



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA
E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS.
E.S.I.Q.I.E.**

*Validación del Método para determinación de Etanol, Metanol y
Acetona en Sangre de Muestras Forenses Por Cromatografía de Gases.*



**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL**

**PRESENTA:
ROCÍO SARAÍ CORTÉS PEÑA**

**DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.B. ADRIÁN WALDO CAPETILLO**



MÉXICO DF, MAYO DE 2013



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO



T-041-12

México, D. F., 12 de Marzo del 2012.

A la C. Pasante:
ROCÍO SARAÍ CORTÉS PEÑA
5 de Mayo No. 5
Barrio Santa Isabel
Tultepec,
Estado de México.
C.P. 54960

Boleta: Carrera: Generación:
2004320081 IQI 2004-2008

Mediante el presente se hace de su conocimiento que este Departamento acepta que el C. **Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo** sea orientador en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Tesis Individual**, con el título y contenido siguiente:

"Validación del método para determinación de Etanol, Metanol y Acetona en sangre de origen forenses por Cromatografía de gases con Headspace".

- Resumen.
Introducción.
I.- Generalidades de ciencia forense.
II.- Volátiles en sangre(Metanol, Etanol y Acetona)
III.- Cromatografía de gases.
IV.- Validación
V.- Experimentación
VI.- Resultados.
VII.- Análisis de resultados
Observaciones y conclusiones.
Bibliografía.
Anexos

Se concede un plazo máximo de un año, a partir de esta fecha, para presentarlo a revisión por el Jurado asignado.

Dr. Román Cabrera Sierra
Presidente de la Academia de Química Analítica

Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo
Profesor Asesor o Director
Ced. Prof. 1810866

Lic. Guillermo Alberto de la Torre Arteaga
Jefe del Departamento de Evaluación y
Seguimiento Académico

Dra. Guadalupe Silve Oliver
Subdirectora Académica

c. c. p.- Control Escolar.
GATA/ams



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO ACADÉMICO



T-041-12

México, D. F., 11 de junio de 2012.

A la C. Pasante:
ROCÍO SARAÍ CORTÉS PEÑA
PRESENTE

Boleta:
2004320081

Carrera:
IQI

Generación:
2004-2008

Los suscritos tenemos el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el borrador de la modalidad de titulación correspondiente denominado:

"Validación del método para determinación de Etanol, Metanol y Acetona en sangre de origen forenses por Cromatografía de gases con Headspace".

encontramos que el citado Trabajo de **Tesis Individual**, reúne los requisitos para autorizar el Examen Profesional y **PROCEDER A SU IMPRESIÓN** según el caso, debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se le hicieron.

Atentamente

JURADO


Ing. Lilia Mercedes Salacios Lazcano
Presidente


Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo
Vocal


M. en C. Sandra Soledad Morales Garcia
Secretario

c.c.p.- Expediente
GATA/rcr

Agradecimientos

Antes que nada quiero agradecer a dios por, darme todas las herramientas y poner en mi camino cada una de las personas que me han brindado su apoyo, cariño y conocimientos.

Gracias a Instituto Politécnico Nacional ESIQIE por albergarme a los largo de 5 años, y proporcionarme las instalaciones, profesores, material para mi formación profesional.

A mi Familia

Gracias a mis padres Elena Peña Casas y Antonio Cortés Pineda por la dedicación y apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera y durante mi desarrollo profesional. Gracias por los sacrificios que hicieron para la realización de este sueño, por su cariño, paciencia y comprensión, por cada consejo y principalmente gracias por ser mis padres.

Gracias a mis Hermanos Ananía Elena y José de Jesús Cortés Peña por acompañarme es este sueño profesional.

A mis Asesores

Lilia Palacios Lazcano, por toda su paciencia, cariño.
Por todo el apoyo recibido para realización de esta tesis
Gracias por la formación profesional y personal que me brindó, por todos los momentos de enseñanza que me permitió compartir a su lado, gracias por hacer crecer a esta profesionista, por ser mi maestra, mi ejemplo, y mi amiga.

A mis Abesores

Adrián Waldo Capetillo

Gracias por todas las facilidades, las instalaciones y material proporcionado para el desarrollo de la experimentación, por la paciencia, la comprensión, por todos los conocimientos compartidos. Y toda la experiencia para la realización de este trabajo. Gracias por la sencillez que lo caracteriza, por el ser humano que es, por el afecto que me brindo, los consejos y su amistad.

Sandra Soledad Morales García

Por el gran apoyo y soporte en la parte de validación, por la aportación de sus conocimientos y experiencia, por permitirme su amistad a la largo de mi estancia en el politécnico, por todo el apoyo y amistad.

Un agradecimiento al Q Gerardo León Domínguez pionero de la idea de esta tesis, por las facilidades que me brindo parar llevar a cabo este proyecto.

Al M en C. Ernesto Bernal Morales, por todo el soporte técnico, desarrollo, y revisión en la parte experimental. Gracias por su tiempo, apoyo y conocimientos que plasmo conmigo en este trabajo. Gracias maestro.

A los Químicos. José Luis Osorio Díaz, Q. Jose Luis Domínguez, Q. Raquel Huerta Aguilar, por su participación en parte de las pruebas de validación e implementación de método en el SEMEFO.



CONTENIDO.

| | Pag. |
|--|-------------|
| CAPITULO I GENERALIDADES DE CIENCIA FORENSE..... | 6 |
| 1.1. Historia..... | 7 |
| 1.2. Disciplinas..... | 8 |
| 1.3. Toxicología Forense..... | 9 |
| | |
| CAPITULO II VOLÁTILES EN SANGRE (METANOL, ETANOL Y ACETONA) | 11 |
| 2.1. Historia..... | 12 |
| 2.2. Farmacología..... | 13 |
| 2.2.1. Propiedades Físicas y Químicas | |
| 2.2.2. Toxicidad | |
| 2.2.3. Efectos en el organismo | |
| 2.3. Volátiles en muestras forenses | 22 |
| 2.4. Valoración Médico legal..... | 23 |
| 2.5. Estadística actual en el Servicio Médico Forense (SEMEFO).... | 24 |
| 2.6. Métodos de análisis..... | 27 |
| | |
| CAPITULO III CROMATOGRAFÍA DE GASES..... | 30 |
| 3.1. Fundamentos y Alcances..... | 33 |
| 3.2. Instrumentación..... | 35 |
| 3.2.1. Gas de arrastre y medidores de flujo | |
| 3.2.2. Inyector | |
| 3.2.3. Columnas | |
| 3.2.4. Detectores | |
| 3.2.5. Sistema de procesamiento de datos | |
| 3.2.6. Accesorios | |
| 3.2.7. Métodos de identificación y cuantificación | |
| | |
| CAPÍTULO IV VALIDACIÓN | 50 |
| 4.1 Definición de validación | 51 |
| 4.2 Importancia de la validación en mediciones analíticas | 52 |



| | Pag. |
|---|--|
| 4.3 | Cuándo y cómo debe validarse..... 53 |
| 4.4 | Parámetros de Validación 54 |
| | 4.4.1 Selectividad |
| | 4.4.2 Repetibilidad |
| | 4.4.3 Reproducibilidad |
| | 4.4.4 Límite de detección |
| | 4.4.5 Límite de cuantificación |
| | 4.4.6 Intervalo de trabajo o rango lineal |
| | 4.4.7 Sensibilidad |
| | 4.4.8 Robustez |
| | 4.4.9 Recuperación |
| CAPITULO V EXPERIMENTACIÓN..... | 63 |
| 5.1 | Metodología de análisis..... 64 |
| | 5.1.1 Material, equipo y reactivos |
| | 5.1.2 Condiciones cromatográficas |
| | 5.1.3 Preparación de soluciones |
| | 5.1.4 Preparación de la curva de calibración |
| 5.2 | Desarrollo de la validación..... 74 |
| 5.3 | Análisis de muestras..... 78 |
| | 5.3.1 Muestreo |
| | 5.3.2 Preparación de la muestra |
| | 5.3.3 Análisis Cualitativo y Cuantitativo |
| CAPITULO VI RESULTADOS..... | 83 |
| CAPITULO VII ANÁLISIS DE RESULTADOS, OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES..... | 169 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 174 |
| ANEXOS..... | 176 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 192 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 194 |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS..... | 197 |



RESUMEN

El presente trabajo consta de una investigación teórica y experimental sobre la validación de la técnica analítica de identificación y cuantificación de etanol, metanol y acetona en sangre de origen forense empleando el método de cuantificación con estándar interno de cromatografía de gases acoplado a inyección por espacio de cabeza conocido por su nombre en inglés como “headspace”

El capítulo I establece una breve introducción de la ciencia forense, los antecedentes que la originaron, las evoluciones que ha tenido a lo largo del tiempo hasta llegar a las disciplinas que la conforman hoy en día, resaltando la toxicología forense que enfoca el área de interés de esta tesis.

En el capítulo II se engloban las propiedades físicas, químicas, farmacología y estatus legal, del metanol, etanol y acetona; Introduce los métodos de análisis para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (COV's) en sangre resaltando la cromatografía de gases usada actualmente por su confiabilidad en el área forense.

El capítulo III resalta los elementos más importantes de la técnica analítica “cromatografía de Gases”, los fundamentos, alcances, instrumentación, accesorios y métodos de cuantificación, seleccionando para el presente trabajo como método de cuantificación el de estándar interno.

El Capítulo IV introduce las generalidades, parámetros y conceptos de la validación, la importancia de entender, seleccionar y desarrollar correctamente los puntos al validar dará un resultado exitoso dentro de este proceso.

El capítulo V presenta el procedimiento experimental cualitativo y cuantitativo, realizado con muestra proporcionadas por el Servicio Médico Forense del D.F de los cadáveres que ingresaron en el período comprendido entre 01 Enero – 31 Diciembre del 2011, analizadas en un equipo de cromatografía de gases marca Agilent con Headspace y detector de Ionización de Flama, estableciendo un método validado que proporciona resultados verdaderos y con un alto grado de confianza para el uso de los peritos químicos del laboratorio de Química del SEMEFO – DF.



INTRODUCCIÓN.

La importancia de este trabajo radica en el gran número de accidentes viales que origina el consumo excesivo de bebidas alcohólicas, no sin dejar de lado los abusos físicos en el ambiente familiar y los delitos que han sido originados por esta misma causa. Dichas bebida contienen un grado permisible de etanol, y algunas bebidas adulteradas metanol y acetona no permisibles por su daño a la salud, la ingesta de un alto contenido de bebida lleva al ser humano a un nivel de intoxicación que origina un estado de inconsciencia y ausencia de movimientos y estímulos, por lo cual el análisis de COV's en sangre es importante dentro de un estudio toxicológico en el área forense.

La seguridad analítica de trabajar con una técnica validada en el área forense es de gran aplicación debido al tipo de muestras que se trabajan, que además de ser de origen biológico y algunas en estado de putrefacción, las muestras nunca son iguales, no se pueden volver a muestrear, el análisis debe de ser único y preciso por la fácil y rápida degradación de la muestra, los resultados que son emitidos por los peritos químicos siempre son cuestionados por el área legal penal, el no tener garantizado el correcto desempeño del método en, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación y las variantes que pueden afectar un resultado cualitativo y cuantitativo en el método, ocasionan que el perito emita un dictamen con un alto grado de incertidumbre en los resultados.

El estudio del contenido de metanol, etanol y acetona en sangre en el Servicio Médico Forense es de gran responsabilidad ya que los resultados emitidos afectan directamente situaciones legales críticas para los involucrados (seguros de vida, homicidios imprudenciales, custodias, violaciones, etc.) por mencionar los más relevantes, sin dejar atrás la responsabilidad legal penal que enfrenta el perito químico al emitir un resultado falso positivo o falso negativo.

Validar un método analítico aporta la confianza de que el resultado emitido es verdadero, dando seguridad tanto a los interesados como al perito químico en el posible cuestionamiento de su dictamen por parte de las autoridades legales.

La validación implementada en este trabajo de tesis asegura que el método de volátiles en sangre de origen forense es selectivo, preciso, reproducible y sensible cuantitativamente para el tipo de analitos, muestras, analistas, material y equipo, con que cuenta el Laboratorio de Química del Servicio Médico Forense del Distrito Federal.



La libertad, en todos sus aspectos, debe de estar basada en la verdad.
Solamente la libertad que se somete a la Verdad conduce
a la persona humana a su verdadero bien

CAPÍTULO I

GENERALIDADES DE LAS CIENCIAS FORENSES

Las Ciencias Forense son el conjunto de disciplinas auxiliares de la criminalística, cuyo objetivo es identificar, explicar, y aportar pruebas de los delitos así como la verificación de los autores y víctimas del mismo, mediante un conjunto de técnicas y procedimientos de investigación

La palabra *forense* viene del adjetivo latino *forensis*, que significa "perteneciente o relativo al foro" En la Antigua Roma, una imputación por crimen suponía presentar el caso ante un grupo de personas notables en el foro. Tanto la persona que se la acusaba por haber cometido el crimen como el denunciante tenían que explicar su versión de los hechos. La argumentación, las pruebas y el comportamiento de cada persona determina el veredicto del caso. La definición actual de ciencia forense es la aplicación de prácticas científicas dentro del proceso legal. Esencialmente esto se traduce en investigaciones altamente especializada, que ubican evidencias que proporcionan pruebas concluyentes al ser sometidas a pruebas en laboratorios con técnicas y equipos especializados para su estudio.



1.1. Historia

El origen de las ciencias forenses nace en China durante la dinastía Tang, en el siglo XIII se publicó un libro que explicaba cómo reconocer las señales de ahogo o estrangulamiento, o cómo las heridas podían revelar el tipo y tamaño del arma empleada.

En 1590 es inventado el microscopio y usado por la ciencia forense, más tarde en el siglo XIX es diseñando el primer detector de mentiras que registraba los cambios de presión sanguínea asociados a la tensión emocional.

El científico Wilhelm His dio inicio a la antropología forense, trabajó en la reconstrucción del rostro a partir de la estructura ósea, a finales del siglo XVIII Henry goddar consiguió relacionar una bala con el arma utilizada para dispararla a través de muescas.

En 1815 Mathieu Orfila se convierte en el padre de la toxicología al publicar el libro titulado "*Traité des Poisons*", una clasificación de los venenos más comunes usados por criminales. A partir de ese momento se hicieron muchos avances, James Marsh detecto rastros de arsénico en uñas y pelo posmortem.

Desde los primeros pasos de Marsh, las pruebas para detectar venenos o drogas se han hecho terriblemente sofisticadas, también se fue desarrollando otras áreas de las ciencias forenses, aplicando las bases de las Ciencias Naturales, Química, Física y Biología generando así las disciplinas que actualmente existen.

El avance en el área química crece a la par que el desarrollo tecnológico, actualizando las técnicas de identificación y cuantificación con instrumentos que proporcionan un análisis más preciso y rápido, como espectroscopía infrarroja, Absorción atómica, cromatografía de gas, cromatografía líquida de alta presión, espectrómetros de masa, electroforesis capilar entre otras más. Actualmente gracias a estas técnicas se pueden identificar un sin número de drogas y percursoros químicos en cantidades y concentración cada vez más bajas.

1.2. Disciplinas

Existen dos clasificaciones dentro de la criminalista, dentro de las cuales se pueden ubicar a la química forense como una de las disciplinas auxiliares. La criminalística general partió de tres ciencias básicas: Química, Física y Biología empleando las ramas de cada una de ellas (Figura 1.1)

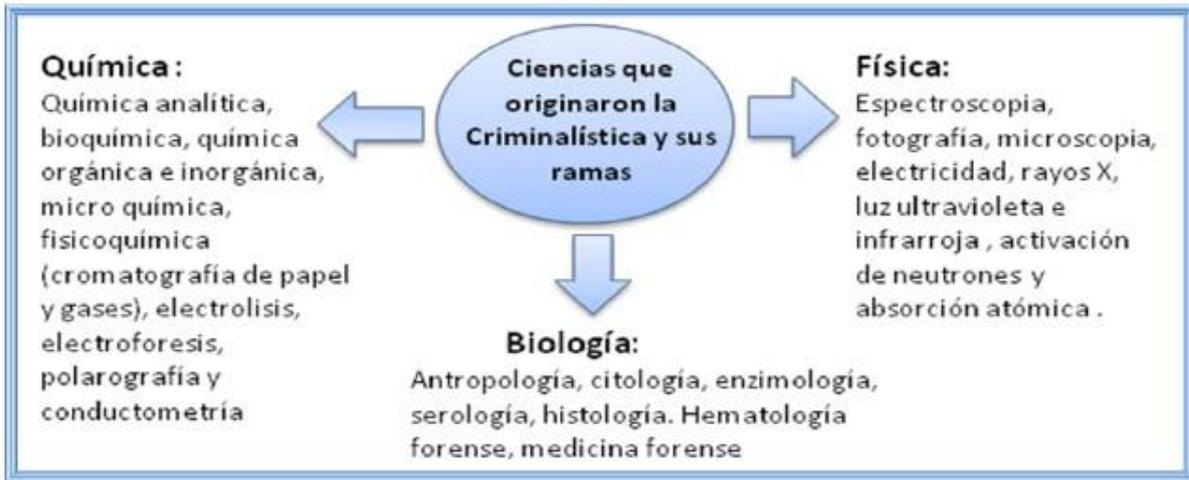


Figura 1.1 Ciencias que originaron la criminalística.

Las ciencias originales fueron desarrollándose y formando una serie de disciplinas especializadas, en la actualidad en México se pueden tener consideradas como parte de la criminalística las disciplinas especificadas en la figura 1.2

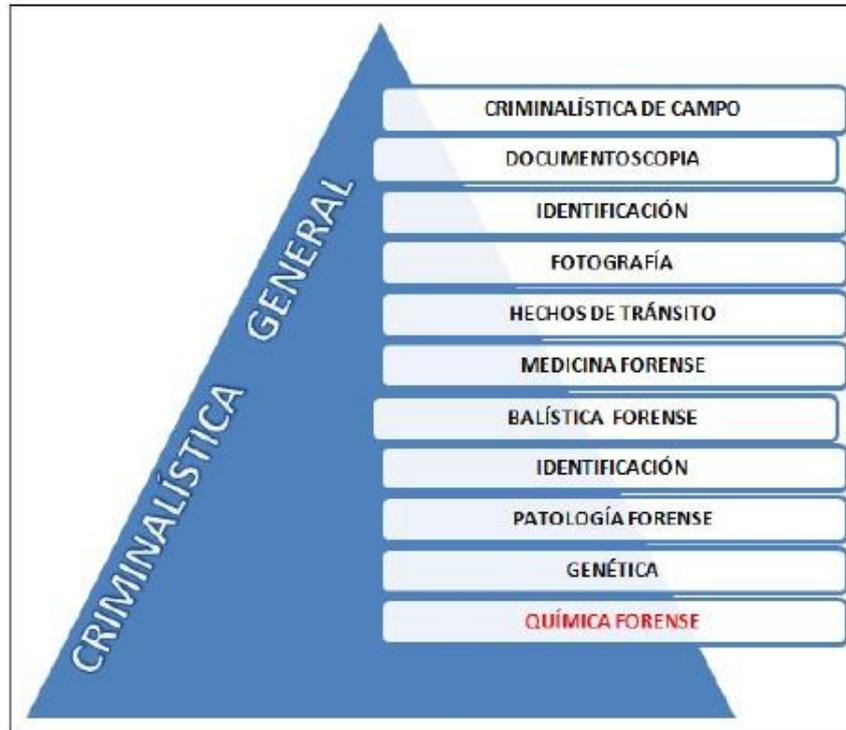


Figura 1.2 Áreas de la criminalística



La Química Forense asiste en la procuración y administración de justicia al identificar y en su caso cuantificar los tóxicos, químicos u otra clase de sustancias encontradas en el cuerpo humano o en decomisos de sustancias ilícitas, así como de manchas de fluidos biológicos encontradas en el lugar de los hechos o de hallazgo. En el área de Química Forense se pueden desglosar las siguientes líneas de estudio dentro de este laboratorio.

- ✚ Estudios Toxicológicos
- ✚ Pruebas en hechos relacionados con armas de fuego
- ✚ Rastreo hemático
- ✚ Análisis comparativo de pelo, fibras y residuos de pinturas.
- ✚ Análisis para la identificación y clasificación de drogas, y percusores químicos.
- ✚ Análisis de residuos tóxicos industriales.
- ✚ Análisis de muestras de incendio.
- ✚ Análisis relacionados con delitos sexuales

De todas las líneas de estudio del laboratorio de química se profundiza en Estudios Toxicológicos, debido al enfoque de esta tesis en el análisis de alcoholes.

1.3. Toxicología Forense

Es la ciencia que estudia los tóxicos y la relación entre cantidad de sustancia introducida al organismo y el efecto biológico obtenido, incluyendo propiedades químicas, identificación, cuantificación y tratamiento.

La toxicología se conoce desde la antigüedad, lógicamente el hombre primitivo, conoció el efecto venenoso de las sustancias a través de las mordeduras de animales venenosos y a través de la ingesta de plantas que le producían graves trastornos o la muerte. Se comenzaron a usar los alcaloides como la nicotina, la cual una sola gota era capaz de matar, en el siglo XVIII Y XIX se descubrió la forma de aislar el alcaloide.

Con la revolución industrial, se observó gran cantidad de tóxicos provenientes de la industria que originaban enfermedades y muertes en los obreros, enlazando los envenenamientos criminales con las intoxicaciones industriales.

La ciencia toxicológica se desarrolla con el avance de la electrónica y de medios físicos, los laboratorios de química analítica en el área forense han evolucionado de tal modo que existen técnicas y diversos equipos especializados (se inventó la cromatografía de gases y gases masas, que detecta cantidades traza de sustancias tóxicas) dando lugar a la Toxicología Analítica.



Dentro de los estudios toxicológicos más empleados en los laboratorios de química destacan

- Análisis de alcoholes (metanol, etanol, acetona)
- Análisis de inhalantes (benceno tolueno, xileno, CO)
- Análisis de drogas de abuso
- Análisis de medicamentos
- Análisis de venenos
- Análisis de intoxicación por insecticidas
- Metales pesados
- Sustancias corrosivas: ácidos y álcalis (blanqueadores y detergentes)

El laboratorio químico de la unidad de servicios auxiliares del Servicio Médico Forense del Distrito Federal colabora para establecer con certeza en el momento mismo de la muerte, el estado real de intoxicación ya sea por el consumo de alcohol etílico, consumo de drogas de abuso o algún otro tóxico que se encuentre presente en el individuo.

Esta entidad está comprometida con la mejora continua de las técnicas internacionales establecidas en los diversos análisis en materia de química forense. Con lo cual la investigación en esta área es fundamental, para ello cuenta con tecnología actual que obtiene resultados confiables en la identificación y cuantificación en materia de toxicología.

La intoxicación de alcohol etílico es una de las principales causas de muerte tanto directa como indirectamente, su identificación y cuantificación es de los análisis rutinarios en investigaciones forenses, para el estudio de esta sustancia se cuenta con un equipo de cromatografía de gases con inyección por headspace.

En el caso concreto de drogas de abuso, las normas internacionales marcan la identificación tanto de metabolitos así como de los principios activos, para lo cual se cuenta con equipos de orientación (VIVATWIN) y confirmación (Cromatografía de Gases – Masas) para el estudio de estos compuestos.

El desarrollo de este trabajo es sobre el análisis de COV's en muestras forenses para la búsqueda de sustancias relacionadas con el consumo de bebidas embriagantes, el método se lleva a cabo principalmente en matriz de sangre, los compuesto de interés dentro del método de rutina de sustancias volátiles son etanol, metanol, y acetona.



CAPÍTULO II

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV's) EN SANGRE (METANOL, ETANOL Y ACETONA).

Los análisis toxicológicos son de suma importancia para rastrear, identificar y cuantificar un tóxico presente en muestras biológicas posmortem, su estudio es rutinario dentro de un laboratorio de química forense.

El número de análisis de sustancias orgánicas volátiles en casos asociados a intoxicaciones es alto, el tipo de sustancias causales son variadas, van desde los inhalantes (benceno, tolueno, Xileno y etilbenceno), cetonas (acetona, Butanona), compuestos halogenados (diclorometano, cloroformo), pesticidas, organofosforados, algunas drogas de volatilidad media, y de las más importantes el análisis de alcoholes (metanol, etanol, propanol ó butanol) por el consumo excesivo de bebidas embriagantes.

La importancia del estudio de alcoholes en toxicología es debido al gran número de casos asociados a intoxicaciones por el resto de las sustancias orgánicas volátiles, drogas ó fármacos es menor comparados con los relacionados con el estudio específico de alcohol etílico, como influencia en la cusa de muerte y no por ello carecen de interés e importancia toxicológica.



2.1. HISTORIA

La presencia de COV's en sangre tiene varias fuentes, por ejemplo, el consumo de inhalantes aporta contenido de tolueno, benceno y xilenos, la intoxicación en un incendio introduce cantidades de CO en la sangre, la exposición en actividades laborales a algún tipo COV's acumula cantidades de este compuesto en el organismo, el mismo metabolismo y proceso de putrefacción general algunos COV's como acetaldehído, por ejemplo dentro de cuerpo.

Una de las fuentes más importantes es consumo de bebidas embriagantes, el etanol no es el único compuesto presente en las bebidas alcohólicas, cientos de químicos diferentes han sido detectados con los equipos analíticos avanzados, los compuestos pueden ser clasificados en ácidos, básico, neutros, ó designados como volátiles, semi volátiles y muy volátiles, muchos de estos compuestos son responsables de sabor y aroma de las bebidas además muchos de ellos pueden tener efectos farmacológicos, los límites cuantitativos son muy bajos comparados con la concentración del etanol, su contenido en algunos de ellos es regulado por su daño toxicológico (figura 2.1)

La adulteración de bebidas alcohólicas se realiza mediante la adición de ciertos compuestos químicos de bajo costo como son el alcohol metílico ó acetona, estas bebidas son vendidas a precios más económicos y su consecuencia a la salud puede causar la muerte. Por ello el estudio de alcoholemias incluye la identificación y cuantificación de Etanol (por el consumo de bebidas alcohólicas), Metanol y Acetona por el consumo de bebidas adulteradas.



Figura 2.1 Compuestos presentes en bebidas alcohólicas



2.2. FARMACOLOGÍA

La farmacología es la ciencia que abarca el conocimiento de la historia, origen y uso de los fármacos, así como sus propiedades físicas y químicas, asociaciones, efectos del fármaco sobre el organismo, y efectos del organismo sobre el fármaco (absorción, distribución, biotransformación y excreción) y de los procesos que estos sufren desde que se administran hasta que se eliminan. El fármaco es toda sustancia que introducida en el organismo interactúa con él y da un beneficio (medicamento) o un perjuicio (tóxico).

La disposición y destino del etanol en el cuerpo ha sido estudiada ampliamente desde los años 1930 seguido del trabajo pionero y de publicaciones de Erik M.P. Widmark. La investigación forense de alcohol se ha desarrollado junto a la investigación biomédica de alcohol, que está estrechamente ligada a la disposición del alcohol en el cuerpo y el análisis de etanol en fluidos corporales.

En este capítulo se desglosan las propiedades físicas, químicas, toxicológicas del etanol, metanol y acetona, principales componentes en las bebidas alcohólicas y por su interés en el estudio de alcoholemias

2.2.1. Propiedades Físicas y Químicas.

Las propiedades físicas y químicas del etanol, metanol y acetona, son desglosadas en las siguientes tablas, La importancia del conocimiento de las propiedades son de gran utilidad para el estudio de identificación y cuantificación.

