ninguna absorción en estas columnas. Además el problema de la interferencia del agua es eliminado, ya que un polímero de etil vinil benceno ha sido usado con gran utilidad para la determinación de etanol en la sangre.

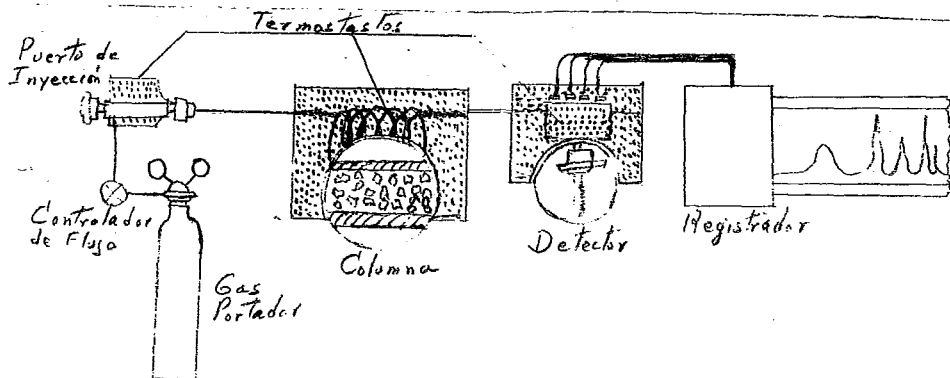
El método es como ya lo mencionamos anteriormente, sencillo, confiable, rápido y de gran utilidad para el estudio de pacientes sufriendo alcoholismo agudo y crónico en los cuales se encuentran sustancias tóxicas e igualmente para el estudio desde el punto de vista legal, para investigar si existe ó no alcohol en determinado individuo y que cantidad.

Descripción del Aparato y condiciones de uso.

Aparato.- La determinación fué realizada sobre un cromatógrafo Varian serie 2100, provisto de un detector de ionización de flama de hidrógeno y un registrador de doble plumilla modelo 20, se utilizaron dos columnas de vidrio de 183 cm. de longitud y 3.5 mm. de diámetro interno. Las columnas fueron empacadas con Porapak Q y preacendicionadas a 250°C por 12 horas.

La temperatura de la columna fué mantenida a 150°C, la del inyector a 165°C y la del detector a 200°C.

El valor del flujo del Nitrógeno que se utilizó como gas conductor fué de 30 ml/min., el flujo del aire fué de 225 ml/min. y el flujo del hidrógeno fué de 30 ml/min.



Preparación de la muestra y soluciones estandar.

Se utilizó una solución estandar de 20 mg. de etanol por ml. y como solución estandar interna N-Propanol, para determinar su volumen de retención para su identificación en el cromatograma. Se hicieron una serie de diluciones para obtener concentraciones desde la mínima que se puede calcular por este método. - También se utilizó sangre de transfusiones para todos los estudios.

Las concentraciones de etanol fueron preparadas por dilución en serie de la solución estandar de etanol con la sangre de transfusión y fueron analizadas de la misma forma que las muestras biológicas.

Datos de la curva de calibración.

No. de vial	1	2	3	4	5	6	7
Conc (de Etanol (mg/%)	0.3	0.6	2.0	6.0	20	60	120

Preparación de la muestra.- Volúmenes iguales de la solución estandar interna y de una muestra problema (20-50 μ f) -- que se colectó rápidamente con una pipeta micromuestreadora calibrada de vidrio; se colocaron en un tubo de ensayo de polipropileno de 0.04 ml., se tapó y agitó de 10 a 20 seg., una mitad de la mezcla resultante se transfirió a un frasco vial ambar de vidrio de 6ml. el cual fué sellado con un tapón de goma tipo -- pestaña y un sello de aluminio.

Los viales fueron colocados en un baño de agua a temperatura constante a 60°C y se equilibraron por 3 min. previo a la inyección de la muestra altura-espacio dentro del cromatógrafo de gas.

Como ya se dijo antes, el mismo procedimiento se sigue con cada una de las muestras de las soluciones estandar de etanol. Los tapones de goma fueron pretratados por ebullición en agua destilada por 30 min. seguido por cuidadoso enjuague con agua deionizada.