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas del etanol

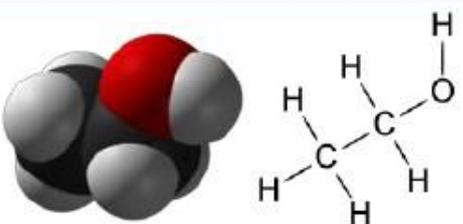
| | |
|---|-----------------------------------|
|  <p>Sinónimos: Alcohol etílico Fórmula semidesarrollada: C₂H₆O Fórmula desarrollada: CH₃-CH₂-OH</p> | ETANOL |
| | Peso molecular: 46.07 g/mol |
| | Densidad: 0.789 g/cm ³ |
| | Punto de ebullición: 78.0 °C |
| | Viscosidad: 1.074 mPa.s a 20°C |
| $\Delta H^{\circ}_f = -277.6$ KJ/mol | |



Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas del metanol

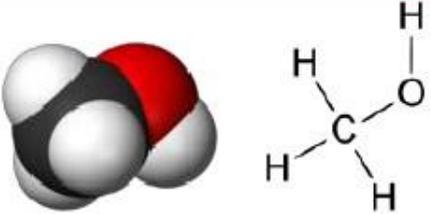
| METANOL | |
|---|--------------------------------------|
|  <p>Sinónimos: Alcohol metílico Fórmula semidesarrollada: CH₄O Fórmula desarrollada: CH₃-OH</p> | Peso molecular: 32.04 g/mol |
| | Densidad: 0.7918 g/cm ³ |
| | Punto de ebullición: 65 °C |
| | Viscosidad: 0.59 mPa.s a 20°C |
| | $\Delta H^{\circ}_f = -238.4$ KJ/mol |

Tabla 2.3. Propiedades fisicoquímicas de la acetona

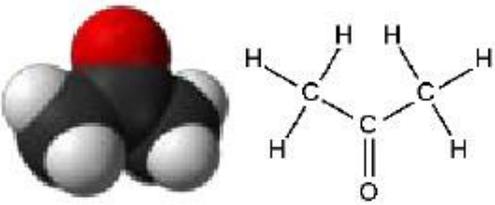
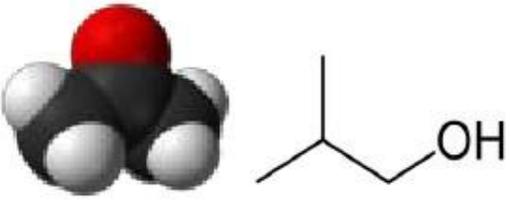
| ACETONA | |
|---|----------------------------------|
|  <p>Sinónimos: Dimetilcetona, β-cetopropano Fórmula semidesarrollada: C₃H₆O Fórmula desarrollada: CH₃-(CO)-CH₃</p> | Peso molecular: 58.04 g/mol |
| | Densidad: 0.79 g/cm ³ |
| | Punto de ebullición: 56°C |
| | Viscosidad: 0.32 cP a 20°C |
| | $\Delta H^{\circ}_f =$ ND |

Tabla 2.4. Propiedades fisicoquímicas del isobutanol

| ISOBUTANOL | |
|--|------------------------------------|
|  <p>Sinónimos: Alcoholisobutílico, isopropilcarbinol, 2-metil-1-propanol, alcohol 2- metilpropílico Fórmula semidesarrollada: C₄H₁₀O Fórmula desarrollada: (CH₃)₂-CH-CH₂-OH</p> | Peso molecular: 74.0 g/mol |
| | Densidad: 0.8030 g/cm ³ |
| | Punto de ebullición: 107.9°C |
| | Viscosidad: ND a 20°C |
| | $\Delta H^{\circ}_f =$ ND |



2.2.2. Toxicidad.

El alcohol etílico es una sustancia química, tóxica que ingerida en exceso provoca cambios inmediatos en la personalidad y va provocando un deterioro gradual en algunos órganos del cuerpo como el hígado, el cerebro, el páncreas y el corazón.

El etanol está considerado una droga porque altera una o más de las funciones del organismo. Su toxicidad varía de acuerdo a su origen. El más común es el alcohol etílico que se obtiene prácticamente con cualquier fermentación de frutas, aunque también se consumen los alcoholes producidos por granos, tallos y hojas.

Para que una droga ejerza efecto farmacológico debe entrar en el cuerpo en cantidades suficientes para llegar al sitio de acción. En comparación con la mayoría de las drogas de abuso, el alcohol es un agente farmacológico relativamente débil, debe ser ingerido en cantidades grandes para causar la sensación de euforia y embriaguez.

Todos los alcoholes y glicoles se metabolizan a través del alcohol-deshidrogenasa. El etanol es tóxico por afectación directa del sistema nervioso central. (Fig.2.2)



Figura 2.2 Efectos, Absorción y Eliminación del Alcohol



La concentración de alcohol en el cuerpo alcanzada después de beber, depende no sólo de la concentración de la dosis de etanol sino también de la velocidad de consumo de este, y las tasas de absorción, distribución y metabolismo en el cuerpo.

La figura 2.3 muestra la lista de muchos de los factores variables que intervienen en la disposición de etanol en el cuerpo, lo que hace que sea fácil de apreciar la razón de las grandes variaciones inter e intra – individuales en los estudios experimentales.



Figura 2.3 Múltiples factores que influyen en la concentración de etanol en el cuerpo.

Metabolismo del Alcohol: La principal enzima involucrada en la oxidación del etanol es NAD⁺ dependiente del alcohol deshidrogenasa que está localizado en el Citosol y el acetaldehído deshidrogenasa localizado en la mitocondria. Esta enzima no es específica para la oxidación de etanol porque otros alcoholes alifáticos tal como metanol e isopropanol, así como dioles (etilen glicol), reaccionan como sustrato al igual que el etanol.

Se pensaba anteriormente que el etanol se oxidó en cierta medida por la catalasa que es una enzima localizada en las peroxisomas. Sin embargo la falta de peróxido de hidrógeno necesario para que proceda esta reacción hace que esta vía sea menos probable.

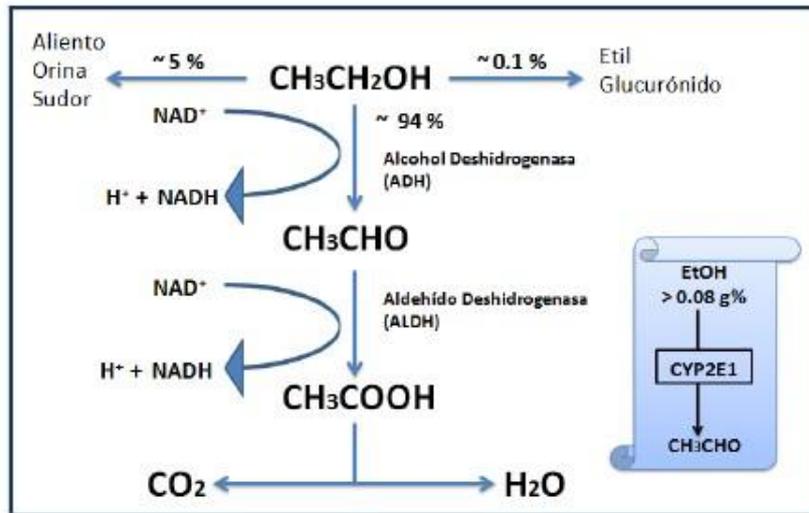


Figura 2.4 Metabolismo del etanol

Mucho tiempo se ha sabido que el hígado (ADH) es más selectivo para la oxidación de etanol que de metanol por lo que cuando ambos alcoholes están presentes en la sangre la oxidación de metanol en metabolitos tóxicos, formaldehído y ácido fórmico se impide.

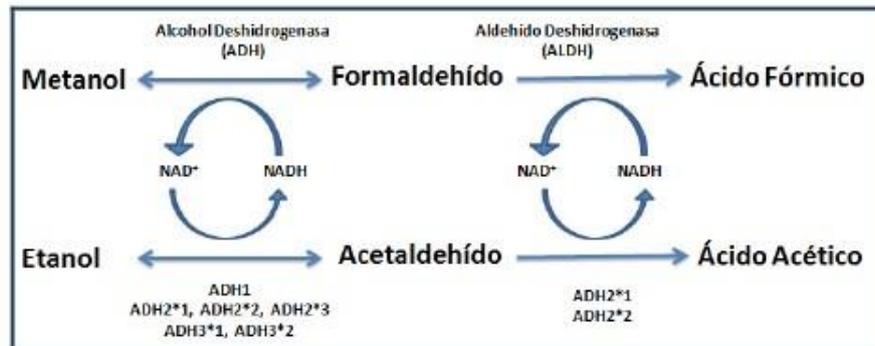


FIGURA 2.5. Metabolismo Etanol - Metanol

Toxicidad del Etanol: Puede ser dañino por inhalación, ingestión o absorción a través de la piel. El etanol es oxidado rápidamente en el cuerpo a acetaldehído, después a acetato y finalmente a dióxido de carbono y agua, y lo que no se oxida se excreta por la orina y el sudor.

- **Inhalación:** No existen síntomas significativos de un daño a la salud a consecuencia de la inhalación en los puestos de trabajo con buena circulación de aire. La inhalación prolongada de altas concentraciones de vapor (mayor a 5000 ppm y generalmente en zonas de pobre ventilación) puede irritar el tracto respiratorio superior y producir náuseas, dolor de cabeza, vómito, excitación o depresión, efectos en el sistema nervioso central, adormecimiento y otros efectos narcóticos.



- **Ingestión.** La ingestión de pequeñas cantidades (sobre 100 ml) puede causar un temporal malestar gastrointestinal y depresión del sistema nervioso central. Estos efectos son más severos en personas con problemas previos de salud. Dosis grandes provocan envenenamiento alcohólico. También se sospecha que la ingestión de etanol aumenta la toxicidad de otros productos químicos presentes en las industrias y laboratorios, por inhibición de su excreción o de su metabolismo. La ingestión constante de grandes cantidades produce daños al cerebro, riñones e hígado que conducen a la muerte. La ingestión de alcohol desnaturalizado aumenta los efectos tóxicos, debido a la presencia de los agentes desnaturalizantes, produciendo ceguera e incluso la muerte a corto plazo.
- **Riesgos reproductivos:** Existen evidencias de toxicidad al feto y teratogenicidad en experimentos con animales de laboratorio, tratados con dosis grandes durante la gestación. El etanol induce el aborto. En los seres humanos el consumo excesivo de bebidas alcohólicas durante el embarazo se asocia con el Síndrome de Alcohol Fetal en los bebés, con reducción del peso al nacer y defectos físicos y mentales. No existe evidencia de que tales efectos puedan ser causados por otra vía que no sea la ingestión directa de bebidas alcohólicas

Toxicidad del Metanol: El alcohol metílico se absorbe por todas las vías (oral, dérmica y respiratoria), aunque la absorción por piel difícilmente pueda dar lugar a intoxicaciones agudas. Con frecuencia se plantea el problema bajo la forma de intoxicación crónica. Una vez absorbido se dirige al hígado donde sufre procesos de oxidación a una velocidad 7 veces menor comparada con las del alcohol etílico o etanol. La enzima responsable de su transformación es la alcohol deshidrogenasa que lo oxida a formaldehído y éste a su vez es oxidado a ácido fórmico por la aldehído deshidrogenasa. La eliminación se realiza lentamente por vía respiratoria a través de los pulmones, pudiendo permanecer en el organismo hasta 4 días después de una dosis única. Alrededor de 3 a 5% se elimina sin metabolizar.

- **Intoxicación aguda:** La vía más frecuente de absorción en una intoxicación aguda es la digestiva. La dosis letal varía entre 20 y 100 ml aunque algunos autores informan dosis letales de 240 ml. La muerte por metanol va siempre precedida de ceguera. Se sabe que incluso 15 ml de metanol han causado ceguera y el responsable de ello es el formaldehído. De acuerdo a la dosis absorbida, las formas de presentación son las siguientes:



Forma leve: Sensación nauseosa, molestias epigástricas y cefaleas. Si el tiempo de absorción es de algunas horas se presenta visión borrosa

Forma moderada: Se producen vómitos. Hay taquicardia y depresión del sistema nervioso central. Si se produce el cuadro de embriaguez, es poco intenso y corto en su duración. La piel está fría y sudorosa, la visión es borrosa y hay taquipnea.

Forma grave: el paciente está en coma y presenta acidosis metabólica. La respiración es superficial y rápida. El color de la piel y las mucosas es francamente cianótico. Las dificultades para respirar pueden llegar al edema agudo de pulmón. La orina y el aliento huelen a formaldehído. Se presenta edema cerebral; coma y a veces convulsiones. Las intoxicaciones graves presentan insuficiencia renal aguda.

- **Intoxicación crónica:** La exposición crónica al metanol, fundamentalmente por vía respiratoria, produce alteraciones mucosas en las vías respiratorias superiores y en la conjuntiva. Se favorecen extraordinariamente los procesos alérgicos respiratorios, que mejoran en cuanto se evita el contacto con la sustancia. Si la cantidad absorbida es suficientemente alta, pueden producirse trastornos de la visión que oscilan desde la pérdida de la agudeza visual hasta la ceguera.
- **Relación entre la oxidación de etanol y metanol :** El metanol ocasiona menos ebriedad que el etanol y de hecho, este signo no es importante en la intoxicación por alcohol metílico, salvo que se consuma una cantidad muy grande o se ingiera además etanol. Hay un período de latencia asintomático de 8 a 36 hs. antes de que surjan los síntomas de la intoxicación.

Si el sujeto bebió etanol simultáneamente en volúmenes suficientes, puede retrasarse en grado extraordinario y a veces, abortarse la aparición de signos y síntomas de intoxicación por metanol. En tales casos, es notoria la intoxicación por etanol y quizás no se sospeche que el sujeto ingirió metanol.

El alcohol etílico compite con el alcohol metílico por la enzima alcohol deshidrogenasa, teniendo el primero mucha mayor afinidad por la enzima. De esta manera, el metanol se desvía de su ruta metabólica y no se biotransforma a formaldehído y ácido fórmico, responsables de su toxicidad.

Por los motivos mencionados, se utiliza etanol (alcohol puro) diluido en agua o en alguna bebida gaseosa para administración oral o soluciones adecuadas para administración intravenosa como tratamiento en una intoxicación con metanol. Se realiza un tratamiento alcalino (bicarbonato) para combatir la acidosis metabólica.

Toxicidad de la Acetona: La acetona se ha utilizado por muchos años como disolvente y se ha informado de muy pocos efectos tóxicos, por lo que ha sido considerado como un producto poco peligroso, en este sentido. Se ha observado que la presencia de acetona, aumenta la toxicidad al hígado de hidrocarburos clorados usados como disolventes, entre ellos 1,1-dicloroetileno y 1, 1,2- tricloroetano. Se excreta del organismo casi totalmente sin cambios, solo un poco se oxida a dióxido de carbono, acetato o formiato. A concentraciones de 5000 mg/m³ el líquido y el vapor pueden penetrar la piel. En concentraciones de aproximadamente 12000 ppm afecta al sistema nervioso central.

En general, los principales síntomas de una intoxicación por acetona son: cefalea, irritación ocular, vías aéreas superiores, incoordinación, náusea, depresión del sistema nervioso central, coma, falla cardíaca y respiratoria.

- **Inhalación:** En forma de vapor, causa irritación nasal y vías aéreas superiores, cefalea, náusea, depresión del sistema nervioso central.
- **Por ingestión accidental:** Causa irritación gástrica, dolor abdominal, náusea y vómito.

2.2.3. Efectos en el organismo.

Los efectos causados en el organismo por la presencia del etanol, se especifican en las figuras 2.6, 2.7 y 2.8.

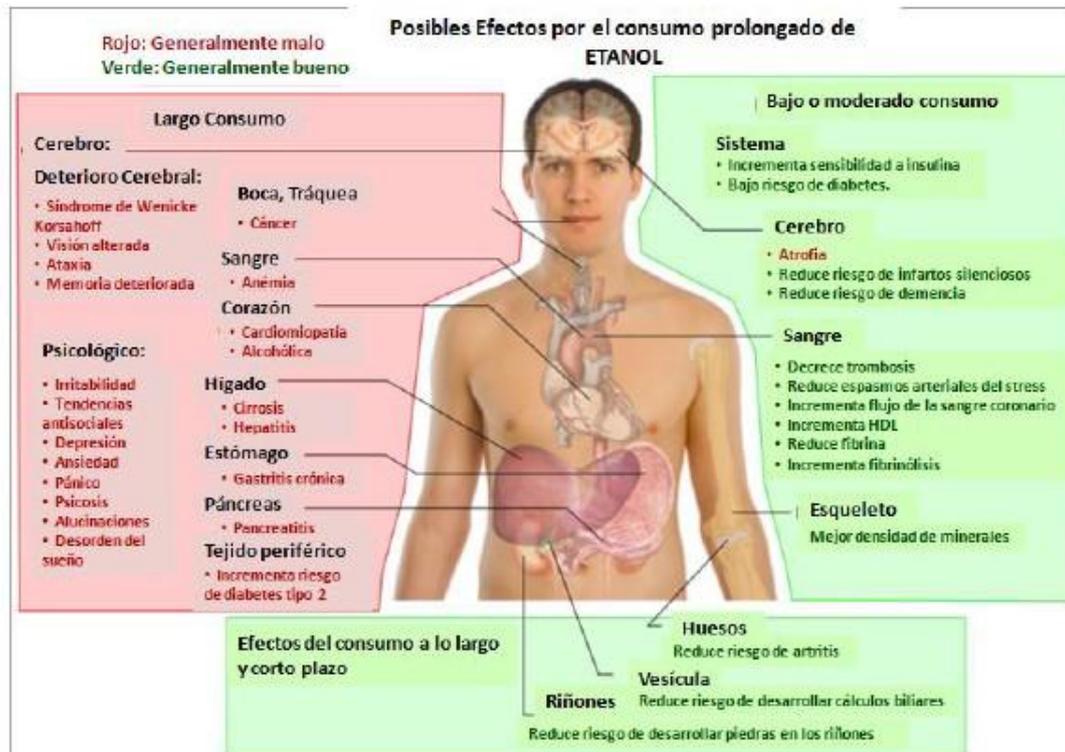


Figura 2.7. Posibles efectos del consumo prolongado de Etanol

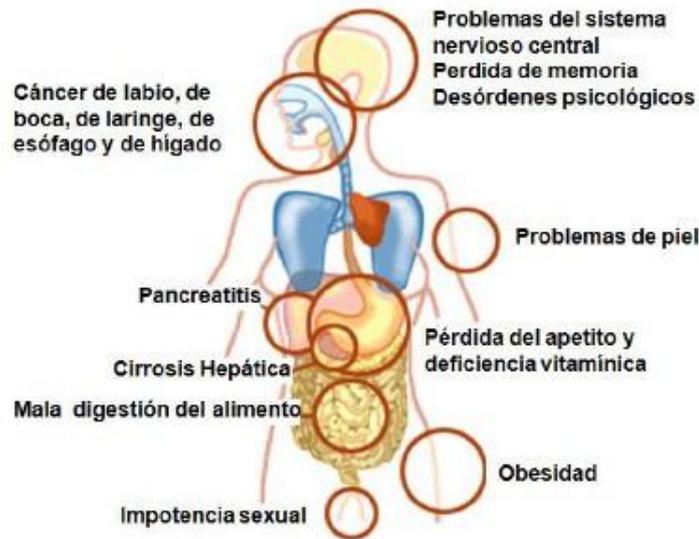


Figura 2.6 Efectos adversos del alcohol

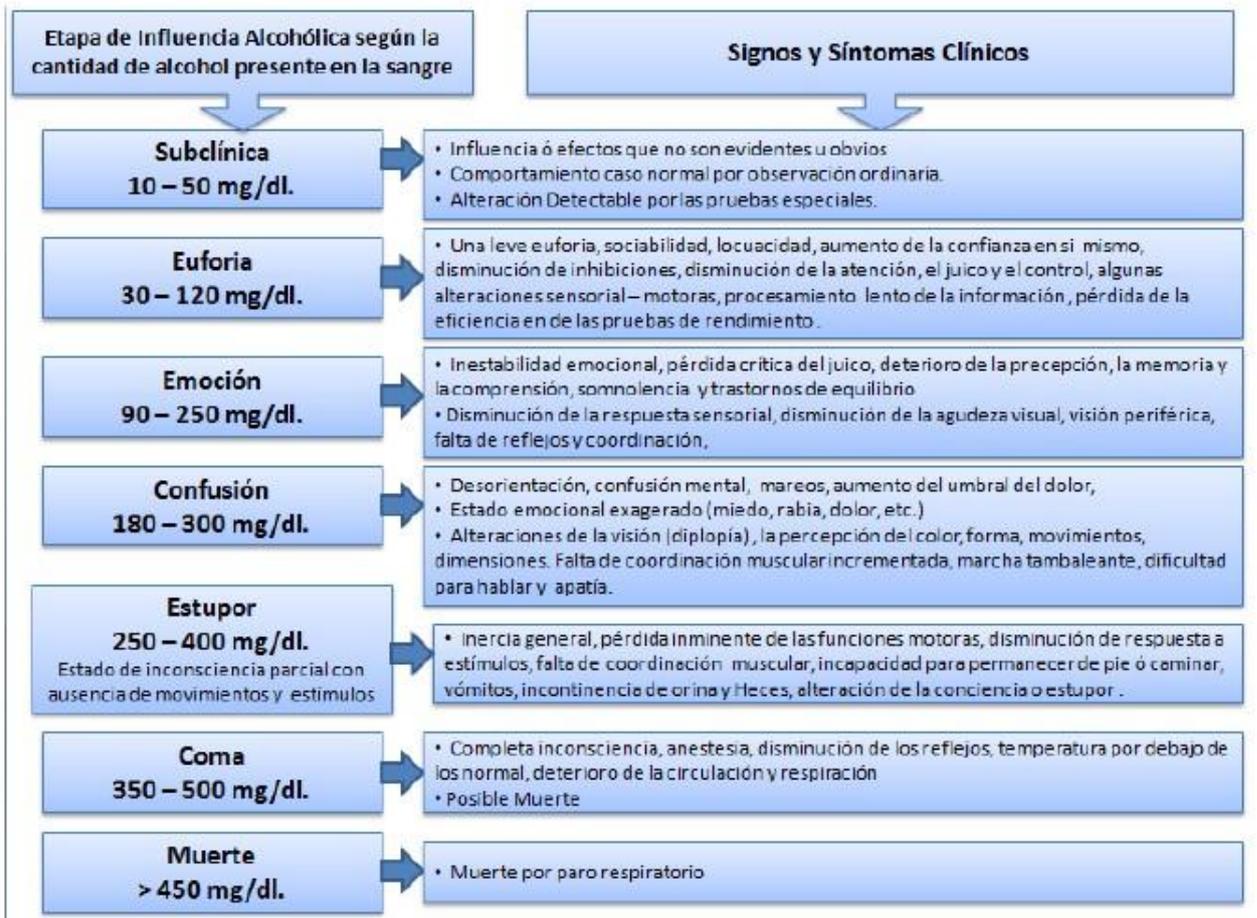


Figura 2.8. Influencia Alcohólica, signos y síntomas.
Tomada de James C. Garriott. Medical – Legal Aspects of Alcohol. 4 Ed.



2.3. COMPUESTOS VOLÁTILES EN MUESTRAS FORENSES

El trabajo en un laboratorio de toxicología forense ha de dar respuesta a los requerimientos judiciales en el análisis de sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas en las muestras forenses de distinto tipo de matriz.

Las muestras son de naturaleza muy amplia, lo que recae directamente en los métodos analíticos de tratamiento y extracción, que se establecerán acordes con cada tipo de muestra.

Cada tipo de muestra biológica puede aportar información acerca de la presencia de algún tóxico concreto o sus metabolitos en el organismo, teniendo en cuenta el tiempo de vida media, de eliminación, el volumen de distribución, la afinidad del tóxico por los distintos tejidos, etc. La sangre, el suero o el plasma, son las muestras de elección en general para las investigaciones, ya que la sangre es el fluido que se encarga de distribuir las sustancias por todo el organismo. Esto no quiere decir que sea la muestra más informativa ya que muchos tóxicos desaparecen pronto de ella.

En las siguientes tablas se muestran algunas sustancias volátiles que pueden estar presentes en muestra de sangre y sus tiempos de retención teóricos cromatográficos.

Tabla 2.5 Compuestos volátiles presentes en sangre

| Nombre | Fórmula | PM | Tr | Nombre | Fórmula | PM | Tr |
|--------------------|---------------------------------|-------|-------|-------------------|--|--------|-------|
| Ácido sulfídrico | H ₂ S | 33.99 | 3.22 | Éter etílico | C ₄ H ₁₀ O | 74.04 | 10.17 |
| Propeno | C ₃ H ₆ | 42.05 | 4.95 | Pentano | C ₅ H ₁₂ | 72.09 | 10.24 |
| Propano | C ₃ H ₈ | 44.06 | 5.17 | n- propanol | C ₃ H ₈ O | 60.06 | 10.88 |
| Metanol | CH ₄ O | 32.03 | 6.47 | Butanal | C ₄ H ₈ O | 72.06 | 11.52 |
| Acetaldehído | C ₂ H ₄ O | 44.03 | 6.74 | Cloroformo | CHCl ₃ | 117.91 | 11.61 |
| Isobutano | C ₄ H ₁₀ | 58.08 | 7.42 | Acetato de etilo | C ₄ H ₈ O | 88.05 | 11.77 |
| Butano | C ₄ H ₁₀ | 58.08 | 7.94 | Hexano | C ₆ H ₁₄ | 86.11 | 12.19 |
| Etanol | C ₂ H ₆ O | 46.04 | 8.60 | Benceno | C ₆ H ₆ | 78.05 | 12.55 |
| Acetonitrilo | C ₂ H ₃ N | 41.03 | 8.79 | n- butanol | C ₄ H ₁₀ O | 74.04 | 12.79 |
| Propanal | C ₃ H ₆ O | 58.04 | 9.35 | Heptano | C ₇ H ₁₆ | 100.13 | 13.85 |
| Sulfuro de carbono | CS ₂ | 75.94 | 9.48 | Propanoico | C ₃ H ₆ O ₂ | 74.04 | 13.99 |
| Diclorometano | CH ₂ Cl ₂ | 85.95 | 9.53 | Tolueno | C ₇ H ₈ | 92.06 | 14.35 |
| Acetona | C ₃ H ₆ O | 58.04 | 9.55 | Xilenos | C ₈ H ₁₀ | 106.08 | 15.97 |
| Isopropanol | C ₃ H ₈ O | 60.06 | 10.15 | γ - Butirolactona | C ₄ H ₆ O ₂ | 86.04 | 16.55 |
| Benzaldehído | C ₇ H ₆ O | 106.0 | 17.26 | | | | |



2.4. VALORACIÓN MÉDICO LEGAL.

En medicina legal es de suma importancia la valoración de alcoholemia a nivel judicial en la investigación de la muerte de un individuo. La muerte por intoxicación alcohólica es poco frecuente. Se analiza el alcohol en distintos fluidos, según el estado metabólico en que pudiera encontrarse, las diferencias entre unas muestras y otras en ocasiones son importantes por el resultado cuantitativo. La sangre venosa y el humor vítreo son fluidos adecuados y con buena correlación en los resultados. No obstante hay fenómenos de difusión pasiva o producción de alcohol endógeno por putrefacción que dificulta la interpretación.