Sin este pretratamiento, aparece un pico en la región del etanol del cromatograma.

Preparación de la muestra altura-espacio.-

La aguja de una jeringa hermética para gas de 2 cm³, -- protegida en una envoltura de agua a temperatura constante mantenida a 67°C fué insertada a través del tapón de goma del frasco vial dentro de la fase de vapor, teniendo la seguridad de no tocar el líquido, se bombea el émbolo cinco veces y se regresa a 0.1 ml. sobre el tamaño de muestra deseada. La jeringa fué retirada del frasco y este removido del baño.

El volúmen de la muestra altura-espacio (0.3-0.75 ml) -- fué ajustada e inyectada dentro de la columna con un rápido movimiento uniforme.

El volúmen exacto de la muestra no fué decisivo, ya que la respuesta fué la relación de las áreas de los picos para etanol/N-propanol.

Las muestras problema que se procesaron en este trabajo fueron tomadas en el Hospital Central de Petróleos Mexicanos. -- Se le tomó muestra a 50 personas entre 20 y 50 años de edad, 29 de las cuales fueron hombres con antecedentes alcohólicos, 20 -- sin antecedentes y un voluntario al que se le administró etanol al 95 % diluido a 150 ml. con jugo de naranja sin azúcar.

A cada persona se le tomó con una pipeta micromuestreadora calibrada de vidrio, de la yema del dedo, \pm 0.015 a 0.02 ml. de sangre y se colocaron 0.003 ml. en tubos de ensayo de polipropileno de 0.04 ml. (3 a 4 tubos por persona para checar el resultado) con un volúmen igual de estandar interno con nitrato de sodio, se transfirieron a viales y se almacenaron en un congelador a -17°C hasta que se analizaron.

Se llevaron a cabo experimentos por separado, para determinar tiempo de almacenamiento, concentración de nitrato de sodio y tiempo óptimo de equilibrio.

Para estudiar los efectos de almacenamiento prolongado se prepararon estandars de etanol sanguíneo y se mezclaron se--

paradadamente con volúmenes iguales de solución de estandar interna. De las mezclas resultantes se transfirieron alícuotas de 40 ~~ml~~ a viales de 6 ml. y se sellaron. Cada vial se marcó y se colocó en una unidad de congelación a -17°C ó en un refrigerador a 4°C . Las muestras refrigeradas fueron analizadas inmediatamente y a intervalos de 1 semana por 2 semanas más. Muestras congeladas con nitrito también fueron analizadas al final de 4 semanas.

Para efectos de tiempo de equilibración se preparó una solución de etanol sanguíneo con una concentración de -- 0.06 mg/ml igualmente se prepararon alícuotas que se mezclaron con volúmenes iguales de estandar interna, se prepararon los viales y se colocaron en un baño de agua a temperatura constante de 60°C , por periodos de tiempo variables (1-45min) A cada tiempo de equilibración se analizó el contenido de etanol de los viales.

La cantidad de acetaldehído también fué determinada en las muestras que no contenían nitrito de sodio e incubados por 45 minutos.

Por último y para demostrar la utilidad del método.-

Un voluntario, hombre adulto, fué administrado con 15 ml. de etanol al 95 % diluido a 150 ml. con jugo de naranja sin azúcar. El voluntario ayunó desde las 10.00 p.m. del día anterior hasta 3 horas después de la desis. Se colectaron 50 ~~ml~~ de muestra de sangre capilar a 0,4, 8, 16, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 y 180 minutos.

C A P I T U L O IV.- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El cromatograma que nos muestra la figura 1, nos indica claramente los tiempo de retención de las soluciones estandar que se utilizaron. En este caso observamos que el Etanol -- tiene un tiempo de retención de 4 minutos y que en el caso de -- que existiera acetaldehido nos daría un pico entre el pico del primer solvente (aire) y el del etanol, aproximadamente a los 2 minutos. El pico del N-Propanol nos da un tiempo de retención -- de 10 minutos, diferente del etanol y además adecuado como es-- tandar interno, ya que es una sustancia que normalmente no se -- encuentra en la sangre.

En algunos casos podría aparecer un pico a los 7 minutos pero también no interfiere con el del etanol ya que sabemos que se puede deber al alcohol isopropílico que es el desinfectante bactericida usado frecuentemente antes de la toma de muestra de sangre y que por lo tanto, tiende a contaminar las muestras.

Al procesar las diluciones de la solución estandar de etanol, las respuestas que obtuvimos fueron calculadas como la relación de áreas de los picos de etanol a N-Propanol, obtenien de los datos que se muestran a continuación.

Vial	Conc. Etanol (mg/ml)	Respuesta
1	0.0030	0.0032
2	0.0060	0.0057
3	0.020	0.019
4	0.060	0.063
5	0.20	0.20
6	0.60	0.61
7	1.2	1.2

Al analizar las muestras problemas en lugar de las 4 diluciones de la solución estandar, los resultados que obtuvimos también fueron exactos y se calcularon con la misma relación de áreas. Obteniendo primero el área del pico problema y

después se obtiene la relación con el área del N-propanol y se lee en las curvas la concentración correspondiente.

En los resultados de las muestras problema en 9 de los pacientes sin antecedentes alcohólicos no se detectó etanol, sin embargo en los pacientes con antecedentes alcohólicos las cantidades que se detectaron fueron más elevadas. Estos valores concordaron bien con aquellos calculados por dilución como lo muestra la tabla I.

TABLA I.-

Con antecedentes alcohólicos

Conc. Etanol mg/ml por dil.	Conc. Etanol mg/ml por Cromatog.
0.55	0.51
0.72	0.73
0.38	0.32
0.45	0.43
1.0	0.98
0.88	0.90
0.075	0.076
0.63	0.60
0.082	0.081
1.1	1.0
0.81	0.83
0.50	0.51
0.92	0.92
0.60	0.58
0.72	0.68
1.05	1.1
1.3	1.2
0.71	0.73
0.049	0.044
0.86	0.85
0.096	0.098

0.35	0.32
0.84	0.81
0.42	0.43
0.78	0.80
1.5	1.2
0.98	0.95
0.093	0.090
0.83	0.77

Sin antecedentes alcohólicos

Conc. Etanol mg/ml por dil.	Conc. Etanol mg/ml por Cromatog.
0.0083	0.0076
0.0046	0.0042
0.0051	0.0052
0.040	0.038
0.038	0.035
0.28	0.29
0.0035	0.0030
0.070	0.067
0.0062	0.0058
0.46	0.48
0.18	0.17

En lo que se refiere a los experimentos llevados a cabo para estudiar diferentes factores, estos nos llevaron a los siguientes resultados.

Respecto al tiempo de almacenamiento con muestras congeladas con nitrito de sodio, no hubo ninguna diferencia significativa y las casuales que se observaron pueden ser atribuídas al ajuste diario del instrumento.

Las muestras refrigeradas con nitrito, se caracterizaron por un incremento en la respuesta con el tiempo de almacenamiento como se observará en las tablas II y III respectivamente.

TABLA II.- Resultados de tiempo de almacenamiento a 4°C; Con y sin Nitrito de sodio.

Conc. Etanol mg/ml	Inicial		1 semana		2 semanas	
	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
0.0060	--0.00307	--0.00335	0.00371	--0.00279	0.00438	--0.00210
0.020	---0.0110	---0.0116	0.0129	---0.0116	0.0136	---0.00974
0.060	---0.0375	---0.0354	0.0415	---0.0367	0.0403	---0.0317
0.20	---0.0130	---0.0140	0.148	---0.132	0.151	---0.131
0.60	---0.434	---0.420	0.496	---0.489	0.484	---0.481

TABLA III.- Resultados de tiempo de almacenamiento a -17°C Con y sin Nitrito de sodio.

Conc. Etanol mg/ml	Inicial		1 semana		2 semanas	
	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
0.0060	--0.00350	---0.00234	0.00421	--0.00173	0.00401	--0.00159
0.020	---0.0120	---0.0101	0.0131	---0.00938	0.0124	---0.00807
0.060	---0.0394	---0.0384	0.0426	---0.0331	0.0401	---0.0277
0.20	---0.145	---0.138	0.152	---0.144	0.146	---0.137
0.60	---0.501	---0.475	0.531	---0.506	0.477	---0.472

Observamos que en el tiempo de equilibración la presencia ó -- ausencia de Nitrito de sodio en la solución estandar interna -- es muy importante ya que con nitrito el equilibrio se alcanza en 3 minutos y se mantiene 45 minutos y sin nitrito parece haber una constante caída de la respuesta con el tiempo después

de 15 minutos de equilibrio a 60°C como le muestra la tabla IV.