La valoración postmortem de la alcoholemia puede permitir llegar a conclusiones sobre el mecanismo y etiología médico legal de la muerte (puede investigarse muertes por homicidio, suicidio o accidentes donde el valor de la alcoholemia permite calificar los hechos). En conclusión en medicina forense el alcohol es el tóxico cuya determinación se solicita con más frecuencia en el estudio necrótico y su investigación como dato probatorio en procedimientos civiles y penales está ampliamente demostrado.

Durante el desarrollo del estudios de alcoholemia, se debe considerar la correcta toma de muestra, debido a que de esta depende la certeza de los resultados , ya que en materia forense las muestra son únicas e irrepetibles, no es posible tomar nuevamente la muestra y en caso de ser tomada esta no emitiría un resultados reproducible a la muestra anterior por la putrefacción del cadáver.

Existen algunos casos en materia civil, penal y laboral en los cuales el influye de manera importante un resultados de alcoholemia. (Figura 2.9.)



Figura 2.9. Influencia legal de los resultados de alcoholemias.



2.5. ESTADÍSTICA ACTUAL EN EL SERVICIO MÉDICO FORENSE (SEMEFO)

Dentro del servicio médico Forense los estudios Toxicológicos son de suma importancia, en específico el estudio de alcohol se realiza en prácticamente todas las muestra que ingresan al laboratorio de química.

Durante el 2011 se concluyen mediante los siguientes gráficos, la cantidad de muestras, estudios de alcohol positivos, zonas de procedencia y edades de cadáveres ingresados al Servicio médico Forense en este período.

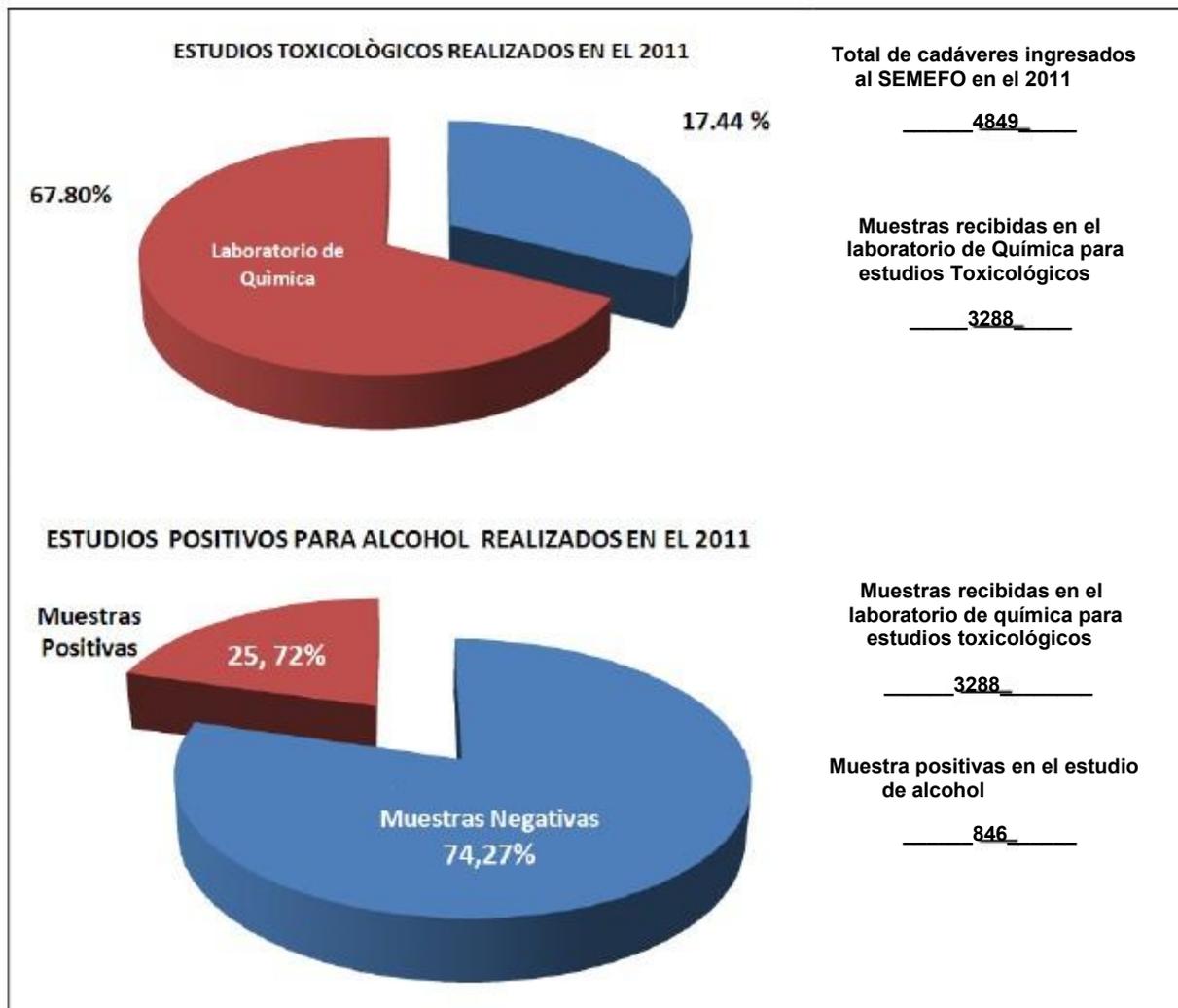


Figura 2.10 Muestras ingresadas en el laboratorio de química para estudios de alcohol

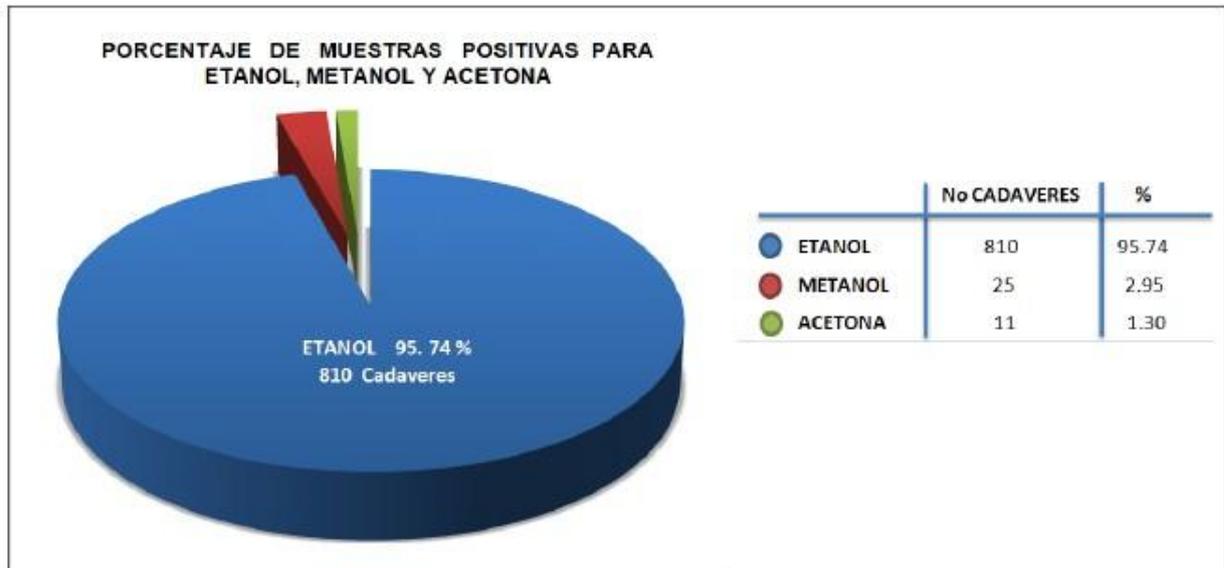


Figura 2.11. Porcentaje de muestras positivas a etanol, metanol y acetona

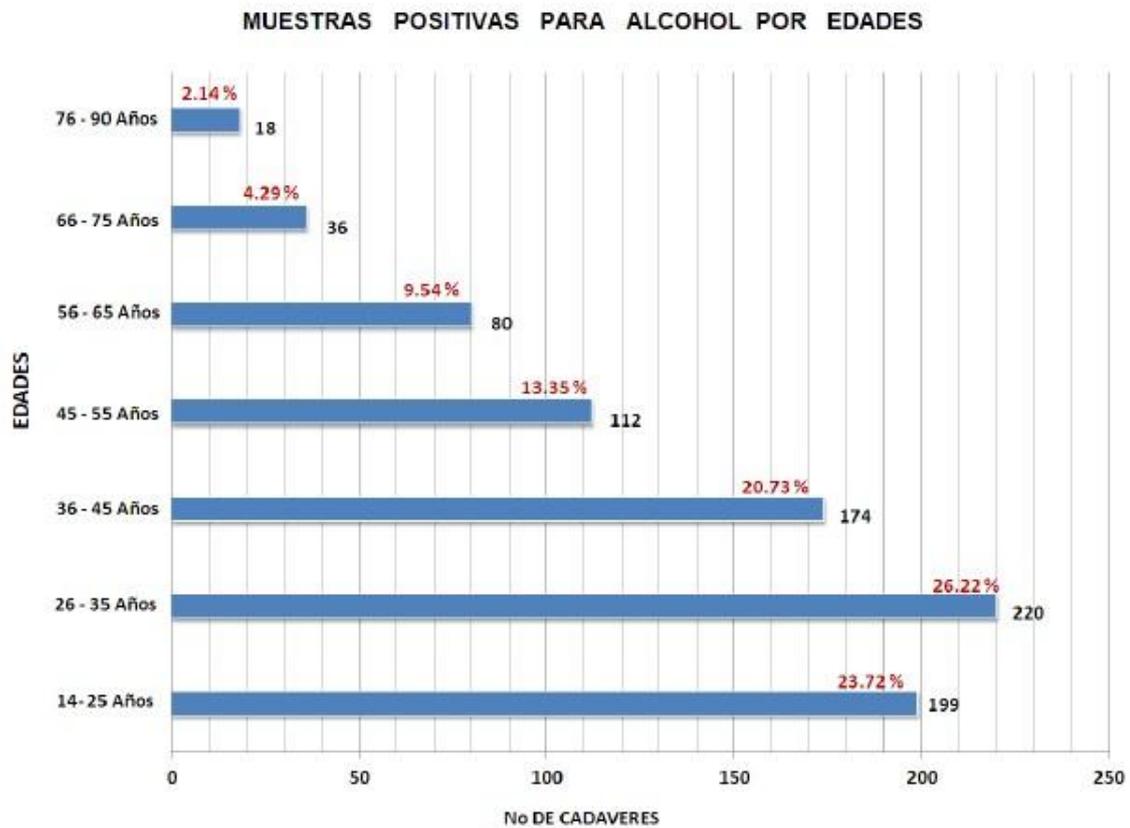


Figura 2.12. Porcentaje de muestras positivas en el estudio de alcohol por edades

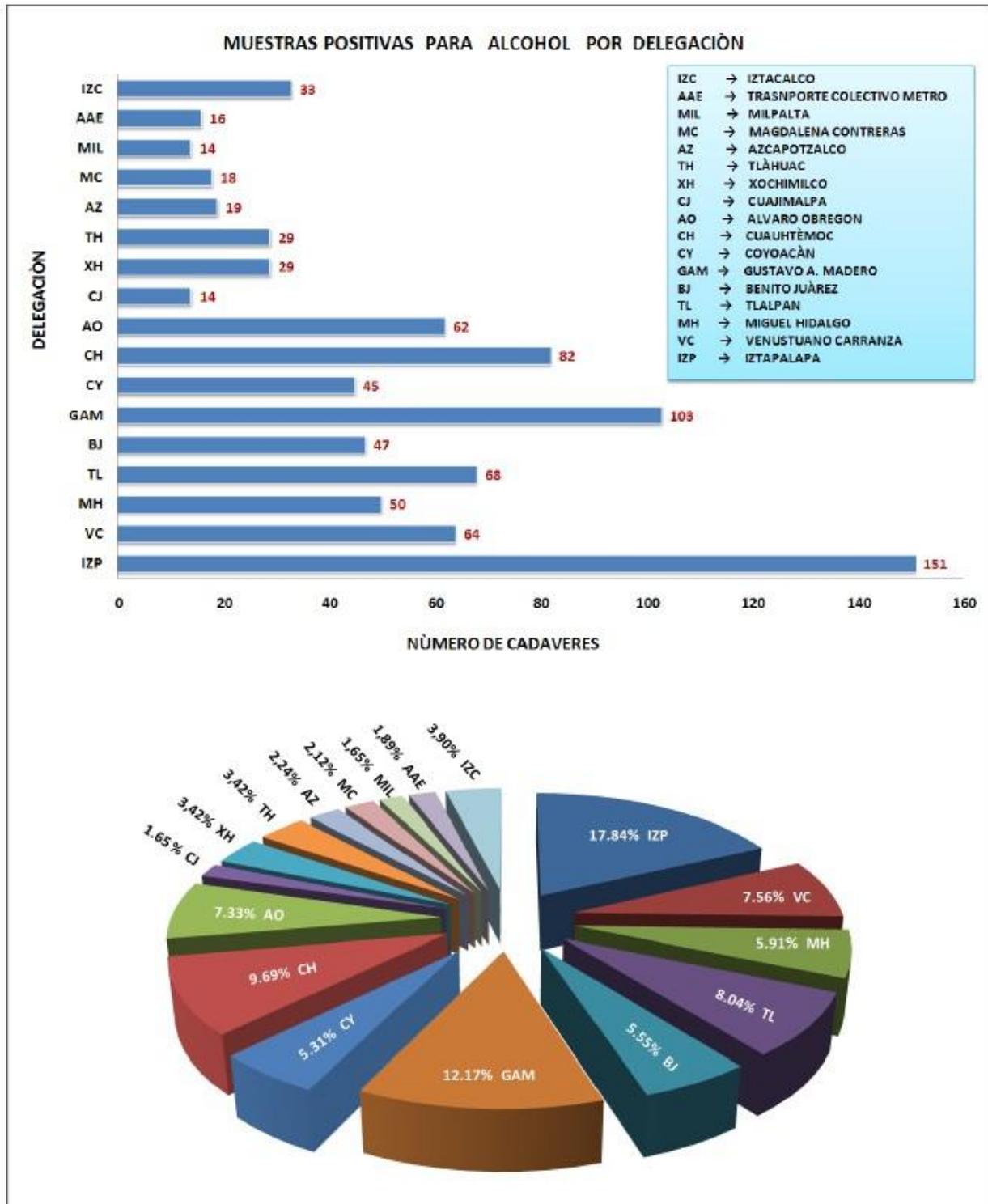


Figura 2.13 Muestras positivas a alcohol por Delegaciones.



2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Actualmente en la literatura se puede encontrar diversos métodos que indican la presencia de alcohol en sangre ya sea de forma cuantitativa o cualitativa, algunos de ellos se han ido modificando, otros han quedado en desuso o bien han sido suplantados por técnicas más modernas, rápidas y confiables. Los métodos pueden ser clínicos o bioquímicos:

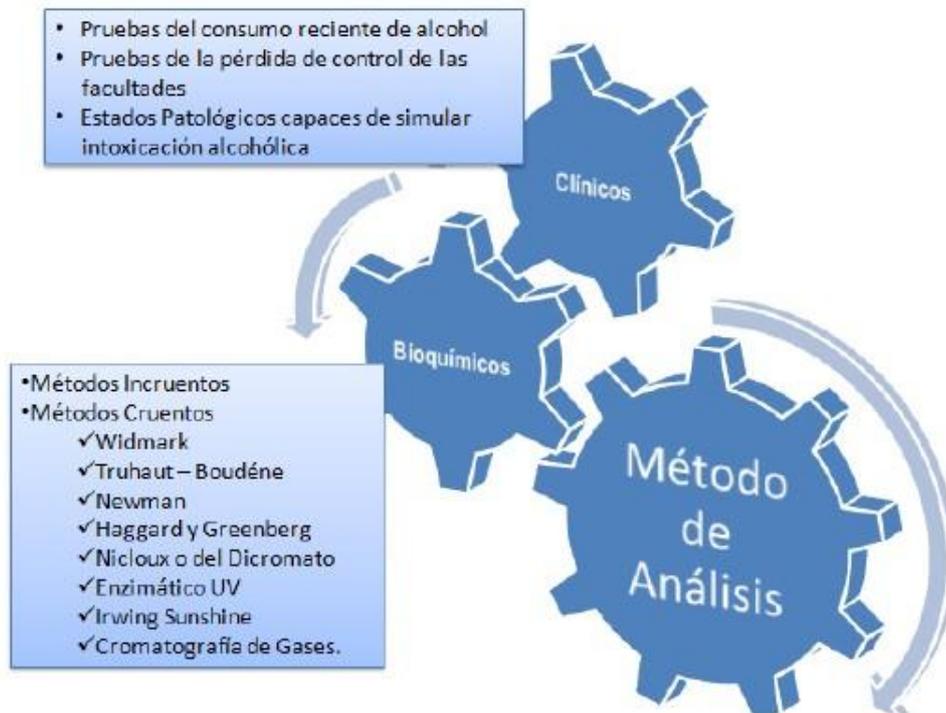


Figura 2.14 Métodos que indican la presencia del alcohol en sangre.

MÉTODOS CLÍNICOS:

No existe ningún síntoma aislado que sea peculiar del alcohol. Por otra parte, la resistencia individual frente al tóxico es muy variable, por lo que el juicio en cada caso concreto, debe ser prudente y nunca generalizador. Para establecer dicha influencia, deben aplicarse pruebas clínicas que logren determinar lo siguiente:



Métodos Clínicos

• **Pruebas de consumo reciente de alcohol:** La única prueba práctica es el olor a líquidos alcohólicos en el aliento y el las materias vomitadas en su caso.

1. El olor no depende del etanol, sino de los otros componentes de las bebidas.
 2. La intensidad del olor varía según la naturaleza del líquido, así como el tiempo transcurrido desde su ingestión.
 3. Algunas sustancias pueden desfigurar, atenuar o intensificar el olor.
 4. La percepción depende de la sensibilidad olfatoria de quién lo explora.
- Y todas en conjunto son pruebas subjetivas

• **Pruebas de la pérdida de control de las facultades:** Una conclusión correcta sólo puede lograrse considerando una combinación de varias pruebas y observaciones, tales como:

1. Lengua seca o alternativamente salivación excesiva.
2. Insolencia, lenguaje injurioso, excitación o indiferencia
3. Irritación y sufusión conjuntival.
4. Las pupilas pueden variar desde la más extrema dilatación a la máxima contracción.
5. Pérdida o confusión de la memoria
6. Caracteres de la respiración y, especialmente, presencia de hipo.

• **Estados patológicos capaces de simular una intoxicación Alcohólica:** El diagnóstico deberá hacerse a través de una anamnesis minuciosa, la exploración física completa de los principales sistemas orgánicos, con las pruebas funcionales pertinentes, y los exámenes completos de laboratorio.

Figura 2.15 Métodos clínicos de identificación de presencia de alcohol en sangre

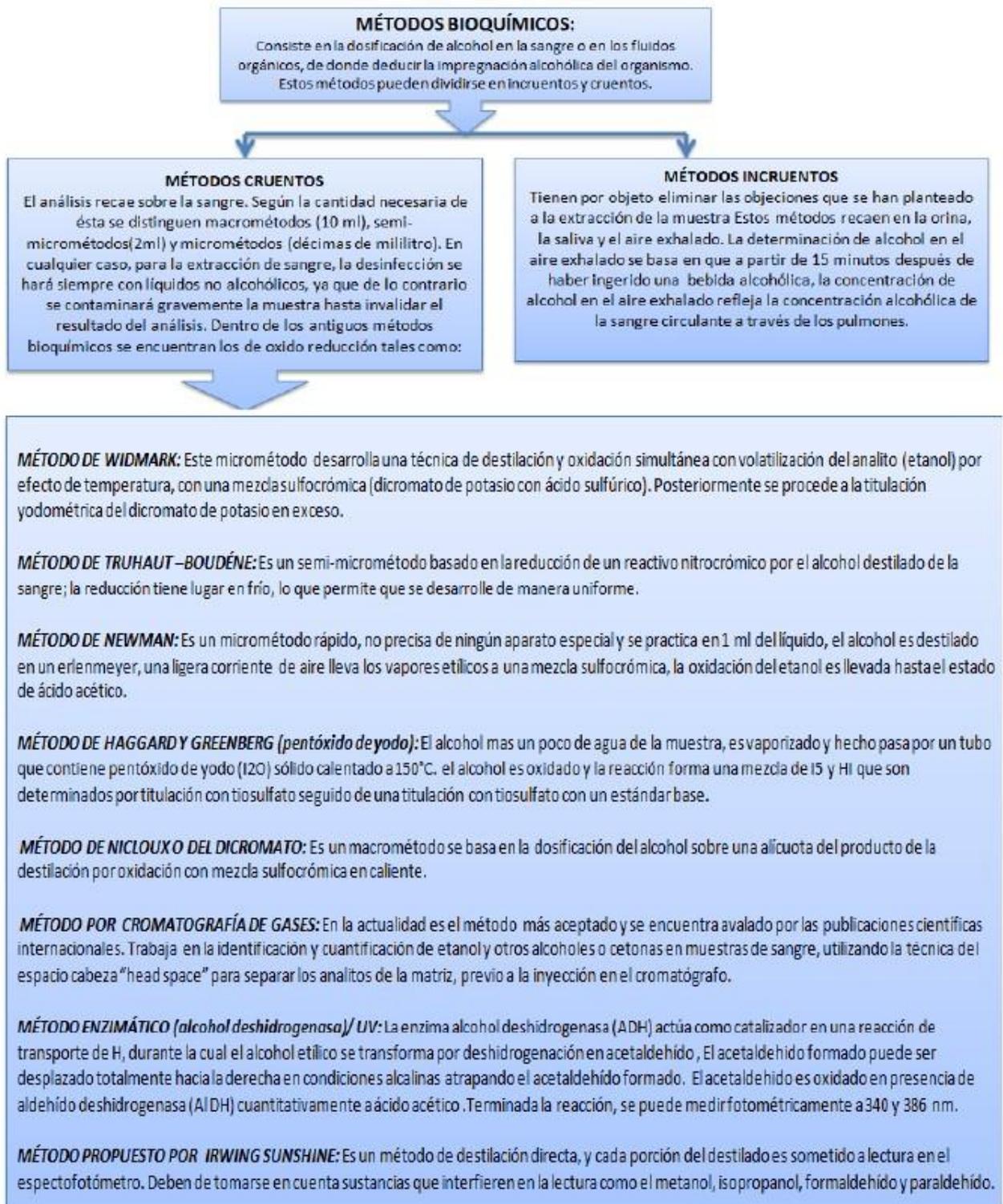


Figura 2.16 Métodos Bioquímicos para identificación de presencia de alcohol en sangre



CAPÍTULO III CROMATOGRFÍA DE GASES.

Los inicios de la cromatografía se dieron con la separación de colores, la evolución de esta técnica es desarrollada en la siguiente línea del tiempo (Figura 3.1)

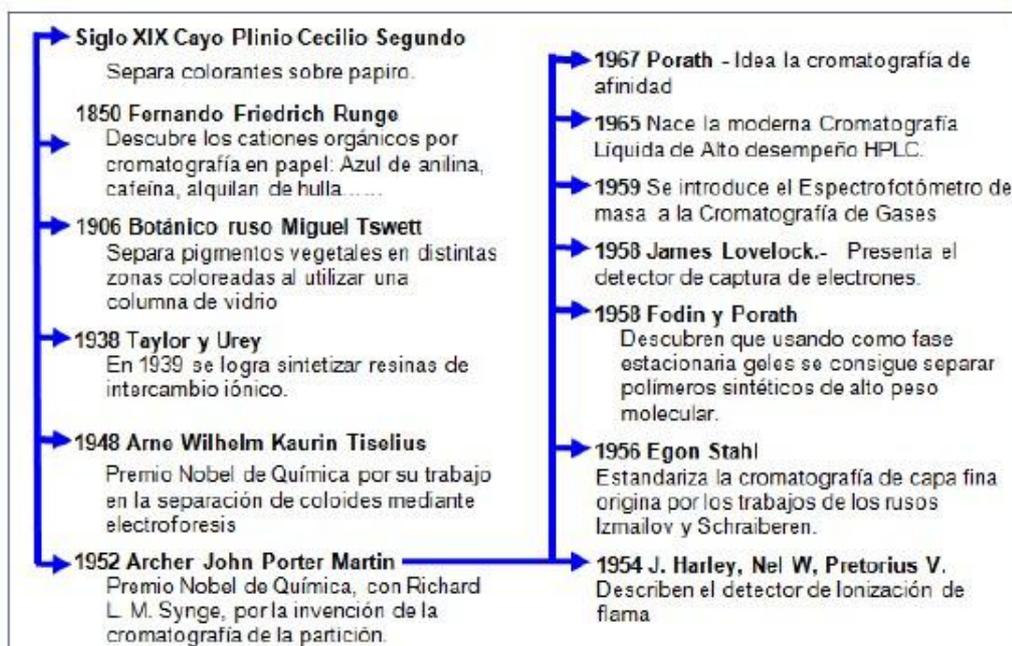


Figura 3.1. Línea del tiempo de cromatografía

La etimología de la palabra cromatografía deriva de dos vocablos griegos *khromatos*, Color y *graphos* que quiere decir escritura. La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia, las cuales han aumentado de gran manera debido a las necesidades crecientes de mejores métodos para separar compuestos estrechamente relacionados en mezclas complejas.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se pone en contacto dos fases mutuamente inmiscible una estacionaria y otra móvil, la muestra se introduce en la fase móvil, es transportada a lo largo de la columna (colector) que contiene un fase estacionaria distribuida, las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria, cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componente se separan gradualmente en bandas en la fase móvil, al final del proceso los componentes, ya separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria (figura 3.2)

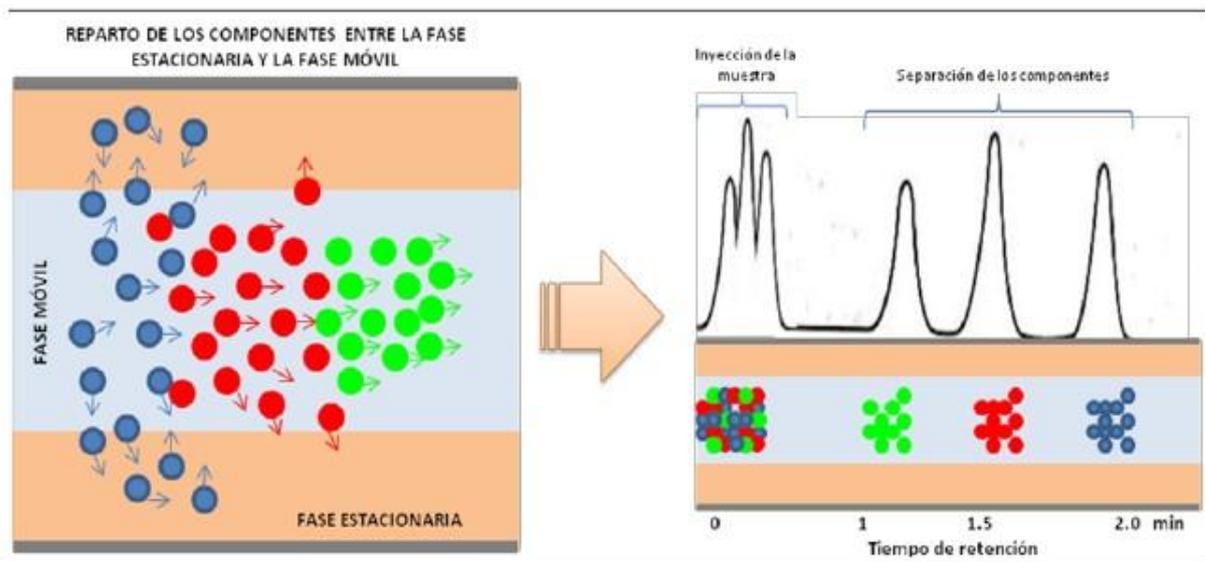


Figura 3.2. Separación Cromatográfica.