TABLA IV.- Resultados de los tiempos de equilibrio a 60°C, Con y sin Nitrito de sodio.

Tiempo en min.	Con	Sin
1	0.0394	0.0317
3	0.0458	0.0337
5	0.0429	0.0344
10	0.0440	0.0345
15	0.0454	0.0334
30	0.0448	0.0326
45	0.0479	0.0301

Como resultado de estos estudios podemos decir que las muestras con solución de estandar interna con Nitrito de sodio, pueden ser almacenadas en un congelador, por lo menos 4 semanas y que además el tiempo de equilibración que parece ser el óptimo a 60°C es de 3 minutos.

Por último tenemos los resultados obtenidos en el voluntario al que se le administró 15 ml. de etanol al 95 % diluído a 150 ml. con jugo de naranja; los que observamos en la Tabla V.

TABLA V.-

Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)	Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)
0.0	0.0	75	0.081
4	0.017	90	0.046
8	0.12	105	0.032
16	0.29	120	0.017
20	0.28	135	0.012
30	0.26	150	0.0074
45	0.19	165	0.0030
60	0.12	180	0.0024

Debemos tomar en cuenta que para todos los estudios que se realizaron por el método altura-espacio, fué de gran importancia la elección que se hizo de los reactivos que se utili

zaron, ya que como mencionamos, el fluoruro de sodio que se agregó a la solución estandar interna nos sirvió para inhibir el metabolismo de etanol así como la producción del mismo por el crecimiento de microorganismos; también el anticoagulante heparina de sodio en la sangre de transfusiones, eliminó la necesidad de tubos capilares heparinizados; el nitrito de sodio que efectivamente detuvo la oxidación de etanol a acetaldehído sobre todo a temperaturas elevadas.

C O N C L U S I O N E S .-

A través del desarrollo de este método cromatográfico para determinar etanol en sangre pudimos concluir lo siguiente:

- 1.- Debido a su gran sensibilidad se pueden detectar microgramos de etanol con gran precisión.
- 2.- La colección de muestras que como ya dijimos es de sangre capilar, nos facilita tomar la cantidad que sea necesaria y hacer las determinaciones de etanol que sean necesarias y sin grandes molestias para el paciente.
- 3.- El tiempo de proceso en el análisis que es de 15 minutos por cada determinación en comparación de otros métodos en los que el tiempo es mayor.
- 4.- Que es un método adecuado para la investigación toxicológica para determinar en pacientes sospechosos de alcoholismo agudo la cantidad de etanol de manera exacta, fácil y rápida.
- 5.- Se puede determinar también la concentración de etanol en sangre extraída de cadáveres, pero si se deja en reposo algunos días los resultados varían un poco ya que al transcurso de los días se generan pequeñas cantidades de alcohol etílico.

C A P I T U L O V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carl R. Noller
Química Orgánica
Editorial Internacional S A.
3^a Ed. 1968
Pág. 150 - 160
- 2.- Merrison R.T. and Boyd R.N.
Organic Chemistry
2^a Ed. Pág. 498-502
- 3.- Dr. Tietz Norbert W.
Química clínica moderna.
Nueva Ed. Interamericana.
Págs. 872-875
- 4.- Burguer Alfred.
Química médica.
Tome I
Págs. 127, 171
- 5.- A.T. Camerón
Manual de Bioquímica
2^a Edición.
- 6.- Novelli Armando
Química Orgánica
Medicamentos orgánicos
2^a Ed. Pág. 1967
- 7.- Mc Nair and Bonelli.
Basis bas Chromatography
Ed. Varian Aerograph
Pointed USA. 1969
- 8.- Gas Chromatography Abstracts 1962
Edited by C.E.H. Knapman, Institute
of Petroleum
London 1964

9.- Journal of Chromatographic Science

Vol. 7 Maye 1969

10.-R.N. Baker A.L. Alenty

Determinación de alcohol en sangre por Cromatografía
de gases.