La clasificación de la cromatografía se resume en el esquema de la figura 3.3, se puede ampliar que la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columnas o superficies planas, por otra parte la cromatografía de gases y la de fluidos supercríticos está restringida a los procedimientos en columna, de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase estacionaria.



La fase móvil puede ser un gas ó un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido soportado.

De todos los tipos de cromatografía esta trabajo se enfoca en la Cromatografía de gases, los términos cromatográfico son los especificados en anexo 3.

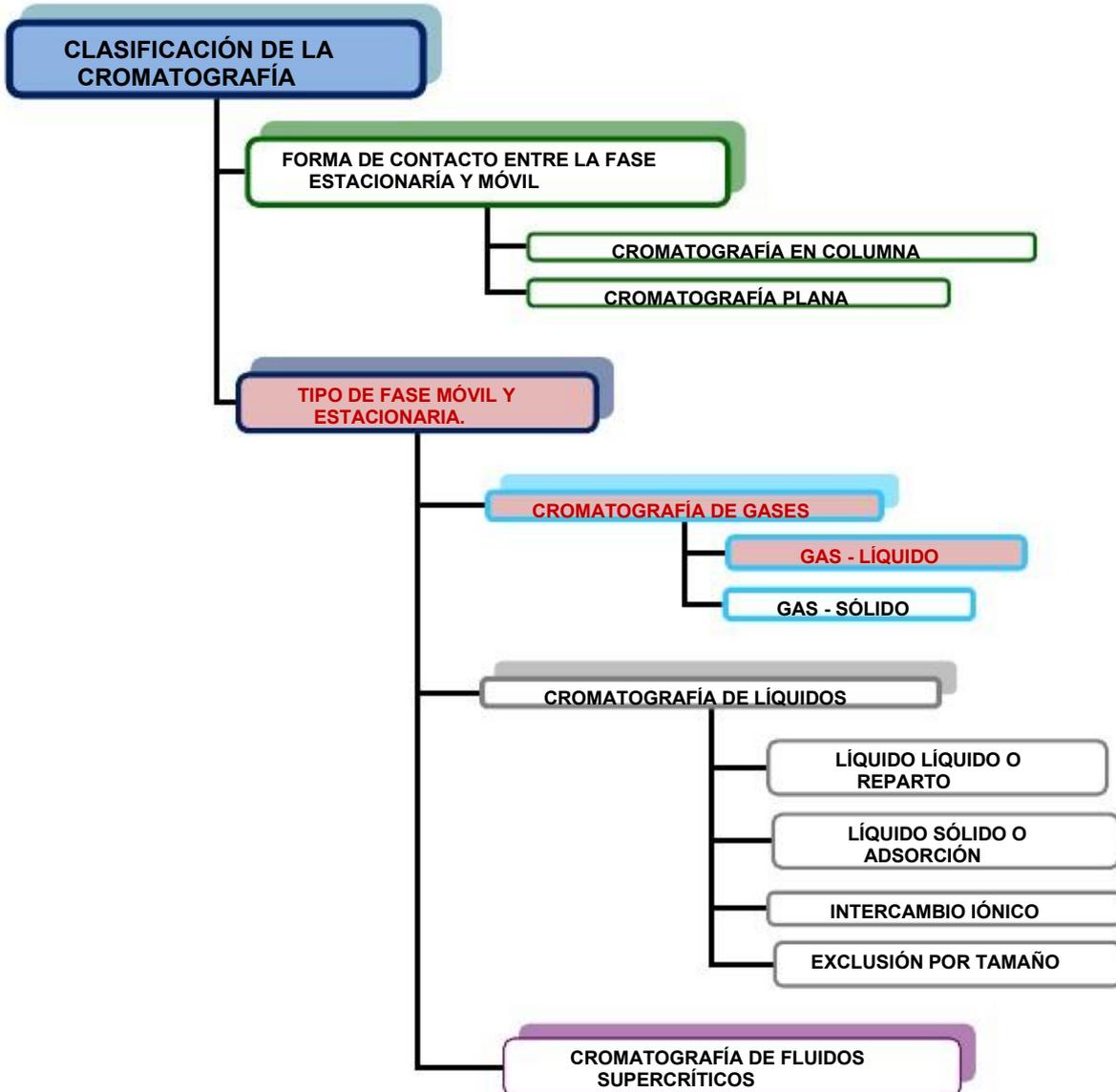


Figura 3.3. Clasificación de la Cromatografía.



3.1. Fundamentos y Alcances

La cromatografía de gases es la técnica ideal para la separación de una mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, la elución se produce por un flujo de gas inerte (Fase móvil) que no interacciona con la molécula del analito; su única función es transportar el componente a través de la columna, como se observa en la figura 3.4, en la cromatografía de gases existen dos tipos:

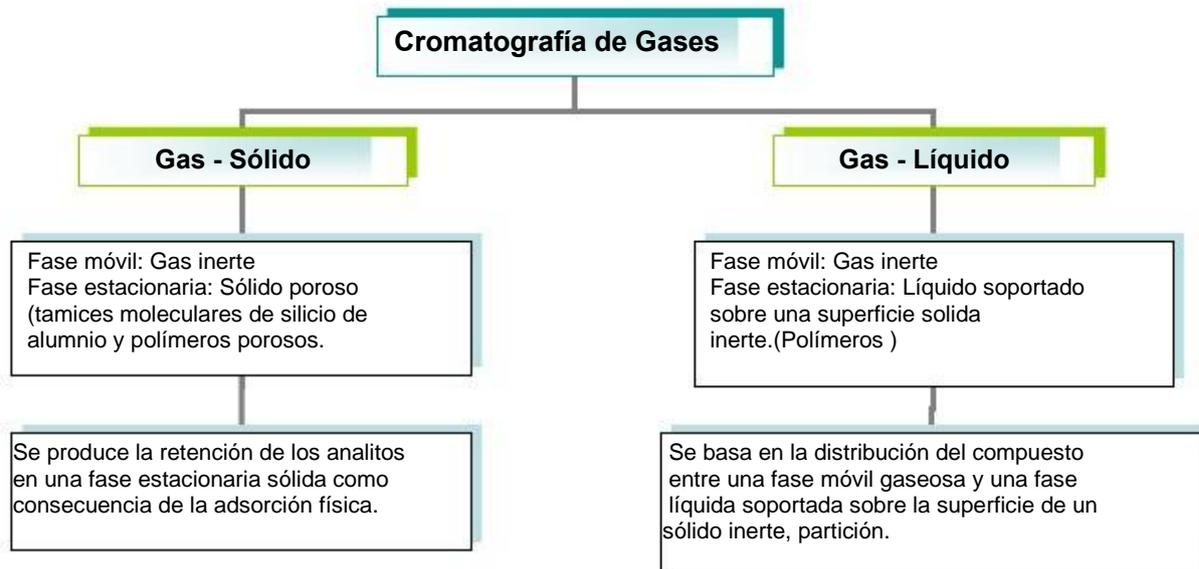


Figura 3.4. Tipos de Cromatografía de Gases

La técnica de cromatografía Gas – Sólido es poco utilizada debido a falta de linealidad de las isotermas de adsorción, tiempos de retención grandes y falta de reproducibilidad debido a que los sólidos adsorbentes son más difíciles de estandarizar, su aplicación se ha limitado a la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular.

Cromatografía Gas – Líquido (GLC):

La partición en GLC es una interacción entre la fase estacionaria líquida que está soportada sobre una superficie sólida inerte, y el componente que es transportado por la fase móvil, la retención de los componentes se llevará a cabo mediante la afinidad de la muestra con la fase estacionaria mediante una distribución por coeficientes de partición entre las dos fases, cada soluto se moverá a su propia velocidad a través de la columna formando una banda por cada soluto. Las bandas se separan en un tamaño dependiente de las proporciones de partición de los solutos y del grado de desplazamiento de las bandas; Los solutos eluyen sucesivamente en orden creciente de sus proporciones de partición y entran a un detector conectado a la salida de la columna. (Fig. 3.5).

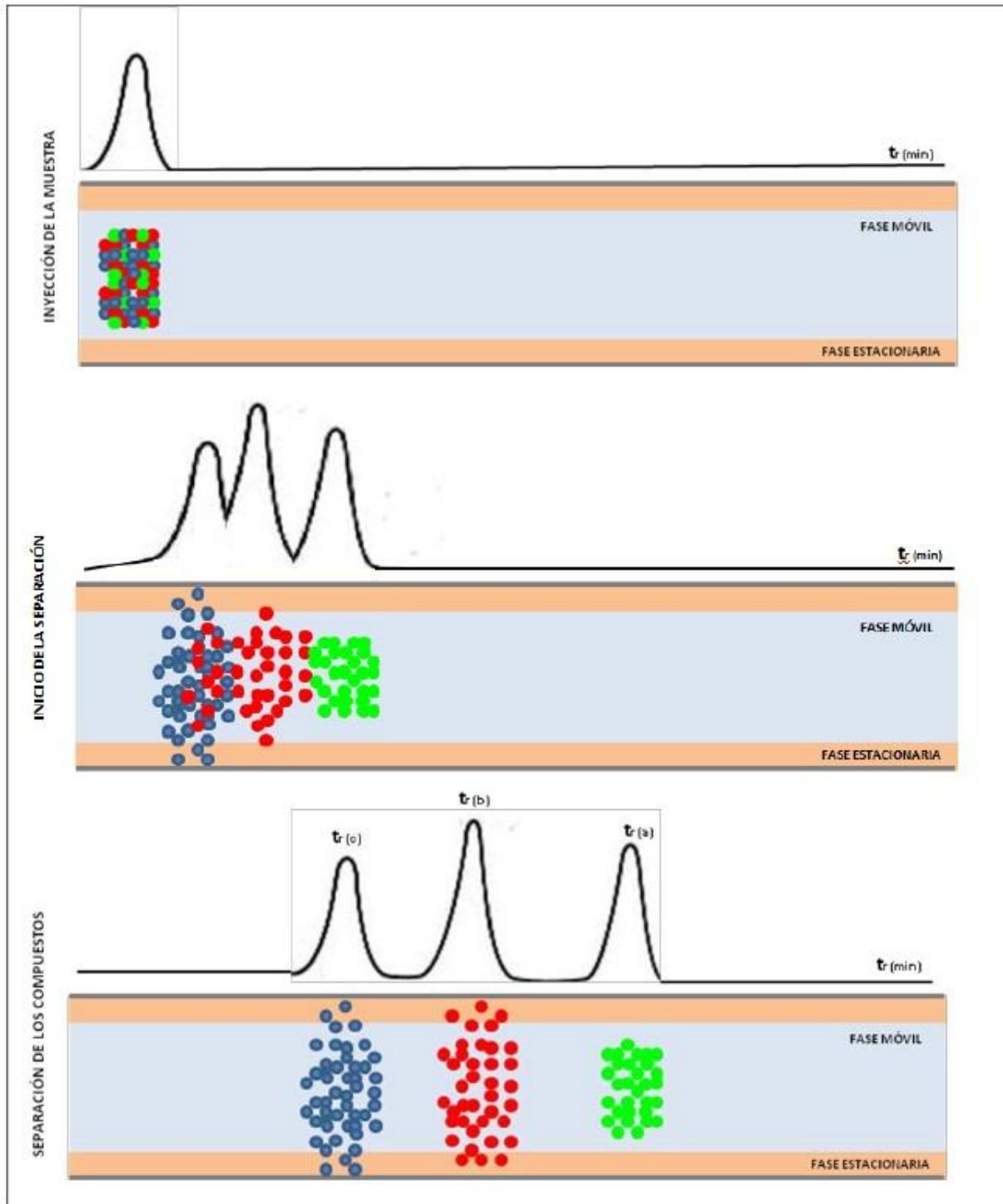


Fig. 3.5 Elución de componentes dentro de la columna



3.2. Instrumentación

Un cromatógrafo de gases consta de 6 componentes (figura 3.6)

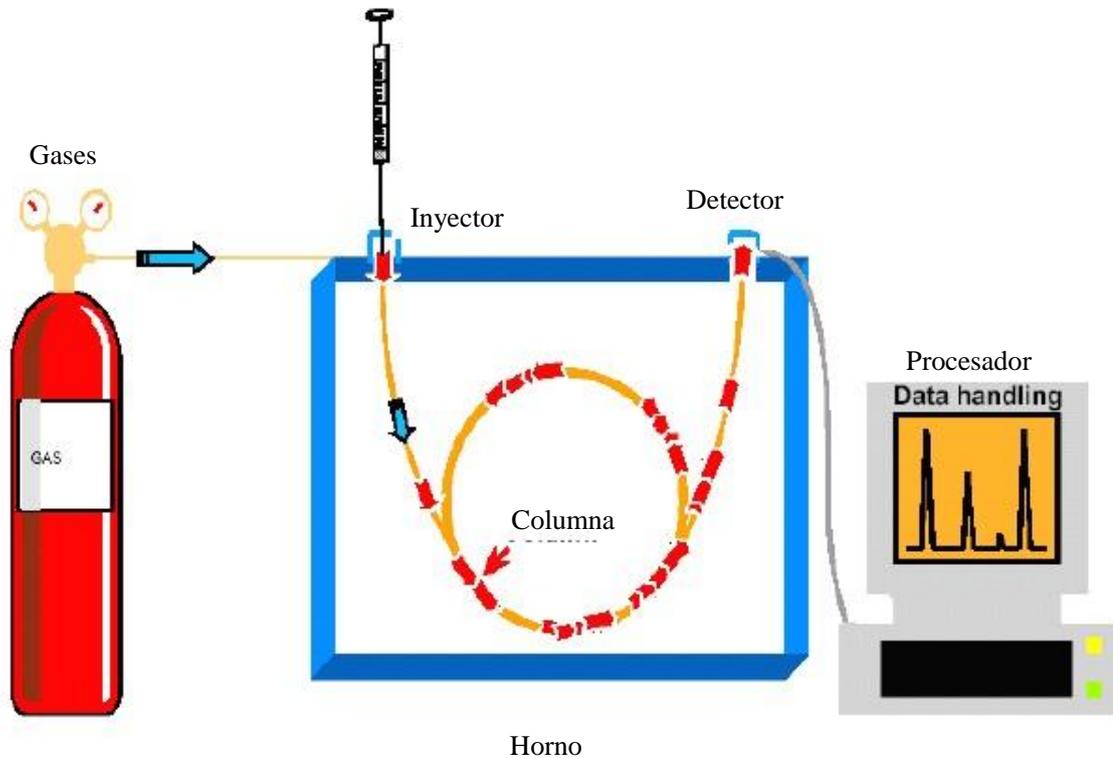


Figura 3.6 Partes del cromatógrafo.

3.2.1. Gas de arrastre

La función del gas de arrastre o gas transportador es desplazar los componentes de la muestra a través del sistema cromatográfico, su elección se basa principalmente en el tipo de detector, sus características principales se muestra en la figura 3.7



Figura 3.7 Características del gas acarreador.

Los gases de uso más común son:

- Helio (He)
- Nitrógeno (N₂)
- Hidrógeno (H₂)
- Argón (Ar)

El control adecuado del flujo se logra mediante válvulas reductoras, normales, de diafragma y de dos pasos, la misma caída de presión en la columna nivela la mayoría de las fluctuaciones. Se debe evitar variaciones bruscas en la presión de entrada.

Las presiones recomendables son.

- Presión en el interior del tanque no menor al 500 psi.
- Presión regulada de la salida del tanque 100- 110 psi (esta presión puede variar dependiendo de la distancia y localización de los tanques al cromatógrafo)
- Presión de entrada al cromatógrafo 80 psi.

Figura 3.8



Figura 3.8. Mamómetros de los gases.

Eligiendo el correcto gas de arrastre, y regulando las presiones de flujo, el gas llega al inyector para ingresar al sistema cromatográfico.

3.2.2. Inyector

La eficacia de inyección requiere que la muestra introducida no sea mayor de 5 μl para columnas empacadas y de 2 μl para columnas capilares, que sea introducida rápidamente como un tapón de vapor; esto contribuye que las bandas cromatografía sean estrechas y tengan buena resolución.

El método más común de inyección implica el uso de una micro jeringa para muestras líquidas o sólidas disueltas; y para muestra gaseosa los equipos cuentan con válvulas especiales donde, con un simple acoplamiento, se introduce la muestra de manera directa. La muestra se deposita en lo que se conoce como inyector. El inyector es un inserto que consta de un diafragma o septum de goma de silicona, de una cámara en donde por calentamiento, en forma instantánea la muestra pasa a fase vapor, y de un liner que conduce la muestra vaporizada al interior de la columna, (la temperatura normalmente está unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil); y en caso de las muestra gaseosas basta con unos 20° o 30° de temperatura del inyector.



Tipos de inyectores:

- Split
- Split – Splitless programable
- Split – Splitless: Este tipo de inyector permite trabajar de dos maneras:
 - ✓ Splitless: El volumen de muestra se inyecta en su totalidad al sistema cromatográfico. Esto para muestras muy diluídas.
 - ✓ Split: El volumen de muestra se introduce dividido y sólo una parte de ésta se inyecta a la columna; si se considera un Split de 20 la muestra se divide en 20 partes y sólo una de ellas se inyecta al sistema cromatográfico. Esto para muestra muy concentradas. (Figura 3.9)

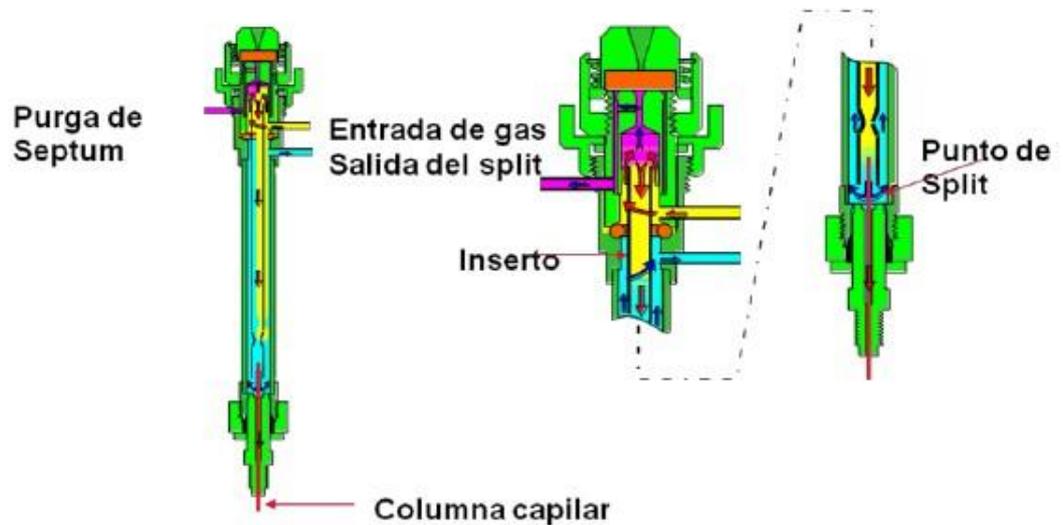


Figura 3.9. Inyector Split – Splitless.

3.2.3. Columnas

La columna es el corazón del sistema cromatográfico, en ella se encuentra la fase estacionaria con la que los componentes de la muestras interaccionan para ser retenidos selectivamente por afinidad química mediante sus coeficientes de partición.

Actualmente existen dos tipos de columnas de uso general, las empacadas de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Tabla 3.1



Tabla 3.1 Clasificación de columnas

| COLUMNAS CAPILARES | | COLUMNAS EMPACADAS | | |
|-------------------------------------|---|---|---|-------------------|
| CARACTERÍSTICAS | Se construyen de sílice fundida (vidrio de muy alta pureza). •Cierta afinidad con los componentes a separar. •Químicamente pura •Estabilidad química •Estabilidad térmica •Debe permanecer en su condición líquida arriba de la temperatura mínima de trabajo •Baja volatilidad (nos superar el límite máximo de temperatura) | Se construyen de acero inoxidable, níquel o vidrio | | |
| DIAMETRO INTERIOR | Menor a 1 mm. | De 1.6 a 9.5 mm. | | |
| LONGITUD | De 5 a 100 m | De 2 - 5 m. | | |
| VOLUMEN DE INYECCIÓN | Menores a 2 µL | De 2 a 5 µL. | | |
| EFICIENCIA | BAJAS | ALTAS | | |
| FASE ESTACIONARIA | La fase estacionaria está soportada en las paredes del capilar en una micropelícula. | Empacada con un soporte inerte de tierra diatomácea, el material del empaque es un adsorbente como gel de sílice. | | |
| TIPOS DE FASES | Nombre y Material | Polaridad | Aplicación | Tierra diatomácea |
| | Elite-1 100% dimetil polisiloxano | No polar | Petroquímica, aromáticos, gasolinas, aceites, mercaptanos | |
| | Elite-5 5% Diphenyl Dimethylpolysiloxane | No polar | Fenoles, Aminas, Solventes residuales, drogas de abuso, pesticidas, PCB, impureza de solventes. | |
| | Elite-Wax Polietilen glicol | Polar | FAMEs (esteres metílicos de ácidos grasos), Alimento, sabores, fragancias, alcoholes, aromáticos. EPA 502.2, 8021, 501.3, 503.1, 524.2, 601, 602, 8010. 8015, 8020, 8240, and 8260 | |
| | Elite-624 special phase | No polar | Alcoholes de sangre | |
| | Elite BAC | Polar | | |
| | Elite-200 Trifluoropropilmetil polisiloxane | Polar | Solventes, freon, fluorocarbonos, alcoholes, cetonas, glicoles, silanos, análisis ambiental y CFCs (clorofluorocarburos) | |
| Elite-CLPesticides special phase | No-polar | Plaguicidas clorados y herbicidas. Métodos EPA 504, 608, 619, 8081, 8151 y CLP | | |



La columna se encuentra en el interior de un horno que posee un sistema de calentamiento un termostato y un sistema de ventilación, se encarga de proporcionar a la columna el calor necesario para la separación (temperatura de trabajo), el horno puede trabajar en dos sistemas:

- Isotérmico: Temperatura constante a lo largo de toda la corrida cromatografía; para muestras de afinidades semejantes como tipo series homólogas
- Rampa de Temperatura: Programando cambios de temperatura a lo largo del proceso cromatográfico (En intervalos de trabajo en forma isotérmica y por gradiente) figura 3.10

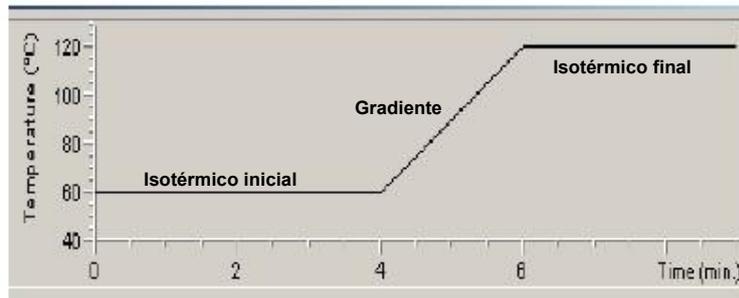


Figura 3.10. Rampa de temperatura

3.2.4. Detectores.

El detector es un transductor de señal, sensa la diferencia de señal entre el gas de arrastre sin muestra y con muestra. Se localiza a la salida de la columna, los componentes separados por la columna llegan al detector provocando un cambio de señal en él, esta señal es amplificada y enviada a un procesador de datos. Las características de un detector ideal se expresan en la figura 3.11



Figura 3.11 Características de un detector ideal.



No existe un detector que cumpla con todas las características, por lo que hay varios tipos de detectores y diversas clasificaciones que se muestran en la figura 3.12

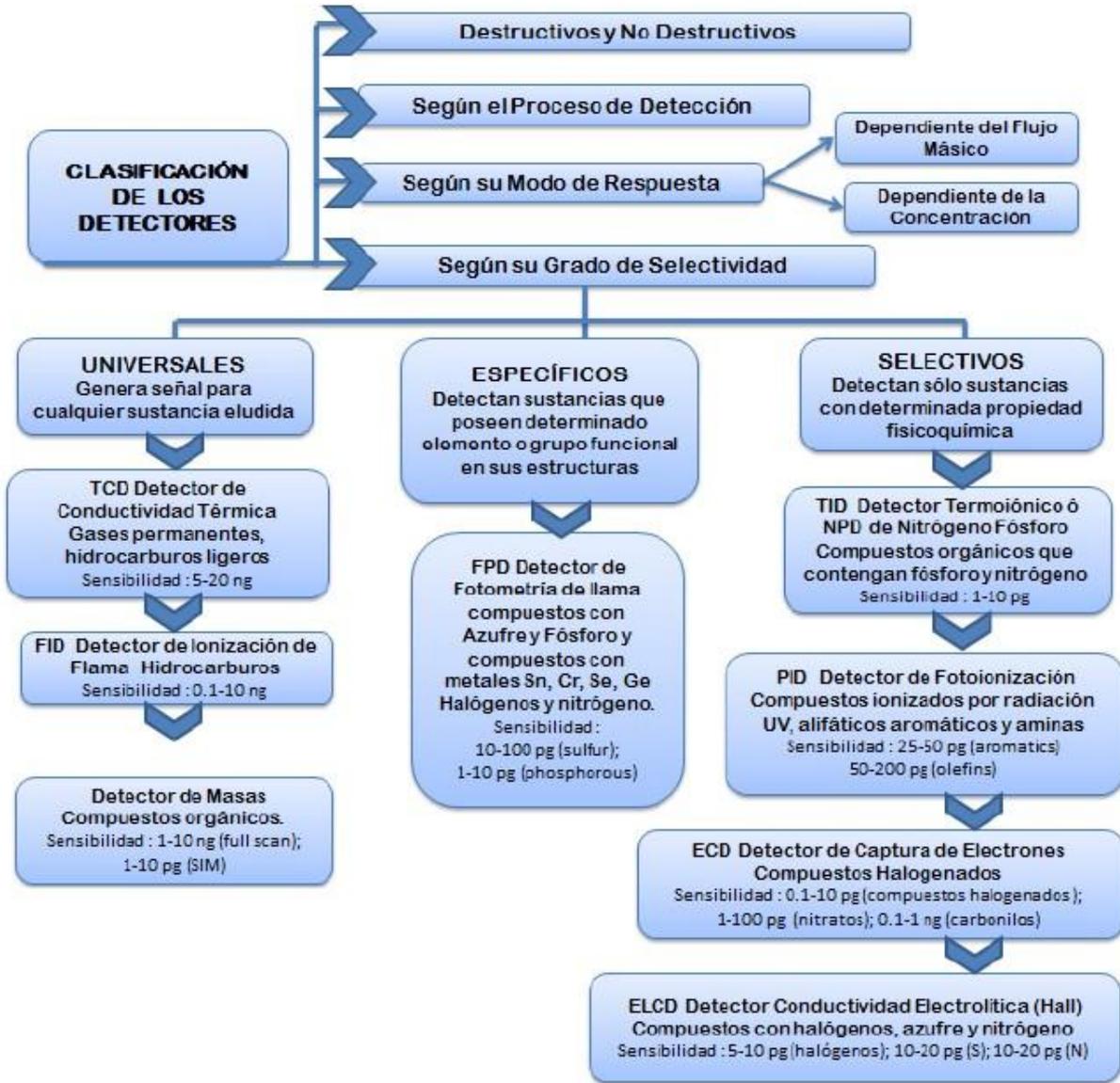


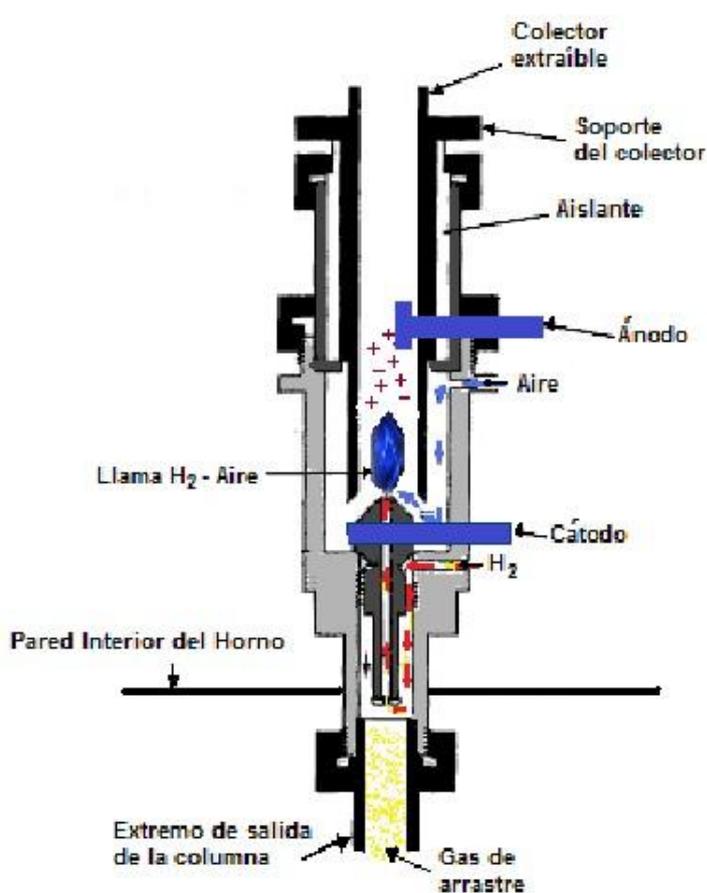
Figura 3.12 Clasificación de Detectores.

De todos los detectores el de mayor uso e interés para esta tesis es el Detector de ionización de llama (FID)

• Detector de Ionización de Llama FID

Es uno de los detectores más usado por ser selectivo a sustancias que contengan – CH – en su estructura química es decir prácticamente toda los compuestos orgánicos; no proporciona señal para los carbonos totalmente oxidados tal como los grupos carbonilo ó carboxilo (y sus tioanálogos). La respuesta a los carbonos enlazados a un grupo hidroxilo y amino es más baja debido a que produce pocos iones al ser quemados. Este detector es insensible a la humedad y a los gases permanentes (CO , CO_2 , CS_2 , SO_2 , NH_3 , N_2O , NO , NO_2 , SiF_4 , y SiCl_4), Para analizar CO y CO_2 puede convertirse a CH_4 por reducción con hidrógeno sobre un catalizador de níquel y medirse después con el detector FID.

El FID es un detector destructivo, que genera una llama de aire – hidrógeno la cual requiere un flujo en proporción de Aire/Hidrógeno de (400/40 ó 450/45 ul/min). Es recomendable trabajar temperaturas arriba de 50°C de la temperatura de trabajo. En la figura 3.13 se presentan las partes y funcionamiento del detector.



1. El hidrógeno (combustible) se introduce en la base del cuerpo del quemador, a la salida se mezcla con aire y se enciende con la chispa de una bujía.

2. La llama produce una corriente de iones (10^{-12} A) entre ambos electrodos.

3. El gas de arrastre proveniente de la salida de la columna llega al quemador, la tensión que produce el paso éste, sin muestra, ajusta la línea base.

4. Cuando entra un compuesto proveniente del eluyente de la columna, diferente al gas de arrastre, se quema y produce iones que hacen variar el valor de la diferencia de potencial de referencia; esto origina una señal en el detector partiendo de la línea base (pico cromatográfico).

Figura No 3.13 Detector de Ionización de Flama FID y su funcionamiento



3.2.5 Sistema de procesamiento de Datos.

El sistema de procesamiento lo constituyen una computadora y uno o varios programas (softwares) que permiten (Figura 3.14):

- El control del instrumento mediante la configuración de los parámetros de un método (anexo1)
- La adquisición de datos (señales cromatográficas)
- Operaciones matemáticas (integración de picos y calibración anexo 2)
- Edición de los resultados (Reportes).

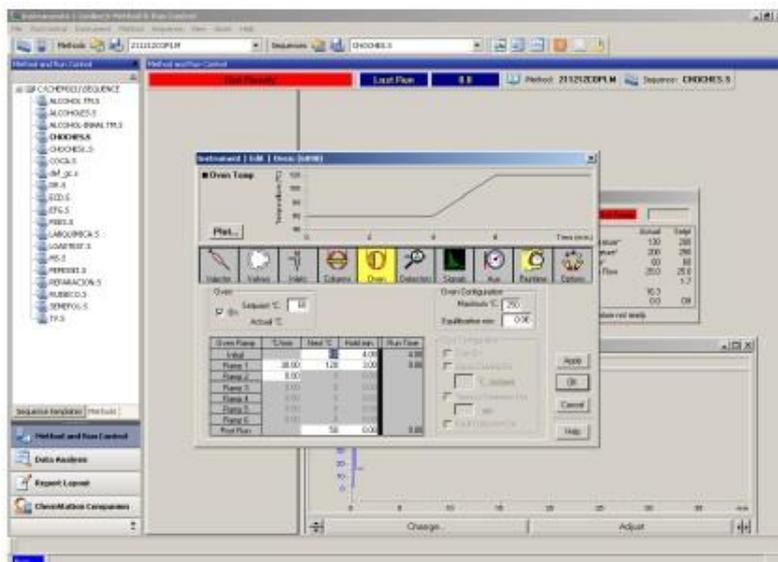


Figura 3.14. Pantalla Principal de Software

3.2.6 Accesorios.

Existe varios accesorios que pueden ser adaptados a un sistema cromatográfico, sin embargo sólo se menciona el funcionamiento del headspace, por ser el que se usó en este trabajo.

- **Headspace:** Llamado así por su nombre en inglés “espacio de cabeza”, permiten la extracción de los compuestos volátiles desprendiéndolos de su matriz sin el uso de compuestos extractantes, con un ahorro de tiempo considerable y poca manipulación de la muestra; su uso es aplicable a muestras de difícil aislamiento, en las que una extracción convencional implica una pérdida significativa o total de los compuestos volátiles, conduciendo así a la falta de repetibilidad en los resultados que es el caso de este trabajo, ó en aquellas situaciones en donde, por normatividad se estipula el uso de este accesorio.



El sistema de trabajo, modelo y tipos de headspace que existen varían dependiendo de la marca, más sin embargo el propósito es el mismo.

El sistema del espacio de cabeza (headspace) consta de las siguientes partes



Figura 3.15. Headspace.

1. Viales para headspace: En este vial se coloca la muestra y proporciona el espacio libre que serán ocupados por los compuestos volátiles
2. Septum y arandelas de aluminio: Sellan perfectamente el vial para evitar perder los compuestos volatilizados en el vial
3. Sistema del Headspace: Consta principalmente de un horno que calienta el vial, una aguja que toma la muestra (su temperatura debe ser por lo menos 10°C mayor a la del horno) y un sistema neumático que lleva la muestra hasta el inyector del sistema cromatográfico.
4. Loop: Es un volumen fijo totalmente ocupado por la muestra volátil, es la cantidad inyectada totalmente al cromatógrafo (su temperatura debe ser por lo menos 10°C mayor a la aguja)
5. Línea de transferencia: Es la conexión que permite que la muestra sea llevada del headspace al cromatógrafo (su temperatura debe ser por lo menos 10°C mayor a la del loop)

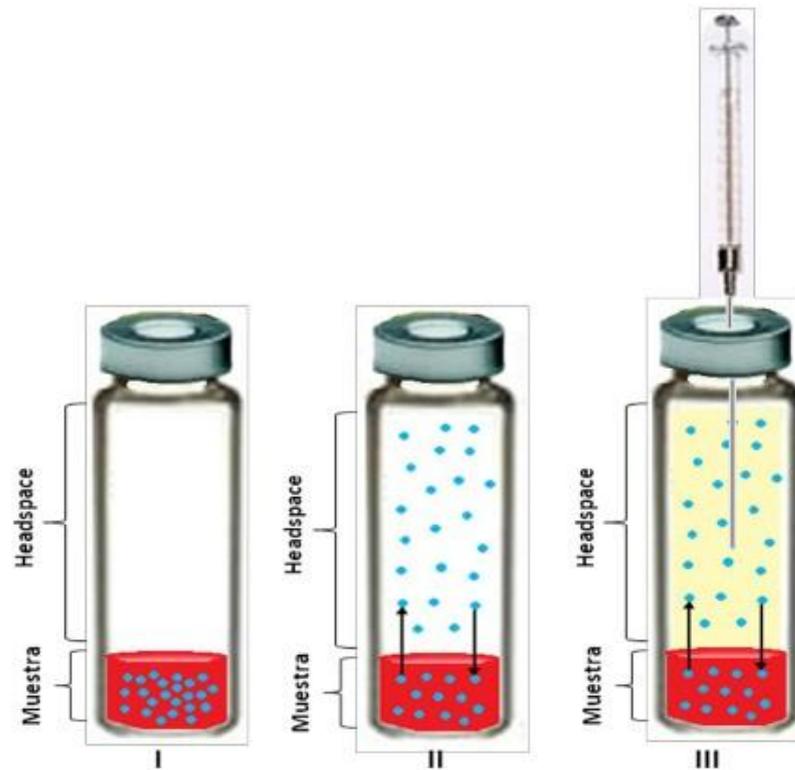


Figura 3.16. Extracción en el Headspace

- I. La muestra es colocada en el vial y sellada perfectamente
- II. El vial es introducido al headspace y calentado en el horno, la temperatura comenzará a liberar los compuestos volátiles de la matriz en el espacio libre del vial, a ello se debe el nombre de este sistema Headspace (espacio de cabeza)
- III. La aguja es introducida al vial y presurizada en el interior con gas de arrastre, que se mezcla con los compuestos volátiles en el interior del vial.

El sistema neumático mediante diferencias de presión se encarga de presurizar el vial y después liberar los compuestos volatilizados de la muestra pasando por la jeringa, el loop, línea de transferencia hasta llegar al inyector.



3.2.7 Métodos de Identificación y Cuantificación

En cuanto los compuestos que eluyen de la columna se evidencian en un CROMATOGRAMA que proporciona picos de forma Gausiana, con los que se obtiene información CUALITATIVA, por el tiempo de retención e información CUANTITATIVA, por el área bajo la curva de cada pico

Métodos de Identificación

- Identificación cromatográfica por datos de retención o por serie homóloga.
- Identificación cromatográfica (análisis clásicos, identificación por adición de estándar)
- Identificación con técnicas auxiliares: U.V (Espectrometría de Ultravioleta), I.R (Espectrometría de Infrarrojo), RMN (Resonancia magnética nuclear), acoplamientos con MS (Espectrometría de Masas)

Para la identificación de los compuestos de esta tesis fue utilizada la identificación cromatográfica por datos de retención.

Métodos de Cuantificación

La cantidad de determinada sustancia es directamente proporcional a el área del pico obtenido en el cromatograma.

Existen varios métodos, siendo los más comunes:

- Normalización.
- Estandarización externa.
- Estandarización interna.

EL método de cuantificación utilizado fue el método de estándar interno que se describe a continuación:

- Estandarización interna: Para cuantificar por este método se necesita elegir un estándar interno cuyas características se presentan en la figura 3.17
- La preparación de los estándares de la curva de calibración por este método se lleva a cabo según los paso 1 al 6

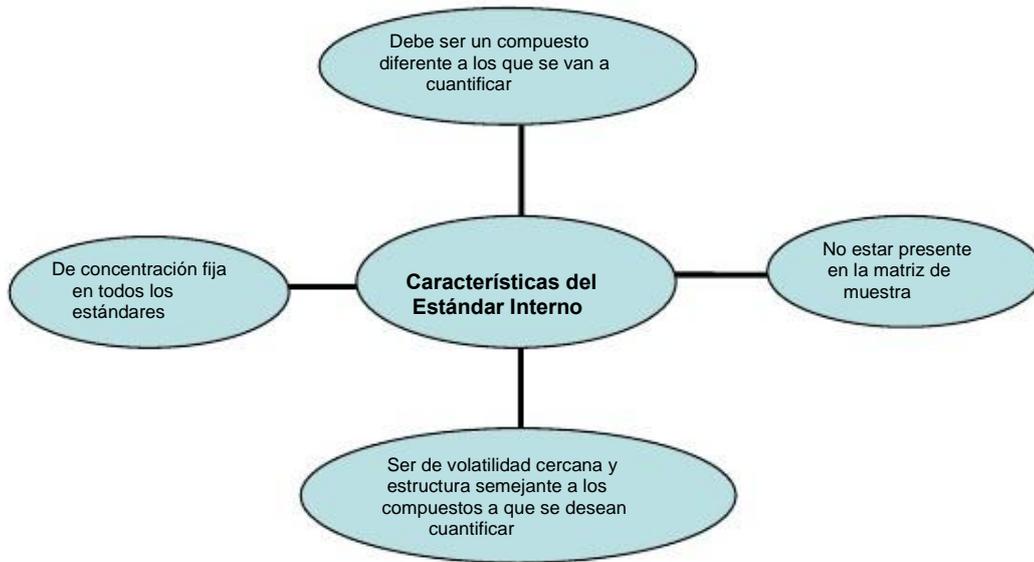


Figura 3.17 Características del estándar interno

Paso 1.- Preparar la solución madre del estándar interno.

Paso 2.- Preparar la solución madre de los compuestos a cuantificar.

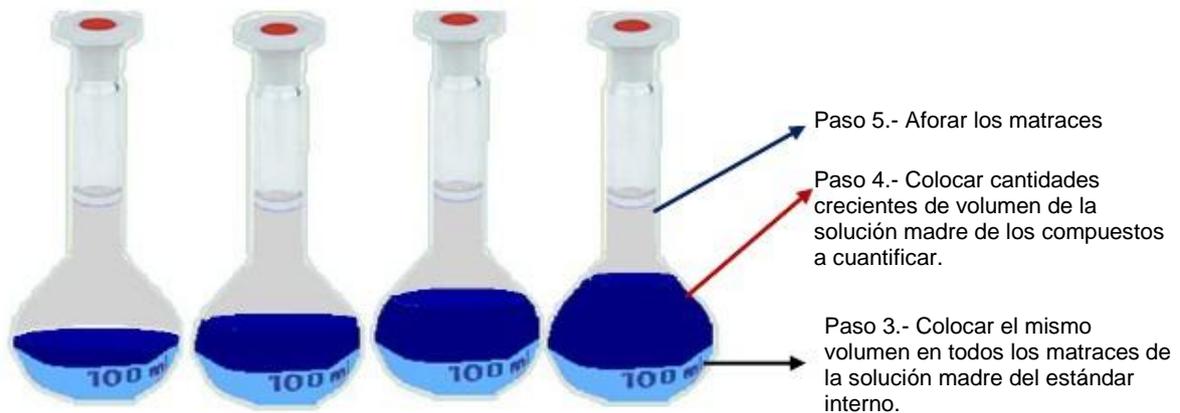


Figura 3.18. Estándares de curva de calibración

Paso 6.- Los picos cromatográfico obtenidos se integran para obtener el área cada pico y la curva de calibración se elabora con las relaciones de las áreas y concentración, como se observa e indica en la figura 3.19 y tabla 3.2

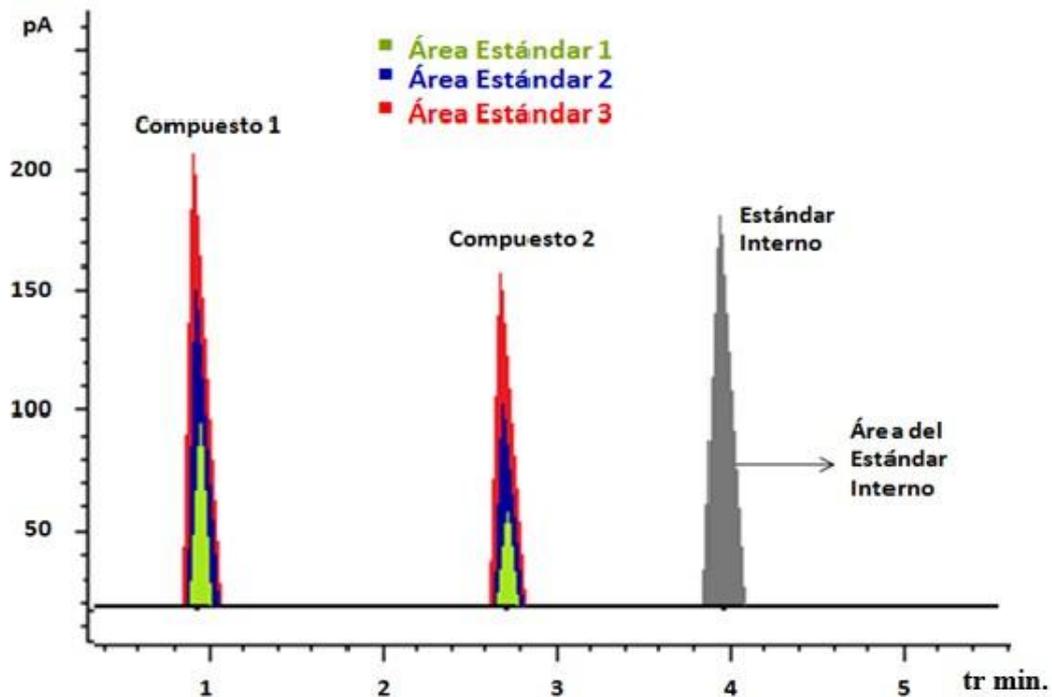


Figura 3.19. Cromatograma de curva de calibración con estándar interno

Tabla 3.2 Ejemplo Curva de Calibración (Experimentales)

| | No Estándar | Concentración mg/dl | Área | Relación de área | Relación de concentración |
|------------------|-------------|---------------------|-------|---|---|
| | | | | $\frac{\text{Área Estándar}}{\text{Área Estándar Interno}}$ | $\frac{\text{Concentración Estándar}}{\text{Concentración Estándar Interno}}$ |
| Componente 1 | 1 | 45 | 110.3 | $(110.3 / 455.6) = 0.2421$ | $(45 / 75) = 0.600$ |
| | 2 | 74 | 159.6 | $(159.6 / 455.6) = 0.3504$ | $(75 / 75) = 1.000$ |
| | 3 | 100 | 200.0 | $(200.0 / 455.6) = 0.4387$ | $(100 / 75) = 1.333$ |
| | 4 | 125 | 242.9 | $(142.9 / 455.6) = 0.5331$ | $(125 / 75) = 1.666$ |
| | 5 | 150 | 285.2 | $(285.2 / 455.6) = 0.6260$ | $(150 / 75) = 2.000$ |
| Estándar interno | | 75 | 455.6 | | |
| Componente 2 | 1 | 2 | 24.2 | $(24.0 / 455.6) = 0.05511$ | $(2.0 / 75) = 0.026$ |
| | 2 | 3 | 25.8 | $(25.8 / 455.6) = 0.05659$ | $(3.0 / 75) = 0.040$ |
| | 3 | 5 | 29.3 | $(29.3 / 455.6) = 0.06431$ | $(5.0 / 75) = 0.066$ |
| | 4 | 8 | 34.6 | $(34.6 / 455.6) = 0.07607$ | $(8.0 / 75) = 0.106$ |
| | 5 | 10 | 38.2 | $(38.2 / 455.6) = 0.08384$ | $(10.0 / 75) = 0.133$ |

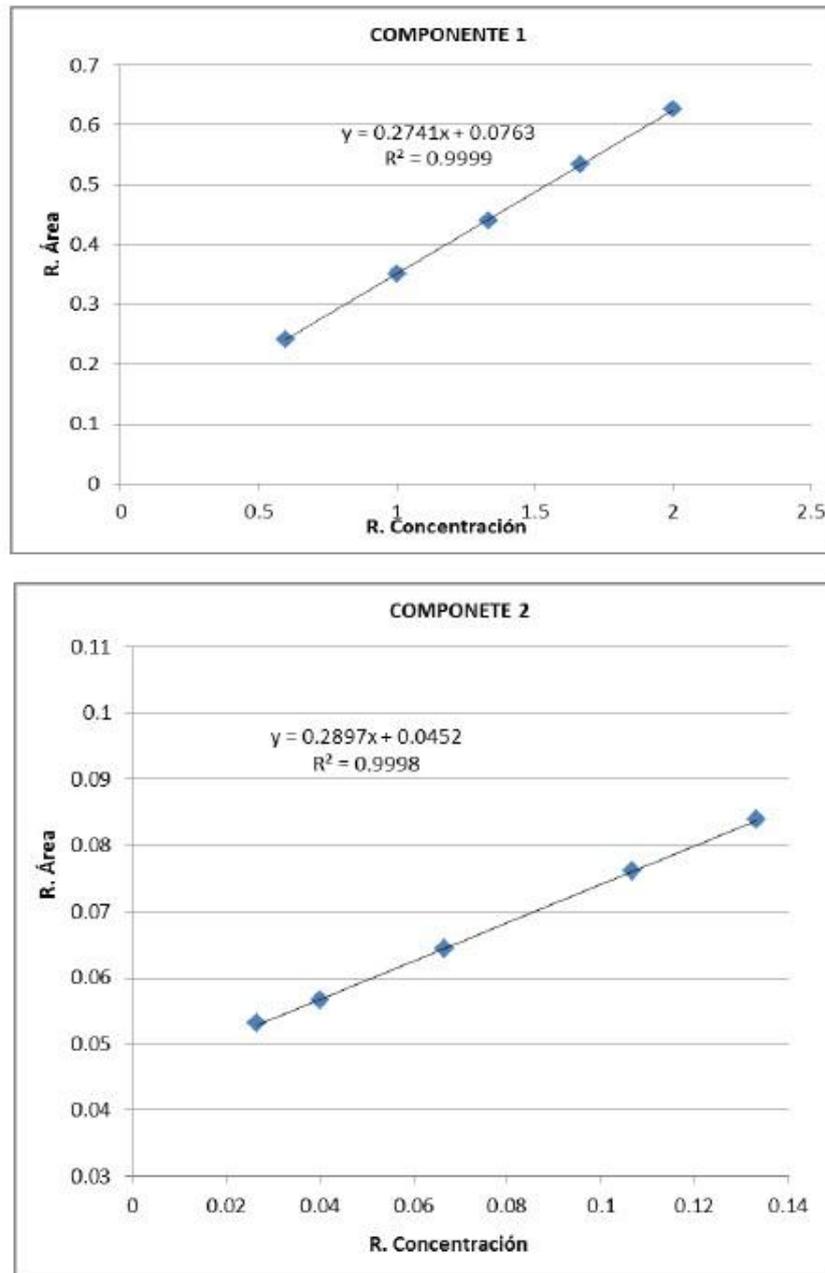


Figura 3.20 Curvas de calibración método de estándar interno

Es método de estándar interno ayuda a eliminar las variaciones de señal en área, causadas por variaciones de voltaje en el detector y las variaciones que implica de preparación de cada tipo de analista



CAPÍTULO IV.

VALIDACIÓN

Hoy en día, los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad o propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados verdaderos

Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, adecuación, requisitos, y parámetros previamente establecidos por el usuario, para poder resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterio de calidad que debe poseer el método a utilizar.

Los laboratorios deben de validar todos los métodos que se utilicen tanto los desarrollados por ellos mismos, como los procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros laboratorios. Además también es necesario que el laboratorio valide los métodos de referencia, aunque en este caso no es necesario que el laboratorio realice una validación completa, también debe de validar todo el procedimiento analítico teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y de matrices de las muestras.



4.1 Definición de validación

Existen muchas definiciones aceptables sobre validación en base a diferentes autores o instituciones, pero todas con el mismo contexto de interés, algunas provenientes de Normas Mexicanas NMX, Normas Oficiales Mexicanas NOM, Organización Internacional de Estandarización ISO, Instituto Argentino de Normalización y Certificación IRAM, UIPACC, las cuales son plasmas en la figura 4.1

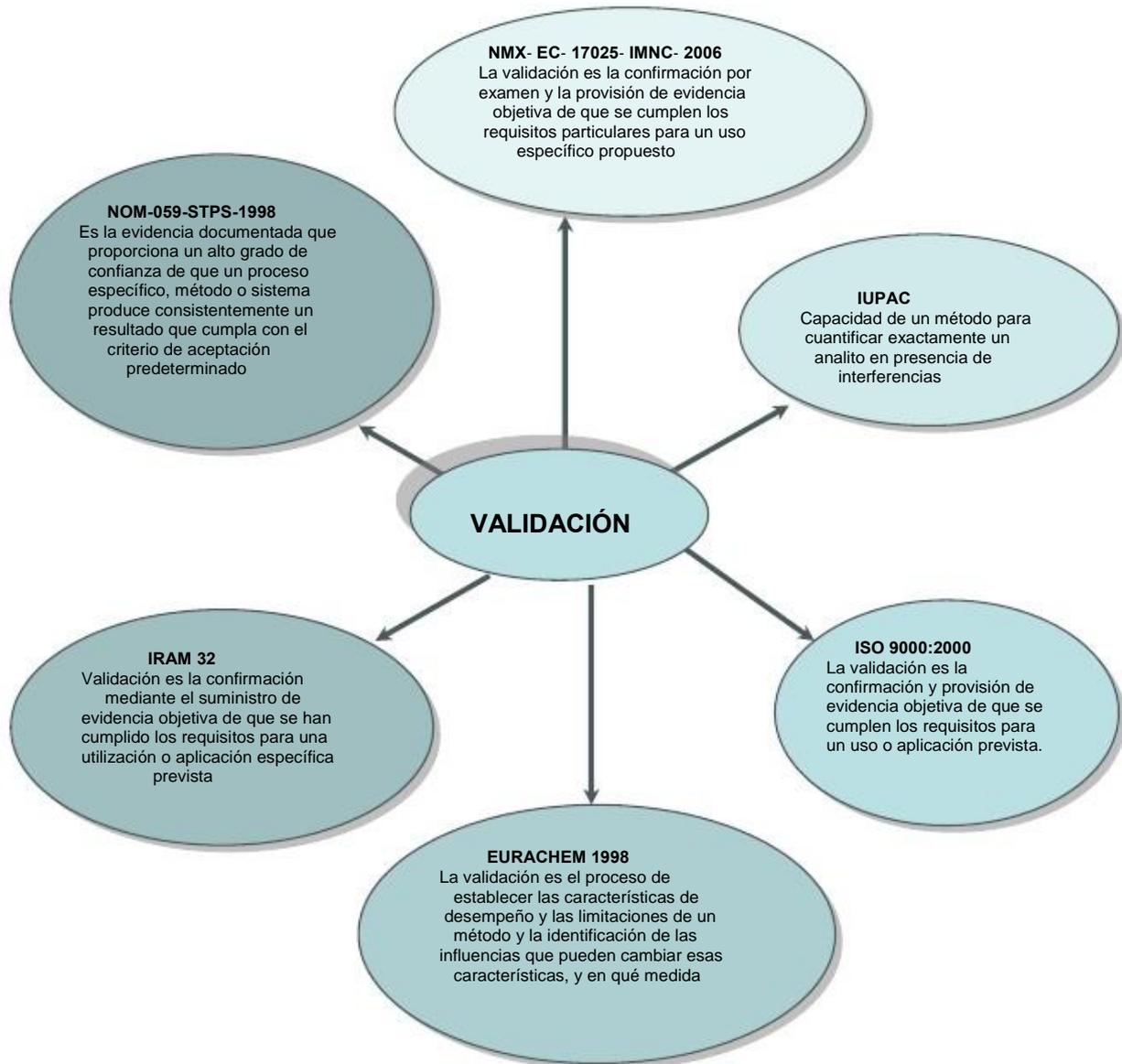


Figura 4.1 Definición de validación



4.2 Importancia de la validación en mediciones analíticas

En el mundo se realizan diversas mediciones analíticas con diferentes propósitos en distintas áreas, pero cada aspecto de la sociedad está apoyada de algún modo por mediciones analíticas, el costo de estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales por las decisiones tomadas en base a los resultados obtenidos como demandas, pago de seguros, custodia de menores, multas, encarcelamiento, compensaciones e inclusive hasta ejecuciones.

Si la prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado con ese nivel de incertidumbre, es importante determinar que el resultado es correcto y ser capaz de demostrar que lo es.

La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es “adecuado para su propósito”, que el resultado analítico concuerda con el propósito requerido, y que es lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste se tome con confianza, la importancia de validación puede sustentarse por:

IMPORTANCIA DE VALIDAR

- Demostrar que el valor emitido es verdadero.
- Evaluar características de desempeño del método
- Demostrar que el método desarrollado por un laboratorio es útil para la aplicación
- Demostrar que las modificaciones realizadas a un métodos no afecta su desempeño, obteniendo resultados confiables
- Demostrar que un método es equivalente a otro
- Por ética del analista
- Por la confianza con que el cliente necesita tomar decisiones en base a los resultados analíticos
- Por costos adicionales en los laboratorios por pruebas realizadas con incertidumbre del resultado de parte del químico analista (falsos positivos y falsos negativos)
- Por la repercusión social que origina un resultado erróneo en la toma de decisiones.



4.3 Cuándo y cómo debe validarse

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico, aunque todos los métodos deberían ser validados sin importar que caiga dentro de los puntos establecidos en la figura 4.2, debido a que todo método debe arrojar un resultado confiable verdadero.

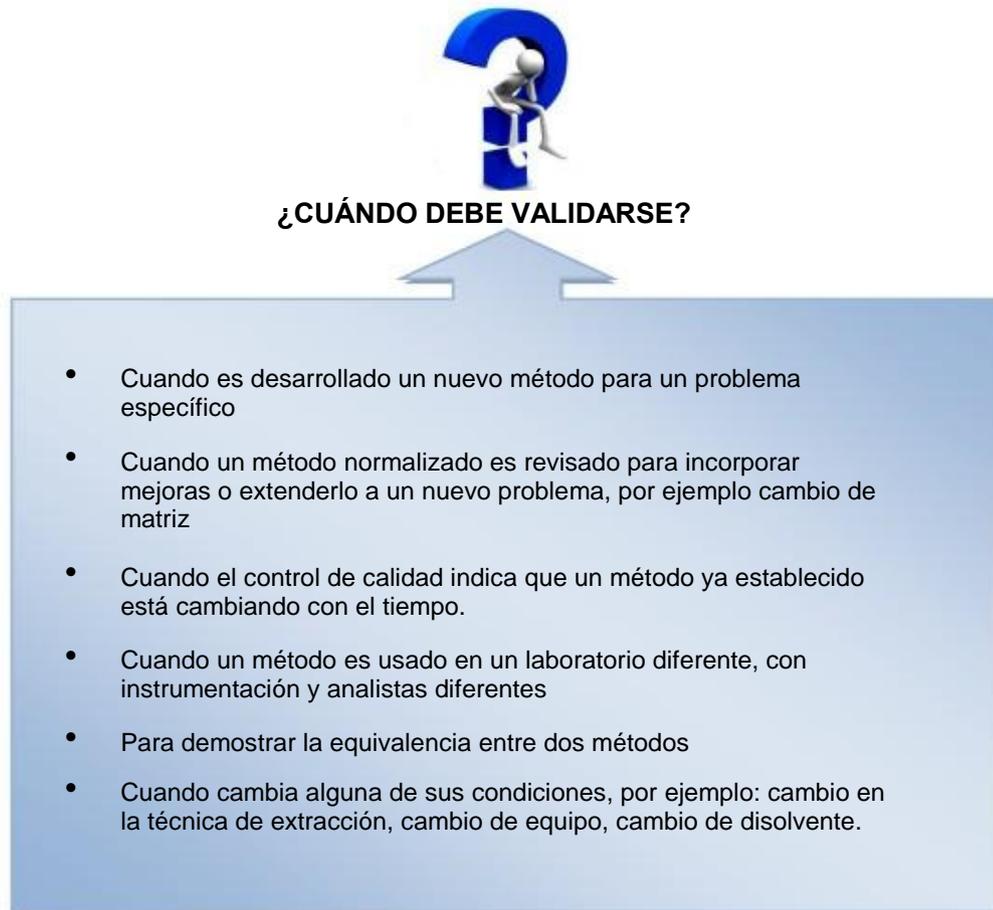


Figura 4.2 Motivos para realizar validación

Si el método cae dentro de algunas de los motivos de validación, entonces procede el saber qué parámetros debemos evaluar, según las exigencias y necesidades del método que se pretende validar.

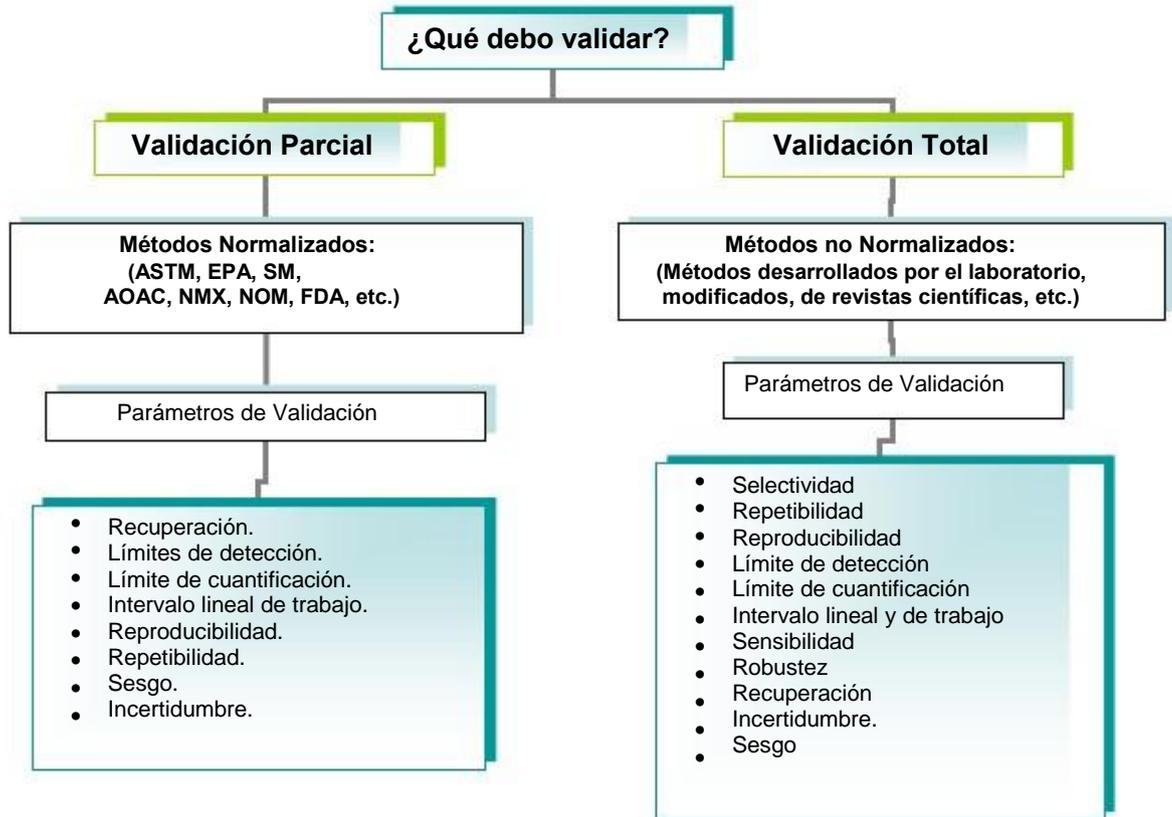


Figura 4.3 Parámetros de validación

4.4 Parámetros de Validación

Según el tipo de método ya sea normalizado o no normalizado serán los parámetros a considerar para el desarrollo de la validación según la figura 4.3 en el caso de los métodos normalizados cuando se presenta alguna modificación como tipo de matriz, extensión del rango o sistemas de detección, se considerará como método no normalizados para la validación, debido a que al modificar alguno de estos parámetros en el método normalizado se pueden modificar la selectividad, límites de detección y cuantificación, linealidad, precisión, y selectividad por lo que es necesario validar todos los parámetros.



4.1 Selectividad:

Es la aptitud de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes que se sospecha que puedan estar presentes (impurezas, degradantes, matriz, etc)

En la selectividad la presencia de sustancias interferentes afecta de forma directa a la exactitud y la falta de selectividad provoca errores sistemáticos.

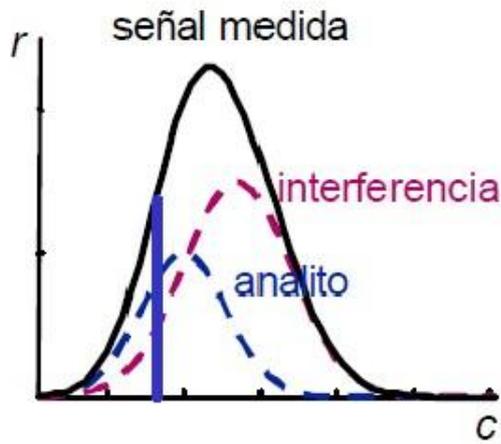


Figura 4.4 Interferencia

Se puede conseguir mayor selectividad mediante:

- Eliminación directa de la interferencia
 - Química: Usando agentes enmascarantes (sustancia que reacciona con el interferente para formar una especie que no produce la misma señal del analito). Se consigue mediante un ajuste de pH , un cambio en el estado de oxidación, formación de complejos)
 - Física: Separándolas previamente a la determinación. mediante precipitación, extracción , cromatografías o destilación, volatilización
- Optimización de las condiciones en el método.
- Análisis multicomponentes ó uso de calibración multivariante.



4.2 Precisión.

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse.

- **Repetibilidad:** Es la precisión más pequeña esperada dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.
- **Reroducibilidad:** Es la medida de precisión más significativa, se representa cuando la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo).

Para algunos casos particulares es más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo la reproducibilidad medida entre diferentes analistas, en períodos de tiempo prolongados. dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito.

Para obtener la desviación estándar del estudio de precisión, se considera la siguiente ecuación.

$$\sigma = \frac{\sum_1^n (C_i - C_{promedio})^2}{n - 1}$$

Donde:

σ = Es la desviación estándar

C_i = Concentración de cada muestra

$C_{promedio}$ = Promedio de las concentraciones de cada muestra

n = Número de muestras

$C_{promedio}$ se calcula de con la siguiente ecuación

$$C_{promedio} = \frac{\sum_1^n C_i}{n}$$



4.3 Intervalo lineal y de trabajo.

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito en el cual se obtengan resultados proporcionales a la concentración. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Dentro del intervalo de trabajo debe existir un intervalo de respuesta lineal, la señal de respuesta tendrá un comportamiento lineal con la concentración del analito, por lo cual la ecuación de la curva de calibración se obtendrá mediante una regresión lineal.

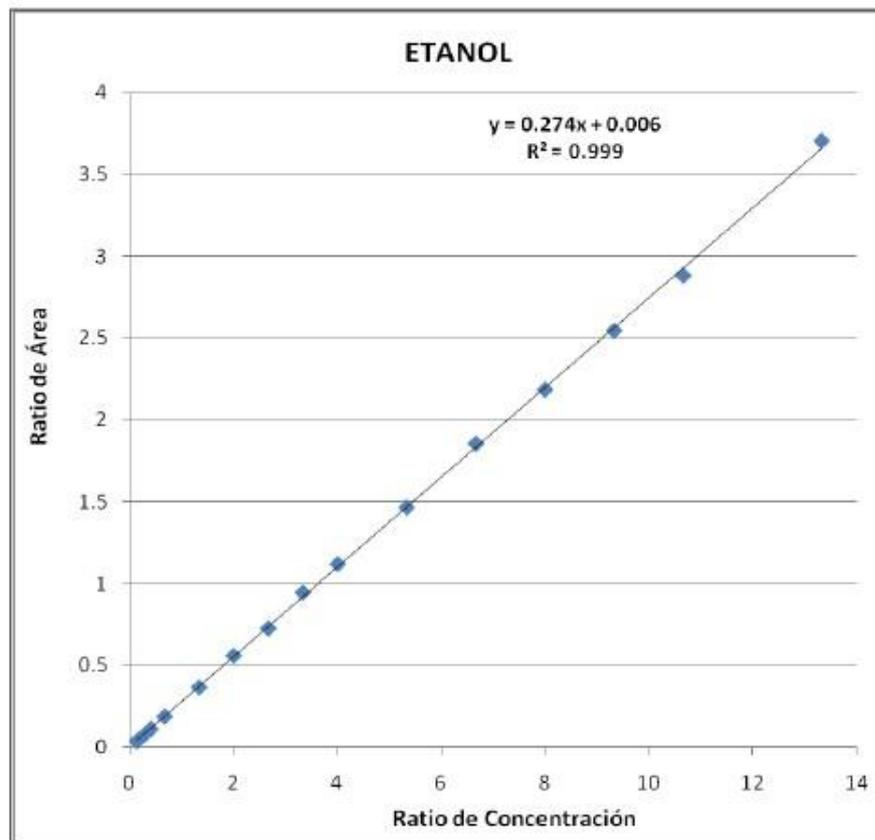


Figura 4.5 Curva de calibración



4.4. Límite de detección LOD.

Es la señal mínima detectable, se puede establecer presencia del analito pero no se puede predecir cantidad, es decir sólo podemos decir que hay analito pero no cuanto hay.

Cuando se realizan mediciones a niveles de concentración bajos, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito que puede detectarse confiablemente por el método.

Los problemas han sido investigados estadísticamente con detalle y se ha propuesto una gama de criterios de decisión. Surgen confusiones adicionales debido a que no existe actualmente un acuerdo universal sobre la terminología aplicada.

El término “límite de detección” no es aceptado ampliamente aunque se usa en varios documentos sectoriales. La ISO utiliza como un término general “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” el cual en química se traduce como la “concentración neta mínima detectable”. La IUPAC es cautelosa en el uso de “límite de detección” prefiriendo “valor (verdadero) mínimo detectable”.

El método para determinar el límite de detección según la US EPA establece el cálculo mediante la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{m}$$

Donde:

LOD: límite de detección

S_{y/x}: Desviación estándar del blanco.

m: Pendiente de la curva de calibración obtenida por regresión lineal.

4.5 Límite de cuantificación LOQ.

El “límite de cuantificación”(LOQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 veces la desviación estándar de la media del blanco.

Para cromatografía el límite de cuantificación según el método US EPA, se obtiene mediante.

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m}$$

Donde:

LOQ: Límite de Cuantificación

S_{y/x}: Desviación estándar del blanco.

m: Pendiente de la curva de calibración.



La pendiente se obtiene de la regresión lineal de la curva de calibración.

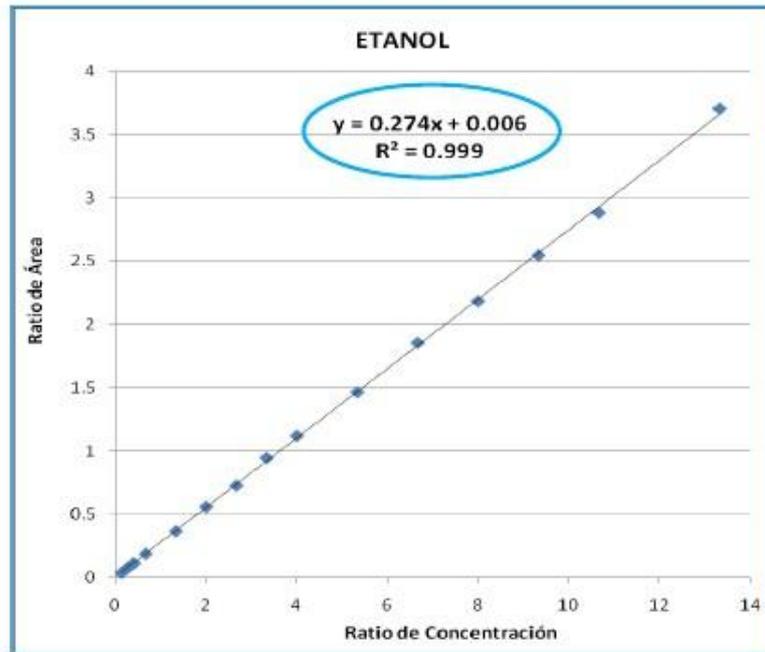


Figura 4.6 Regresión de la curva de calibración

La desviación estándar del blanco se obtiene de siguiente ecuación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - Y_{i\text{calculada}})^2}{n-2}}$$

Donde:

$S_{y/x}$: Desviación estándar del blanco

Y_i : Relación de áreas obtenido experimental

$Y_{i\text{calculada}}$: Ratio áreas calculado con la ecuación de la curva.

n : Número de estándares

El límite de cuantificación, se comprueba de la siguiente manera:

- Obteniendo el LOQ se prepara un estándar de esa concentración
- Se leen varias réplicas del estándar y se obtiene la desviación estándar
- Si la desviación estándar multiplicada por 10 da la concentración obtenida como LOQ llegamos al límite de cuantificación.
- De no obtener la misma concentración, con la nueva concentración obtenida de la desviación estándar se prepara un nuevo estándar y se repite esta secuencia hasta llegar al mismo valor.



4.6 Sensibilidad

Es la pendiente de la curva de calibración, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración (o sea, dentro del intervalo lineal del método) y se ha determinado la intercepción de la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación. La sensibilidad algunas veces se usa para referirse al límite de detección pero este uso no se acepta generalmente.

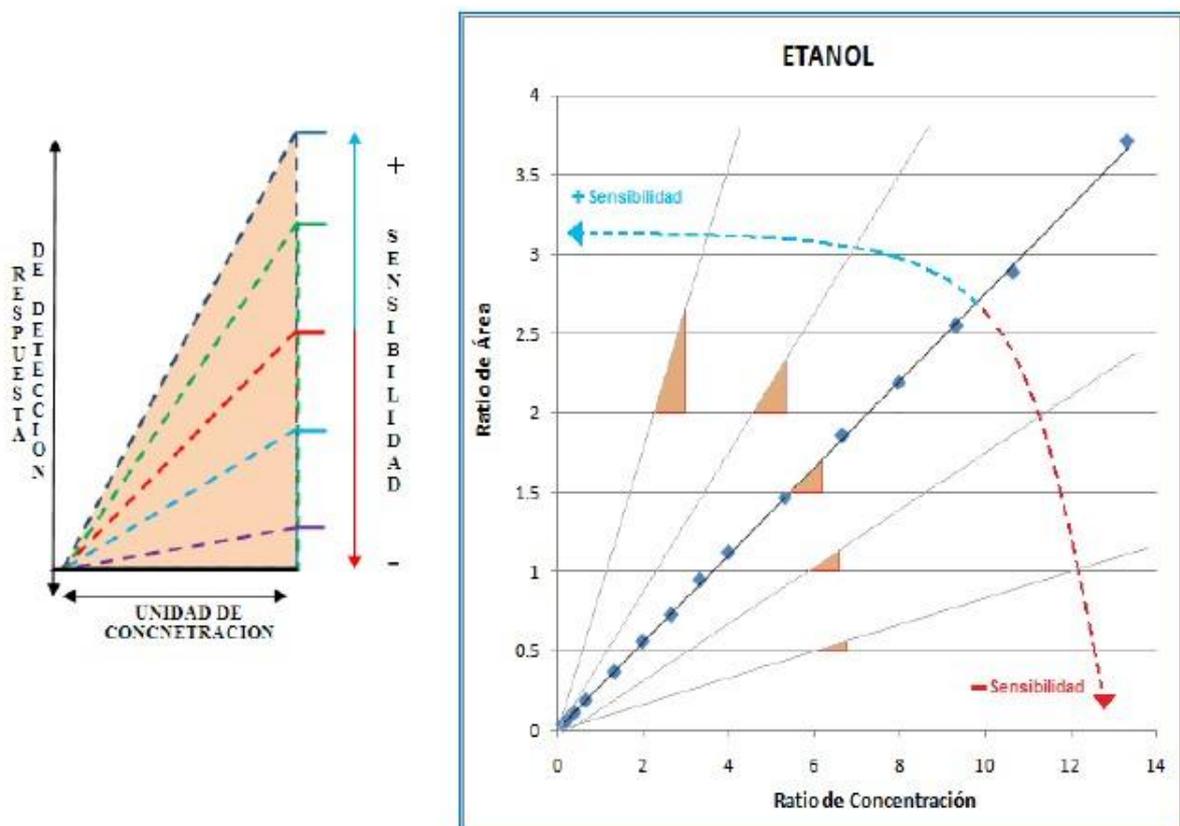


Figura 4.2 Sensibilidad



4.7 Robustez.

Una medida de la efectividad del método analítico es qué tan buen desempeño mantiene aun sin una implementación perfecta. En cualquier método habrá ciertas etapas las cuales, si no se llevan a cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. Estas etapas deben identificarse como parte del desarrollo del método y si es posible, debe evaluarse su influencia sobre el desempeño del mismo por medio de "pruebas de robustez". Esto incluye aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño.

De esta manera es posible identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método, las mejoras se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas. La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método, comúnmente por el laboratorio que lo ha propuesto y antes de la colaboración con otros laboratorios.

4.8 Recuperación.

Debido a que usualmente no se conoce la cantidad de un analito en particular que está presente en una porción de prueba, es difícil estar seguros de que tan exitoso ha sido el método para extraer el analito de la matriz. Una forma de determinar la eficiencia de extracción es agregar a una matriz porciones prueba con el analito a varias concentraciones , después se extraen las porciones prueba con el analito a varias concentraciones .

Un problema inherente a este proceso es que el analito introducido de este modo no estará tan fuertemente ligado como aquel que se encuentra en la porción de prueba de la matriz.

$$\%R = \frac{(CF - CU)}{CA} \times 100$$

Donde:

CF= Concentración del analito en la muestra fortificada

CU= Concentración del analito en la muestra sin fortificada

CA= Concentración del analito adicionando.



4.9 Exactitud:

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (La definición en ISO 3534-1 se ha adoptado en esta guía). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”:

- Veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real. Normalmente, la veracidad se expresa en términos de sesgo.
- Precisión es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados. Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la “incertidumbre de medición”, la cual proporciona una figura única de expresión de la exactitud.



CAPÍTULO V. EXPERIMENTACIÓN.

La determinación de alcohol etílico y sustancias volátiles es una de las pruebas más importantes realizadas en el SEMEFO del D.F., además de realizarse de manera rutinaria el presente procedimiento aplica como prueba confirmativa para alcoholemias mediante cromatografía de gases con inyección por Headspace.

Título: Validación del Método para determinación de Etanol, Metanol y Acetona en Sangre de Muestras Forenses por Cromatografía de Gases.

Alcance. El procedimiento es aplicable para el análisis de metanol, etanol y acetona a todo tipo de muestras de sangre de origen forense

Fundamentos. En el análisis de alcoholes por cromatografía de gases con inyección por headspace identifica y cuantifica los mg/dl de etanol, metanol y acetona en sangre de origen forense, mediante la separación por afinidad de polaridad con la fase estacionaria de la columna, la inyección por Headspace o “espacio de cabeza”, permite inyecciones más limpias, rápidas y reproducibles, realizando la extracción de los compuestos orgánicos volátiles mediante calentamiento directo de la muestra.

Objetivo generales. Validar un método para cuantificar etanol, metanol y acetona en muestras de origen forense por cromatografía de gases, método de estándar interno con accesorio “headspace”.



Objetivos específicos.

- Obtener los cromatogramas con buena selectividad y resolución de los compuestos principales (metanol etanol, acetona e isobutanol)
- Determinar repetibilidad del método en la cuantificación de metanol, etanol y acetona usando como estándar interno isobutanol en la matriz de sangre forense.
- Obtener experimentalmente de los límites de detección LOD, de cuantificación LOQ, y el intervalo de lineal de trabajo del metanol, etanol y acetona.
- Obtener la reproducibilidad del método, entre días, analistas y tipos de matriz (sangre de diferente densidad, orina, agua)
- Obtener los parámetros de influencia significativa en el desempeño del método mediante los estudios de robustez.
- Establecer el método validado, como único método de trabajo dentro del laboratorio de química del Servicio Médico Forense del D.F, que garantice el correcto desempeño y resultados confiables.

5.1 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

5.1.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Material

- Matraz aforado de 50, 25, 100 ml y 1 Lt.
- Tubos de plástico para química sanguínea con tapa de rosca de ml
- Micropipeta de embolo de volumen variable de (100/1000) μ L
- Micropipeta de embolo de volumen variable de (10/100) μ L
- Puntas de desplazamiento directo de 1.25 y 5 ml
- Guantes de latex
- Pipetas de plástico de 5 ml
- Jeringas de 15 ml
- Gradillas
- Marcador indeleble
- Pizeta
- Columna capilar para CG DB-624 de 30 metros de largo por 0.32 mm de diámetro externo y ancho de película de 1.8 micras.
Viales vidrio para head space de 20 ml N.P 5182-0837 marca agilent
- Septas de 20mm para vial de 20 ml
- Arandelas de aluminio para vial de 20ml.
- Engargoladora manual
-



Equipo

- Cromatógrafo de gases agilent 6890N con detector FID
- Inyector por Headspace
- Software Chem station

Reactivos

- Sangre humana (libre de alcohol y sustancias volátiles) para control negativo.
- Isobutanol R.A.
- Metanol, Etanol, Acetona, Benceno, Tolueno, Cloroformo, Isopropanol, Éter etílico, Propanol, Butanol, Hexano, grado analítico
- Agua destilada
- Cilindro de aire MET extra seco
- Cilindro de nitrógeno MET grado cromatográfico
- Cilindro de hidrogeno MET grado cromatográfico

5.1.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Configurar de manera correcta los parámetros cromatográficos dentro del método de volátiles en el software chemstation, generará el método base de trabajo para la identificación y cuantificación de metanol, etanol y acetona, principalmente, aunque se pueden identificar mediante las condiciones de este método la presencia de algunos otros analitos cuyos tiempo de retención son especificados en la tabla 6.1, las condiciones del método son especificadas en las tablas de la 5.1 a la 5.11

Tabla 5.1 Presión de gases

| GAS | PRESIÓN SALIDA | PRESIÓN TANQUE |
|------------------|----------------|----------------|
| Nitrogeno | > 80 psi | > 500 psi |
| Hidrogeno | > 60 psi | > 500 psi |
| Aire | > 80 psi | > 500 psi |



Tabla 5.2 Condiciones del Headspace.

| PARÁMETRO | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO (MINUTOS) | PRESIÓN (PSI) |
|------------------------|------------------|---|---------------|
| Vial | 60 | 10 (calentamiento) 0.5 (Presurización) | 5 |
| Rizo | 120 | 0.05 (equilibrio) 0.15 (llenado) | |
| Línea de transferencia | 130 | 1.0 (Inyección) | |
| Ciclo GC | | 8.2 minutos | |
| Gas acarreador | - | - | 14 |

Tabla 5.3 Condiciones del Puerto de Inyección

| PUERTO DE INYECCIÓN | |
|---------------------|----------------|
| Modo | Split |
| Temperatura | 200 °C |
| Presión | 8.32 psi |
| Radio Split | 10:1 |
| Flujo del Split | 16.8 ml/minuto |
| Flujo Total | 20.8 ml/minuto |
| Gas saber | Off |
| Gas type | Nitrógeno |

Tabla 5.4 Condiciones de la Columna

| COLUMNA | |
|-------------------------|----------------|
| Temperatura maxima: | 260°C |
| Longitud Nominal: | 30.0 m. |
| Diametro nominal: | 320 µm |
| Nominal Film thickness: | 1.80 µm |
| Mode: | Flow constant |
| Initial Flow : | 1.7 mL/min |
| Nominal Init Pressure: | 8.33 psi |
| Average velocity: | 31 cm/seg. |
| Intel : | Back intel |
| Outlet: | front detector |
| Outlet pressure: | Ambient |



Tabla 5.5 Condiciones del Horno

| HORNO | |
|---------------------|--------------|
| Temperatura Inicial | 60 °C |
| Tiempo Inicial | 4.00 minutos |
| Rampa | 30 °C/minuto |
| Temperatura Final | 120 °C |
| Tiempo Final | 3 minutos |
| Tiempo equilibrio | 0 minuto |
| Post temp: | 50°C |
| Post time | 0.00 min. |
| Corrida | 9.00 minutos |
| Temperatura máxima | 250°C |

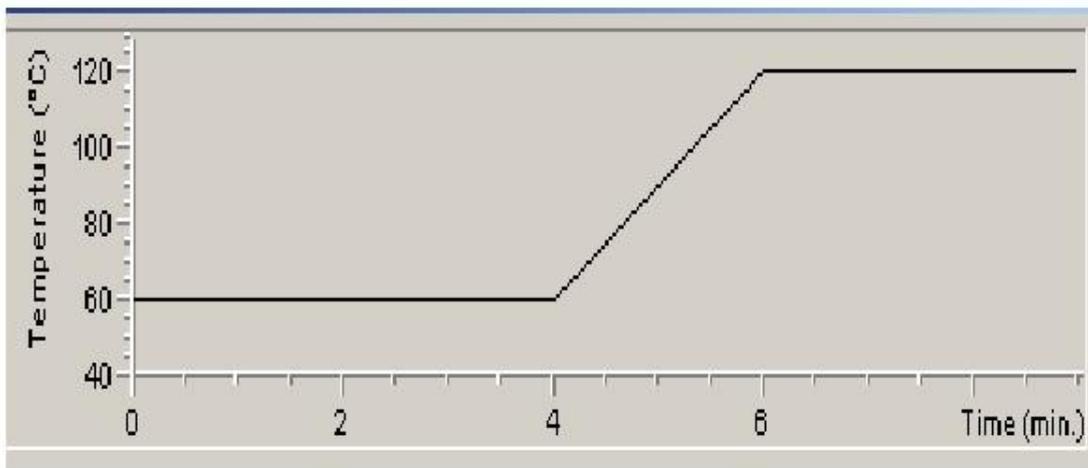


Figura 5.1. Rampa de Temperatura



Tabla 5.6 Condiciones del Detector FID

| DETETOR | |
|-----------------|----------------------|
| Temperatura | 250 °C |
| Flujo Hidrogeno | 40 ml/minuto |
| Flujo de aire | 400 ml/minuto |
| Mode | Constant makeup flor |
| Makeup flow | 25 ml/min. |
| Makeup gas type | Nitrógeno |
| Flama | On |
| Electrometer | On |
| Lit Offset | 2 |

5.1.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución stock I (estándar de metanol, etanol y acetona)

Colocar en un matraz volumétrico de 50ml, 25 ml de agua, y las cantidades correspondientes que indican la tabla 5.7 aforando con agua destilada, tapar con parafilm y refrigerar a 4°C.

Tabla 5.7 Preparación de solución stock metanol, etanol y acetona

| Compuesto | Densidad mg/dl | µL Volumen del compuesto | Concentración mg/dL. |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Etanol | 81000 | 796 | 1256.088 |
| Metanol | 78600 | 390 | 617.604 |
| Acetona | 78800 | 160 | 252.800 |



$$C_i = \frac{\rho_i \left(\frac{mg}{dl} \right) \times V_i (dl)}{V_{AFORO} (dl)}$$

Solución stock II (estándar interno de Isobutanol para curva de calibración)

Agregar 580 µl de isobutanol a un matraz de 50 ml, aforar con agua destilada, Tapar con parafilm y guardar a 4°C.

$$\rho_{ISOBUTANOL} = 0.802 \frac{g}{cm^3}$$

$$C_{STOCKSTDINTERNO} = \frac{C_{ISOBUTANOL} \times V_{ISOBUTANOL}}{V_{AFORO}} = \frac{80200 \frac{mg}{dL} \times 0.00580dL}{0.5dL} = \frac{465.16 mg}{0.5dL} = 930.32 \frac{mg}{dL}$$

Solución stock III (Estándar interno para muestras)

En un matraz aforado de 1 L agregar 233 µL de isobutanol y aforar con agua

$$C_{STOCKSTDINTERNO} = \frac{C_{ISOBUTANOL} \times V_{ISOBUTANOL}}{V_{AFORO}} = \frac{80200 \frac{mg}{dL} \times 0.00233dL}{1dL} = \frac{186.866 mg}{1dL} = 186.87 \frac{mg}{dL}$$

Soluciones Stock IV (Curva de calibración según la tabla 5.2)

La curva de calibración se prepara con la soluciones stock I y II tomando en cuenta las cantidad de cada stock indicadas en la tabla 5.8



Tabla 5.8 Preparación de la curva de calibración

| Soluciones stock IV | No de matraz | | | | | |
|-------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|--------|
| | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | STD6 |
| µL de solución Stock I | 10 | 25 | 50 | 100 | 150 | 250 |
| µL de solución stock II | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Aforo con agua destilada (ml) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Compuesto | Concentración de de las soluciones Stock IV en mg/dL. | | | | | |
| Acetona | 0.081 | 0.202 | 0.404 | 0.809 | 1.213 | 2.022 |
| Metanol | 0.201 | 0.502 | 1.003 | 2.007 | 3.010 | 5.017 |
| Etanol | 0.400 | 1.001 | 2.002 | 4.004 | 6.006 | 10.011 |
| Isobutanol | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| Soluciones stock IV | No de matraz | | | | | |
| | STD7 | STD8 | STD9 | STD10 | STD11 | STD12 |
| µL de solución Stock I | 500 | 750 | 1000 | 1250 | 1500 | 2000 |
| µL de solución stock II | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Aforo con agua destilada (ml) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Compuesto | Concentración de de las soluciones Stock IV en mg/dL. | | | | | |
| Acetona | 4.045 | 6.067 | 8.090 | 10.112 | 12.134 | 16.179 |
| Metanol | 10.034 | 15.051 | 20.067 | 25.084 | 30.101 | 40.135 |
| Etanol | 20.022 | 30.032 | 40.043 | 50.054 | 60.065 | 80.087 |
| Isobutanol | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| Soluciones stock IV | No de matraz | | | | | |
| | STD13 | STD14 | STD15 | STD16 | STD17 | |
| µL de solución Stock I | 2500 | 3000 | 3500 | 4000 | 5000 | |
| µL de solución stock II | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | |
| Aforo con agua destilada (ml) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | |
| Compuesto | Concentración de de las soluciones Stock IV en mg/dL. | | | | | |
| Acetona | 20.224 | 24.269 | 28.314 | 32.358 | 40.448 | |
| Metanol | 50.168 | 60.202 | 70.236 | 80.270 | 100.337 | |
| Etanol | 100.108 | 120.130 | 140.152 | 160.173 | 200.217 | |
| Isobutanol | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | |



Soluciones Stock V (estándares para selectividad)

La preparación de las soluciones de cada compuesto fueron calculadas con la siguiente ecuación.

$$V_i = \frac{C_i \times V_i}{C_f}$$

$\frac{\text{(mg)}}{\text{(dl)}} \times \overline{V_i} \text{ (}\mu\text{l)}$

Tabla 5.9 Preparación de soluciones para selectividad

| COMPUESTO | DENSIDAD (mg/dl) | $\mu\text{l DE COMPUESTO}$ | AFORO | CONCENTRACIÓN (mg/dl) |
|--------------|------------------|----------------------------|-------|-----------------------|
| Isopropanol | 78600 | 13.0 | 100 | 10 |
| Cloroformo | 148300 | 17.0 | 100 | 10 |
| Isobutanol | 80200 | 12.0 | 100 | 10 |
| Éter etílico | 71340 | 14.0 | 100 | 10 |
| Butanol | 80980 | 12.0 | 100 | 10 |
| Hexano | 65500 | 15.0 | 100 | 10 |
| Acetona | 78800 | 13.0 | 100 | 10 |
| Benceno | 87200 | 11.0 | 100 | 10 |
| Tolueno | 87200 | 11.0 | 100 | 10 |
| Metanol | 78600 | 13.0 | 100 | 10 |
| Etanol | 81000 | 12.0 | 100 | 10 |

Soluciones Stock IX (estándares para repetibilidad)

Para repetibilidad se preparan los estándares utilizando las siguientes soluciones stock VI, VII y VIII en las cantidades especificadas en la tabla 5.10.

Solución Stock VI colocar en un matraz de 50 ml. 160 uL de Acetona, 396 de Metanol, 1590 de Etanol.

Solución Stock VII colocar en un matraz de 50 ml. 240 uL de Acetona, 554 uL de Metanol, 1348 uL de Etanol.

Solución Stock VIII colocar en un matraz de 25 ml. 240 uL de Acetona, 592 de Metanol, 1268 de Etanol.



Tabla 5.10. Soluciones estándar para repetibilidad.

| COMPUESTO | | μl | μl | AFORO | C_{STD} |
|-----------|------------|---------------|---------------|-------|------------------|
| | | STOCK VI | STOCK II | ml. | (mg/dl) |
| STD-R1 | METANOL | 500 | 500 | 50 | 25 |
| | ETANOL | | | | 100 |
| | ACETONA | | | | 10 |
| | ISOBUTANOL | | | | 75 |
| COMPUESTO | | μl | μl | AFORO | C_{STD} |
| | | STOCK VII | STOCK II | ml. | (mg/dl) |
| STD-R2 | METANOL | 1000 | 500 | 50 | 70 |
| | ETANOL | | | | 170 |
| | ACETONA | | | | 30 |
| | ISOBUTANOL | | | | 75 |
| COMPUESTO | | μl | μl | AFORO | C_{STD} |
| | | STOCK VIII | STOCK II | ml. | (mg/dl) |
| STD-R3 | METANOL | 1500 | 500 | 50 | 150 |
| | ETANOL | | | | 320 |
| | ACETONA | | | | 60 |
| | ISOBUTANOL | | | | 75 |

5.1.3 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Preparación de estándares para la curva de calibración, se toman las 17 soluciones Stock IV. La concentración final de los estándares está indicada en la tabla 5.5

- Preparar 17 viales para headspace etiquetando previamente de 1 al 17
- Colocar 0.4 ml de sangre, orina ó agua (según la curva a preparar) libre de alcohol, en cada vial
- Colocar 1.6 ml de la solución stock IV de manera correspondiente, número de estándar al número del vial.
- Colocar la septum y arandela de aluminio y sellar perfectamente con engoladora.



Tabla 5.11 Concentración final de estándares en la matriz

| Soluciones stock IV | | No de Estándar | | | | | |
|--|------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | STD6 |
| ml de cada estándar | | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| ml de matriz (sangre u orina) | | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Concentración final de cada estándar en mg/dL. | Acetona | 0.40 | 1 | 2.0 | 4.0 | 6.0 | 10.0 |
| | Metanol | 1.0 | 2.5 | 5.0 | 10.0 | 15.0 | 25.0 |
| | Etanol | 2.0 | 5.0 | 10.0 | 20.0 | 30.0 | 50.0 |
| | Isobutanol | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 |
| Soluciones stock IV | | STD7 | STD8 | STD9 | STD10 | STD11 | STD12 |
| ml de cada estándar | | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| ml de matriz (sangre u orina) | | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Concentración final de cada estándar en mg/dL. | Acetona | 20.0 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| | Metanol | 50.0 | 75 | 100 | 125 | 150 | 200 |
| | Etanol | 100.0 | 150 | 200 | 250 | 300 | 400 |
| | Isobutanol | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 |
| Soluciones stock IV | | STD12 | STD14 | STD15 | STD16 | STD17 | |
| ml de cada estándar | | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | |
| ml de matriz (sangre u orina) | | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | |
| Concentración final de cada estándar en mg/dL. | Acetona | 100 | 120 | 140 | 160 | 200 | |
| | Metanol | 250 | 300 | 350 | 400 | 500 | |
| | Etanol | 500 | 600 | 700 | 800 | 1000 | |
| | Isobutanol | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | 75.00 | |



5.2 DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico, el analista debe proporcionar su resultado, este debe contener un alto nivel de confianza, que será causa del correcto estudio de los parámetros de validación en el método analítico, los parámetros de validación en el método analítico indican el procedimiento experimental que se lleva a cabo para el estudio de validación

SELECTIVIDAD

Dentro de las interferencias de matriz que pueden afectar la selectividad de los componentes etanol, metanol, acetona e isobutanol, se toman en consideración lo siguiente:

- Debido a la putrefacción de las muestra forenses, puede haber presencia de propanol butanol y hexano
- Por el consumo de bebidas adulteradas la existencia de metanol y acetona debe considerarse dentro de la matriz.
- El consumo de inhalantes benceno, tolueno, éter etílico
- Presencia de isopropanol y acetona en diabéticos
- Anestésicos como, cloroformo, propofol, sevofluoranos, halotano, fluorano, isofluorano, óxido de nitrógeno, cloruro de etilo, enflurano. Poca probabilidad.
- Presencia de alquil nitritos debido a antídoto en tratamiento por intoxicación de cianuro (Nitrito de amilo) y como droga conocida como poopers nitrito de butilo.
- Carboxihemoglobina por intoxicación de CO.

Para la selectividad se usaron las soluciones Stock V preparadas según la tabla 5.3

- a) Colocar 2 ml de solución de cada solución estándar en un vial para headspace
- b) Sellar perfectamente engargolando con septum plástico y arandela de aluminio.
- c) Colocar en el headspace y analizar los estándares con el método de Volátiles
- d) Verificar los tiempos de retención de cada componente.



REPETIBILIDAD

Para establecer la repetibilidad del método se consideran las soluciones stock No IX marcadas en la tabla 5.4

- a) Tomar 25 viales para headspace y colocar 400 uL de sangre negativa en c/u
- b) Adicionar 1600 uL de solución STD-R1 de la tabla 5.4 en c/u
- c) Tomar 6 viales para headspace y colocar 400 uL de sangre negativa en c/u
- d) Adicionar 1600 uL de solución STD-R2 de la tabla 5.4 c/u
- e) Tomar 6 viales para headspace y colocar 400 ul de sangre negativa c/u
- f) Adicionar 1600 uL de solución STD-R3 de la tabla 5.4 c/u
- g) Sellar perfectamente los 37 viales engargolando con septum plástica y arandelas de aluminio.
- e) Colocar los viales en el headspace y analizar los estándares con el método de Volátiles.
- f) Obtener las desviaciones estándar de las réplicas.

REPRODUCIBILIDAD

Para el estudio de reproducibilidad se consideró la curva de calibración como indica el apartado 5.1.3, considerando sólo los estándares STD4 al STD12

- a) Preparar la curva de calibración en diferentes días
- b) Preparar la curva de calibración con diferentes analistas
- c) Preparar muestras con diferentes analistas tomando 400 uL de sangre y 1600 uL de solución stock III
- d) Programara la corrida de las muestras con el método de volátiles y calibrar los estándares como se indica en el anexo 1

LINEALIDAD (RANGO DE TRABAJO), LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y CUANTIFICACIÓN (LOQ), SENSIBILIDAD

Para el estudio de linealidad, LOD, LOQ y sensibilidad del método se considera la preparación de la curva de calibración indica el apartado 5.1.3

Programara la corrida de las muestras y calibrar los estándares como se indica en el anexo 1



ROBUSTEZ

Las variaciones consideradas en el estudio de robustez son las siguientes:

- **Tipo de Matriz:** Preparar 3 curvas de calibración como indica el apartado 5.1.3, considerando sólo los estándares del STD4 al STD12, usar como matriz 400 uL de (sangre, orina y agua) respectivamente en cada curva de calibración, programar en el método de volátiles y calibrar como se indica en el anexo 1.
- **Volumen de muestra:** En 9 viales para headspace colocar:
 - A los 3 primeros 400 uL de sangre y 1600 uL de solución stock III
 - A 3 más 200 uL de sangre y 800 uL de solución stock III
 - A los 3 restantes 500 uL de sangre y 2000 uL de solución stock III
 - Cerrar perfectamente engargolando con septum y arandela de aluminio.
 - Programar en el método de volátiles los 9 viales preparados.
- **Tiempo de Presurización en el headspace:** Tomar 8 viales para headspace y colocar 400 uL de sangre y 1600 uL de un estándar del apartado 5.1.3.
 - Variar el tiempo de presurización del vial en el headspace a 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 min
 - Programar la inyección de 2 viales para cada variación de tiempo.
- **Agitación de los viales en el headspace:** Tomar 9 viales para headspace y colocar en cada vial 400 uL de sangre y 1600 uL un estándar intermedio del apartado 5.1.3.
 - Programar en las condiciones del headspace (3 viales sin agitación, 3 con agitación baja, y 3 con agitación alta)
- **Temperatura de calentamiento del vial:** Tomar 18 viales para headspace y un estándar interno del apartado 5.1.3.
 - Programar las condiciones del headspace temperatura de calentamiento de 40 °C a 6 muestras a una
 - Programar las condiciones del headspace temperatura de calentamiento de 60°C a 3 muestras a una
 - Programar las condiciones del headspace temperatura de calentamiento de 70°C a 3 muestras a una
 - Programar las condiciones del headspace temperatura de calentamiento de 90°C a 6 muestras a una



- **Inyectar varias veces con el mismo septum:** Tomar 4 viales para headspace y colocar en cada vial 400 uL de sangre y 1600 uL cada uno de 4 estándares de diferente concentración del apartado 5.1.3.
 - El primer estándar programar la inyección del mismo vial 5 veces.
 - Los tres 3 estándares restantes programar la inyección 3 veces del mismo vial para cada uno de ellos.

- **Tiempo de calentamiento del vial:** Tomar 12 viales para headspace y colocar en cada vial 400 uL de sangre y 1600 uL un estándar intermedio del apartado 5.1.3.
 - Modificar el tiempo de calentamiento del vial en el headspace a 5, 10 y 15 minutos.
 - A cada tiempo modificado, programar la inyección de 4 de los viales ya preparados.

- **Estudio de degradación de la muestra refrigerada (ya preparado con estándar interno en el vial):** En 21 viales para headspace colocar 400 uL de sangre y adicionar 1600 uL de un estándar del apartado 5.1.3 a cada uno
 - Sellar perfectamente los viales engargolando con septum y arandela de aluminio.
 - Programar los primeros 3 viales en el método de volátiles y obtener las concentraciones del día cero.
 - Refrigerar el resto de los viales a 4°C, tomando solo los necesarios cada día especificado.
 - Programar la inyección de 3 viales por día, en los día 2, 3,4,5,6,7.

- **Tiempo de degradación de un estándar en refrigeración:** Preparar sangre libre de alcohol, un estándar del apartado 5.1.3 y refrigerar ambos a 4°C
 - En el día cero tomar 3 viales y adicionar 400 uL de sangre y 1600 uL de la solución estándar y programar en el método de volátiles.
 - Refrigerar nuevamente tanto el estándar como la sangre.
 - Preparar del día 2 al 7, 3 viales del mismo modo y con la misma sangre y estándar de refrigeración que los utilizados en día cero. (preparando solo los 3 viales y refrigerando nuevamente sangre y estándar)
 - Programar los primeros 3 viales en el método de volátiles y obtener las concentraciones del día cero.



- **Estudio de degradación de la muestra refrigerada.** Elegir 3 muestras positivas a etanol
 - Colocar 400 uL de sangre en un vial para headspace, de cada una de las muestras por duplicado.
 - Adicionar 1600 uL de la solución stock III.
 - Sella perfectamente con septum y arandela de aluminio.
 - Programar los primeros 6 viales en el método de volátiles y obtener las concentraciones del día cero.
 - Refrigerar tanto las 3 muestras positivas como la solución stock III.
 - En los días 1,2,4,5,6,8,9, preparar del mismo modo las tres muestra por duplicado, refrigerando las muestras y el sotck al terminar de preparar las 6 muestra diarias.

RECUPERACIÓN.

- Para el estudio de recuperación preparar un estándar de etanol de 100 mg/dl.
- Tomar 2 muestra positivas a etanol por duplicado
- Leer en el cromatógrafo la concentración de etanol de la muestras
- Adicionar el estándar de 100 mg/dl de etanol a las muestras, previamente leídas, por duplicado.
- Obtener el % de recuperación

5.3. Análisis de muestras

Dentro del Tribunal Superior de Justicia del DF (Servicio Médico Forense) el médico Forense se apoya de diferentes estudios para dictaminar la causa de muerte de un cadáver dentro de tres áreas principales:

5.3.1 Muestreo

Durante la toma de muestra es necesario el uso de guantes de latex, el material para la recolección de la muestra debe estar perfectamente limpio y secos (tubos de plástico libre de anticoagulante de 15 ml, botes de plástico, jeringas y pipetas)



Se debe cumplir la siguiente metodología por cuestiones de cadena de custodia y veracidad de la muestra.

- Debe de rotularse cada tubo con el número de expediente, antes de colocar cada muestra.
- Registrar en la hoja de cadena de custodia siguientes datos de cada muestra:

| NOMBRE | EDAD | TIPO DE MUESTRA | EXPEDIENTE | ANÁLISIS REQUERIDOS |
|-------------|---------|-----------------|------------|---------------------|
| Desconocido | 25 años | Sangre | 0001 | QT y OH |
| | | | | |
| | | | | |

- Se llena una tarjeta por cada muestra tomada, con los datos expresados para cada uno de los estudios solicitados en su respectiva tarjeta.

| | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Nombre _____ | |
| No Averiguación previa: _____ | No Expediente: _____ |
| Tipo de muestras: S O H | Análisis requerido: OH QT |
| Sexo: M F | Fecha: _____ Edad _____ |
| Médico Forense _____ | |

Una vez cumplidos los requisitos anteriores se procede a la toma de muestra.

Toma de muestra de sangre:

1. Tomar aproximadamente 15 ml de muestra de sangre del cerebro y depositar en los tubos para química sanguínea cuidadosamente para evitar posible contaminación de la muestra.
2. Desechar la pipeta en el contenedor de desechos biológicos.
3. Colocar en botes de plástico ambos tubos con su respectiva tarjeta.

5.3.2 Preparación de la muestra

Las muestras son recibidas con la cadena de custodia por el laboratorio de química verificando el expediente y tipo de muestra que se está recibiendo, firmando original y copia, la original se archiva en la carpeta del laboratorio de química y la copia se regresa al antiteatro para archivo de perito médico.

Los tubos que contienen las muestras son retirados de los botes de plástico con sus respectivas tarjetas y ordenadas en gradillas de acuerdo al número de expediente y colocándose en el refrigerador de muestras.



El laboratorio cuenta con dos libretas de registro una para alcoholes y una para Química Toxicológica (QT), en la cual se tiene que descargar la información de las tarjetas de cada muestra recibida.

Después de realizar el registro en las libretas correspondientes se procede a la preparación de las muestras para determinación de alcoholes.



1. Sacar de refrigeración las muestras que se trabajarán y seguir para cada una la siguiente metodología.



2. Identificar en la gradilla la muestra que se va trabajar



3. Tomar 400 µl de sangre y colocarlos en un vial para headspace



4. Depositar la sangre en un vial para headspace



5 Color 1600 μ l del estándar interno



6 Sellar perfectamente el vial



7 Colocar en headspace y programar la muestra.



8. Analizar por el método de volátiles en el software





5.3. Análisis Cualitativo y Cuantitativo.

Cargar el método de alcoholes en el cromatógrafo de gases marca Agilent,

Esperar que alcance las condiciones establecidas en el método tanto el headspace como en el equipo cromatográfico.

Programar el número de muestras a correr identificando cada una con el número de expediente

Colocar en el headspaces las muestras verificando que correspondan al vial en que se programo en el método.

Seleccionar en el headspace el número de viales a utilizar (arrancar el headspace y el método)

Esperar los resultados cualitativos y cuantitativos.

El estudio cualitativo se llevará a cabo por la respuesta de pico en los tiempos de retención establecida para:

- Etanol
- Metanol
- Acetona

El estudio cuantitativo se realizará de acuerdo a la calibración previa en el método mediante calibración por estándar interno.

En este método se obtiene las áreas de los picos del estándar interno que es el isobutanol y de los picos de etanol, metanol y acetona, el método



CAPÍTULO VI.

RESULTADOS.

El desarrollo experimental se llevo a cabo en un Cromatógrafo de gases marca agilent 6890N con detector de Ionización de Flama (FID), Inyector por Headspace, Software Chem station.

Las muestras biológicas tomadas para el desarrollo experimental fueron las ingresadas al SEMEFO-DF en el período comprendido del 01 de Enero del 2011 al 31 de Diciembre del 2011.

La experimentación se llevo a cabo mediante los parámetros previamente establecido en el capítulo V, los resultados obtenidos son desglosados en este capítulo según el orden del proceso de validación desarrollado



• Selectividad

Dentro las interferencias de matriz que pueden afectar la selectividad del método (consideradas en el apartado 5.2) y de los cuales no fue posible inyectar al método todos los compuestos mencionados por no tener acceso a los compuestos, obteniendo sólo aquellos expresados en la figura 6.1 y tabla 6.1 y 6.2

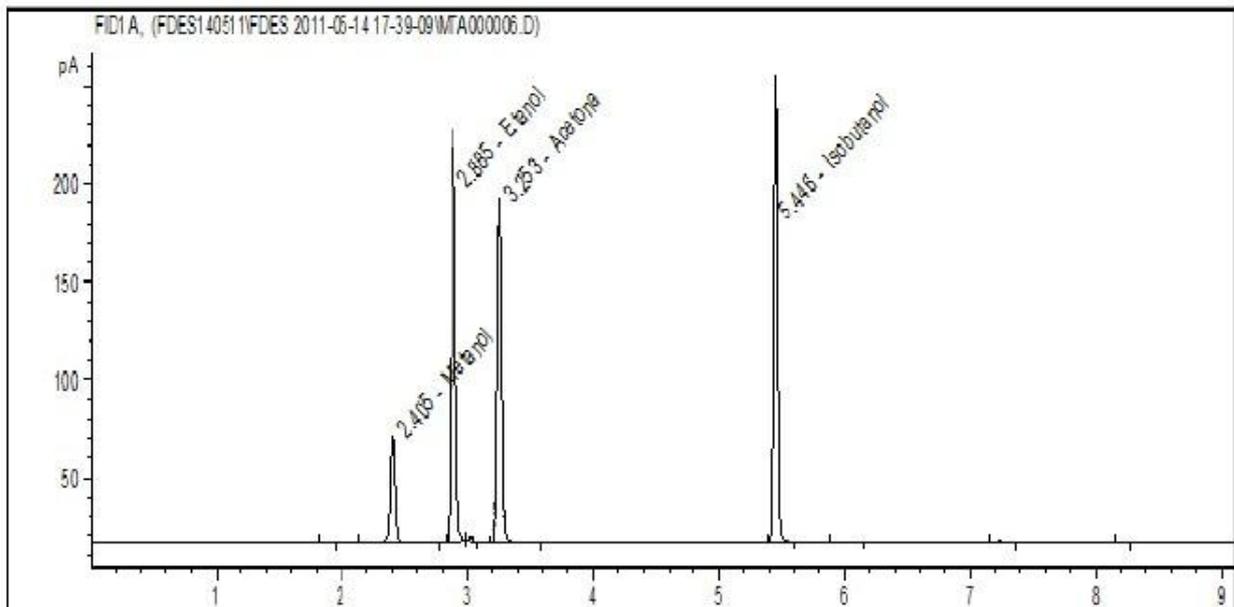


Figura 6.1. Tiempos de Retención compuestos principales

Tabla 6.1. Tiempos de Retención

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN (mg/dl) | TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos) |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|
| Metanol | 10 | 2.405 |
| Etanol | 10 | 2.885 |
| Eter Etílico | 10 | 3.029 |
| Acetona | 10 | 3.256 |
| Isopropanol | 10 | 3.302 |
| Hexano | 10 | 4.241 |
| Cloroformo | 10 | 5.144 |
| Isobutanol | 10 | 5.446 |
| Benceno | 10 | 5.629 |
| Tolueno | 10 | 7.184 |



Mediante los tiempos de retención y el ancho de los picos, se puede calcular la resolución de cada analito, que nos indica sí la separación de los compuestos es óptima, el cálculo se realiza con la siguiente ecuación y los resultados están expresados en la tabla 6.2.

$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\frac{(w_1 + w_2)}{2}}$$

Donde:

t_R : tiempo de retención cada compuestos
 w : Ancho del pico de cada compuesto
 R : Resolución

Tabla 6.2. Resoluciones de cada componente.

| COMPONENTE | Tiempo de Retención (min.) | Ancho de pico (min.) | Resolución |
|--------------|----------------------------|----------------------|------------|
| Metanol | 2.405 | 0.0400 | 12.12 |
| Etanol | 2.885 | 0.0392 | 3.75 |
| Éter Etílico | 3.029 | 0.0375 | 5.91 |
| Acetona | 3.256 | 0.0392 | 1.15 |
| Isopropanol | 3.302 | 0.0408 | 22.54 |
| Hexano | 4.241 | 0.0425 | 24.08 |
| Cloroformo | 5.144 | 0.0325 | 9.40 |
| Isobutanol | 5.446 | 0.0317 | 6.00 |
| Benceno | 5.629 | 0.0292 | 11.322 |
| Butanol | 5.950 | 0.0275 | 40.86 |
| Tolueno | 7.184 | 0.0329 | 40.86 |



• Precisión (Repetibilidad)

Tabla 6.3. Repetibilidad STD-R1

| COMPONENTE | ETANOL mg/dl | METANOL mg/dl | ACETONA mg/dl |
|----------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Réplicas | | | |
| 1 | 112.08 | 27.443 | 10.98 |
| 2 | 111.82 | 28.062 | 10.96 |
| 3 | 108.99 | 27.492 | 10.98 |
| 4 | 109.69 | 27.433 | 10.91 |
| 5 | 113.07 | 28.108 | 10.82 |
| 6 | 107.99 | 26.977 | 10.87 |
| 7 | 111.43 | 28.096 | 10.82 |
| 8 | 106.03 | 26.580 | 10.76 |
| 9 | 107.83 | 26.757 | 10.89 |
| 10 | 106.78 | 26.763 | 10.82 |
| 11 | 109.15 | 27.834 | 10.71 |
| 12 | 109.22 | 28.139 | 10.94 |
| 13 | 106.98 | 27.366 | 10.92 |
| 14 | 108.08 | 27.654 | 10.87 |
| 15 | 108.82 | 27.123 | 10.91 |
| 16 | 106.47 | 27.409 | 10.85 |
| 17 | 108.57 | 27.914 | 10.92 |
| 18 | 109.79 | 27.799 | 10.83 |
| 19 | 109.55 | 27.987 | 10.86 |
| 20 | 107.86 | 27.809 | 10.92 |
| 21 | 109.58 | 427.909 | 10.76 |
| 22 | 108.85 | 27.9894 | 10.82 |
| 23 | 109.59 | 28.4724 | 10.86 |
| 24 | 110.09 | 27.511 | 10.75 |
| 25 | 108.66 | 28.645 | 10.84 |
| C promedio. | 109.08 | 27.645 | 10.8628 |
| σ | 1.7347 | 0.5153 | 0.07196 |
| CV | 1.590% | 1.86 % | 0.6624% |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

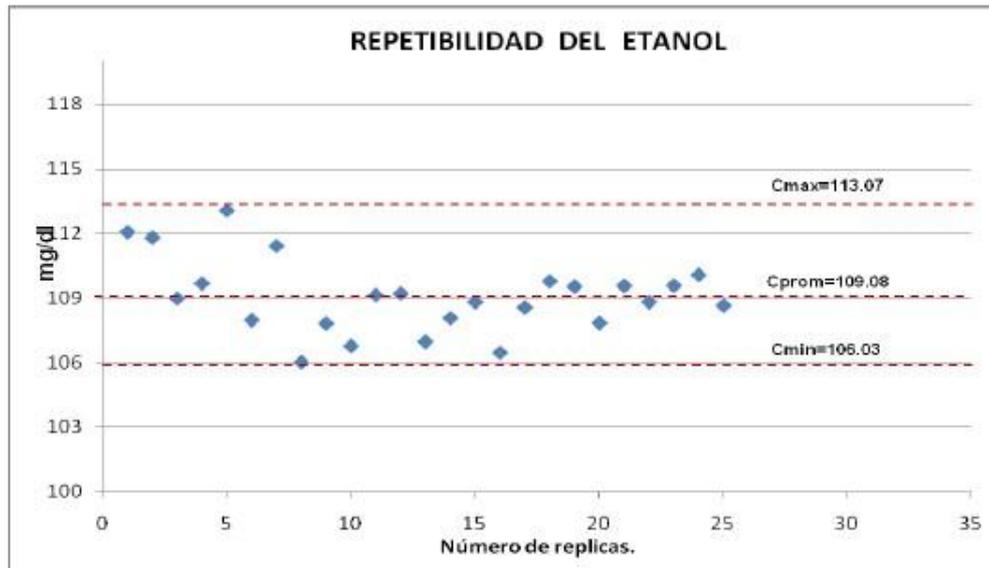


Figura 6.2. Repetibilidad del etanol

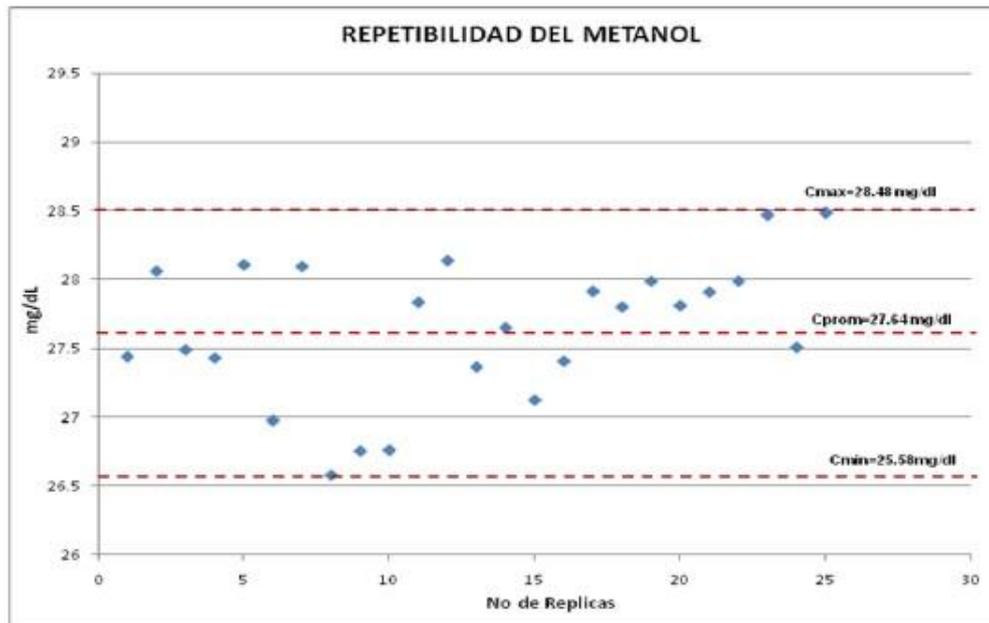


Figura 6.3. Repetibilidad del metanol

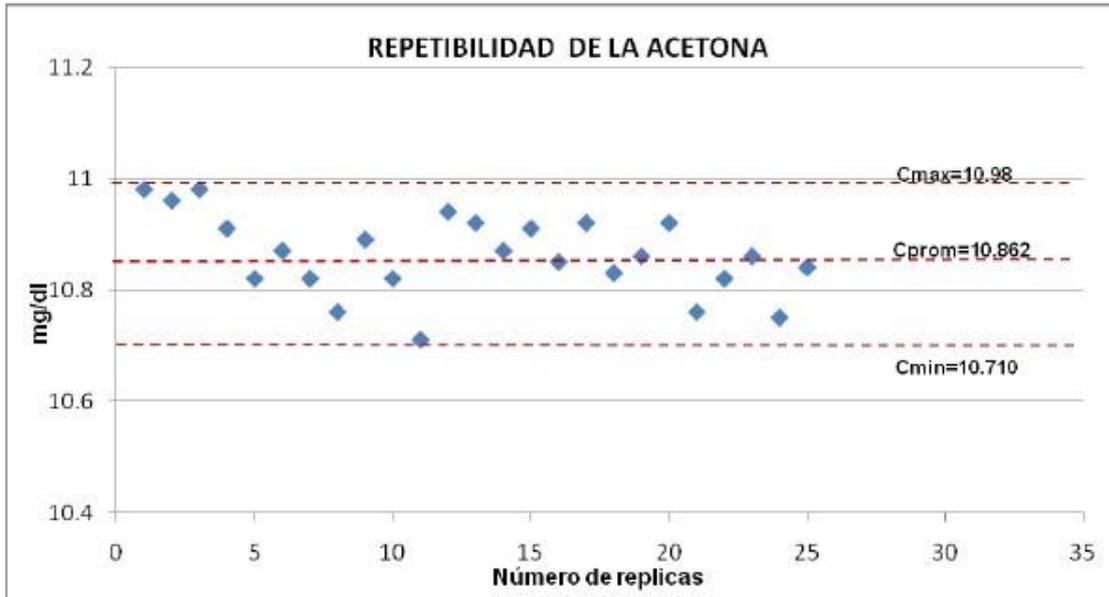


Figura 6.4. Repetibilidad de la acetona

Tabla 6.4 Repetibilidad Estándar 2 y 3

| RÉPLICAS | COMPUESTOS DEL ESTÁNDAR 2 | | | COMPUESTOS DEL ESTÁNDAR 3 | | |
|------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------|----------------|
| | ETANOL | METANOL | ACETONA | ETANOL | METANOL | ACETONA |
| 1 | 174.44 | 71.53 | 31.47 | 320.67 | 150.45 | 62.62 |
| 2 | 177.38 | 76.69 | 31.26 | 327.34 | 155.39 | 60.98 |
| 3 | 174.08 | 70.73 | 31.19 | 322.87 | 153.67 | 61.89 |
| 4 | 174.96 | 71.68 | 31.06 | 321.23 | 150.53 | 61.82 |
| 5 | 171.97 | 69.69 | 30.59 | 324.68 | 151.06 | 61.41 |
| 6 | 174.23 | 71.27 | 30.86 | 325.18 | 152.7 | 61.51 |
| Cprom | 174.51 | 72.598 | 31.071 | 323.66167 | 152.3 | 61.705 |
| | 1.7412 | 2.4402 | 0.3100 | 2.5441 | 1.9838 | 0.5541 |
| Desviación STD | | | | | | |
| Variación | 0.9977% | 3.361% | 1.00% | 0.786% | 1.302% | 0.8979% |



• **PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)**

El estudio práctico de reproducibilidad intermedia que se llevo a cabo fue considerando los factores de:

- a) Diferentes días de análisis (Tabla 6.5-6.17)
- b) Diferentes analistas:
 - Preparación de la curva de calibración (Tabla 6.17-6.24)
 - Preparación de muestras (Tabla 6.25)

a) Curvas de calibración preparadas en diferentes días de análisis.

Tabla 6.5. Curva Etanol 1

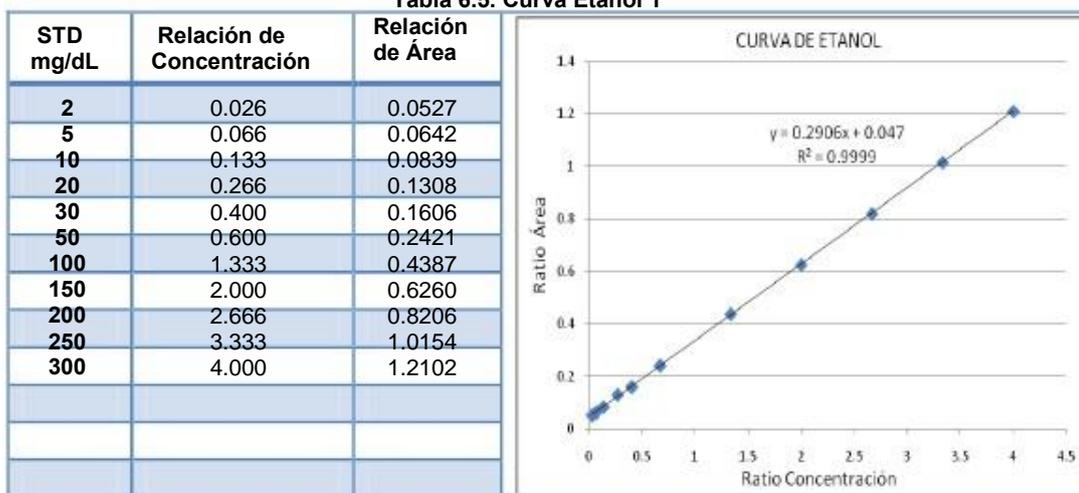


Tabla 6.6. Curva Etanol 2

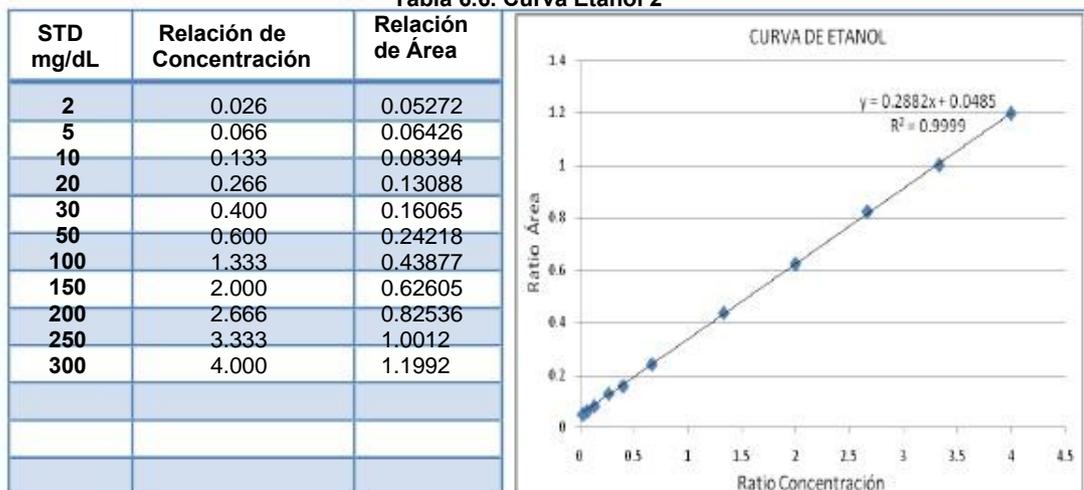




Tabla 6.7 Curva Etanol 3

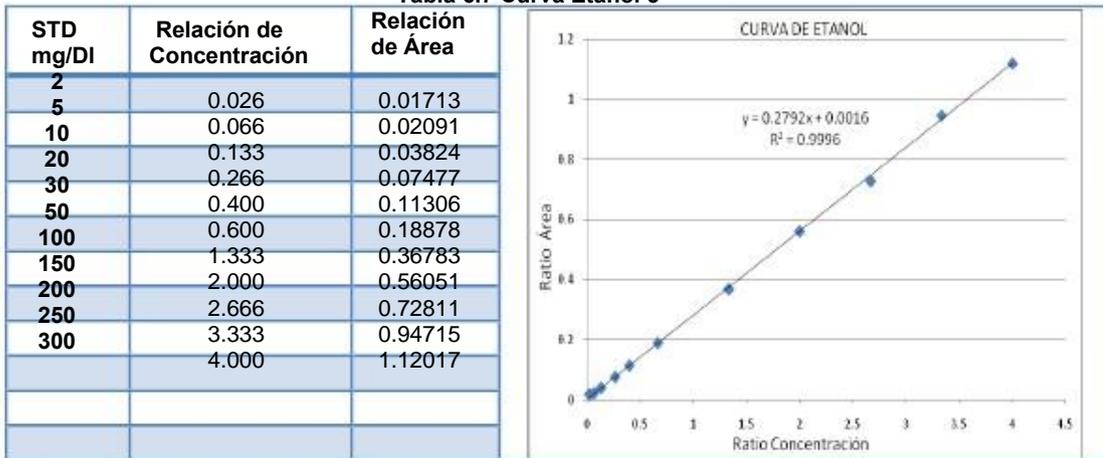


Tabla 6.8 Curva Etanol 4

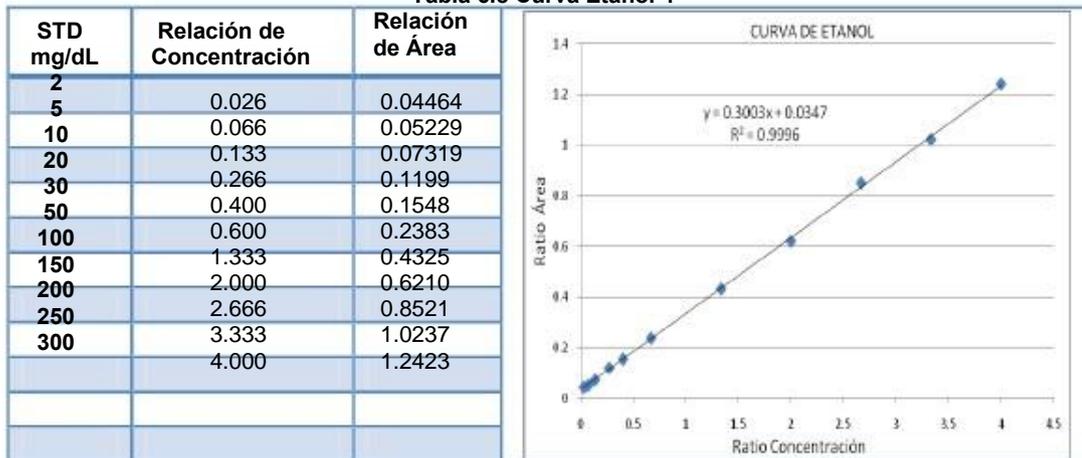


Tabla 6.9 Curva Etanol 5

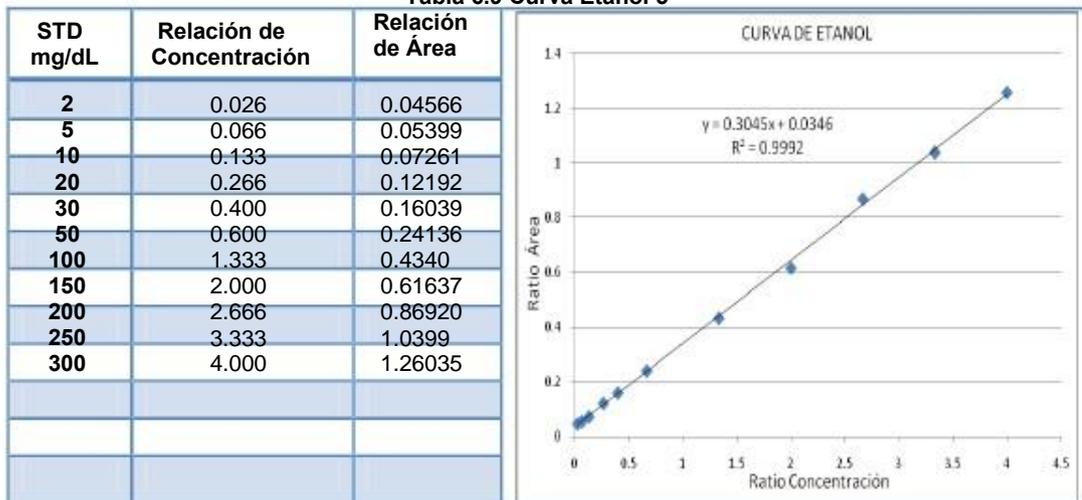




Figura 6.5. Curvas de etanol preparadas en días diferentes.

Tabla 6.10 Curva Metanol 1

| STD mg/dL | Relación de Concentración | Relación de Área |
|-----------|---------------------------|------------------|
| 5.0 | 0.0666 | 0.003514 |
| 10 | 0.1333 | 0.008944 |
| 15 | 0.2000 | 0.01732 |
| 25 | 0.3333 | 0.03062 |
| 50 | 0.6666 | 0.06686 |
| 75 | 1.0000 | 0.10470 |
| 100 | 1.3333 | 0.14361 |
| 125 | 1.6666 | 0.18850 |
| 150 | 2.000 | 0.23193 |

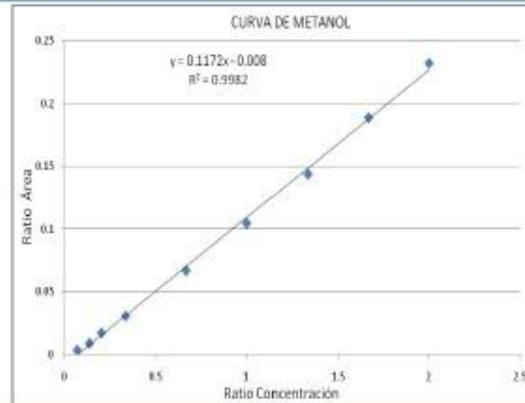


Tabla 6.11 Curva Metanol 2

| STD mg/dL | Relación de Concentración | Relación de Área |
|-----------|---------------------------|------------------|
| 5.0 | 0.0666 | 0.003935 |
| 10 | 0.1333 | 0.01104 |
| 15 | 0.2000 | 0.01717 |
| 25 | 0.3333 | 0.03064 |
| 50 | 0.6666 | 0.06899 |
| 75 | 1.0000 | 0.10821 |
| 100 | 1.3333 | 0.14817 |
| 125 | 1.6666 | 0.18507 |
| 150 | 2.000 | 0.22890 |

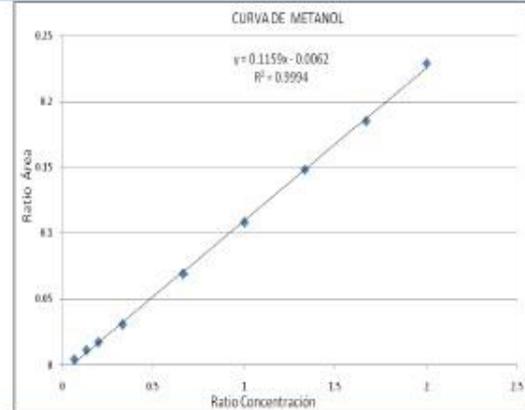




Tabla 6.12 Curva Metanol 3

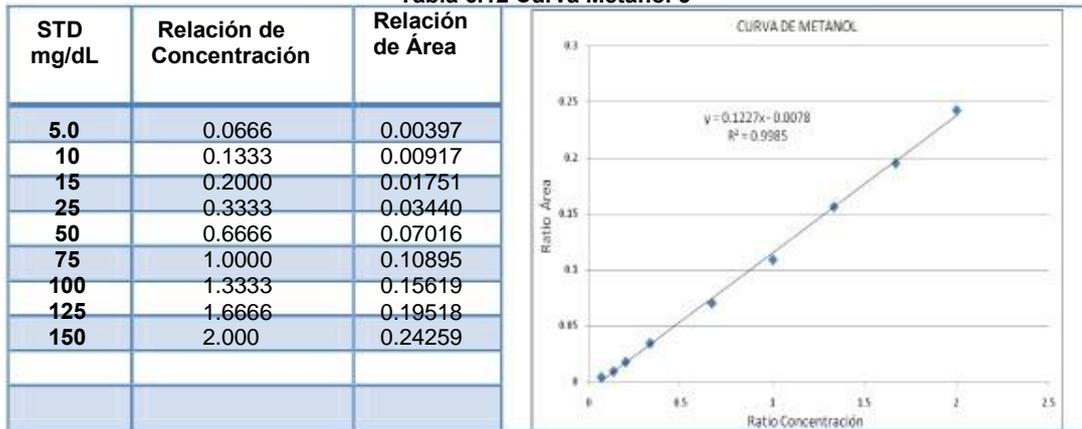


Tabla 6.13 Curva Metanol 4

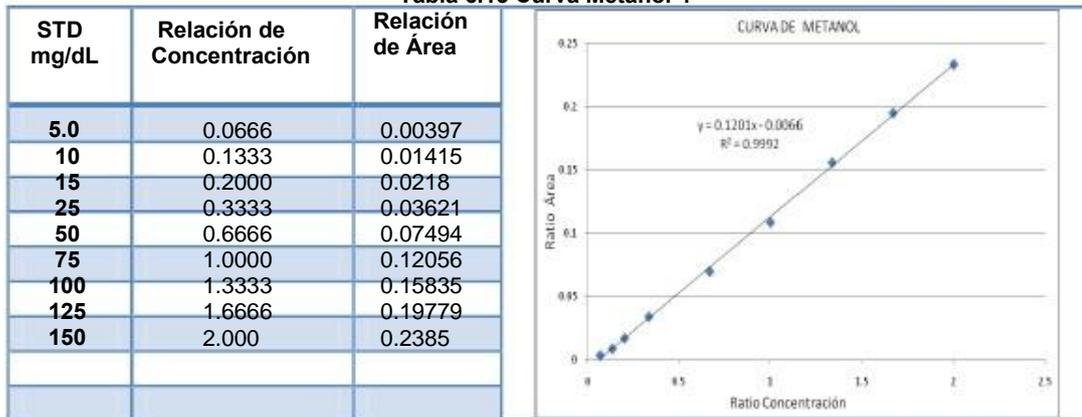
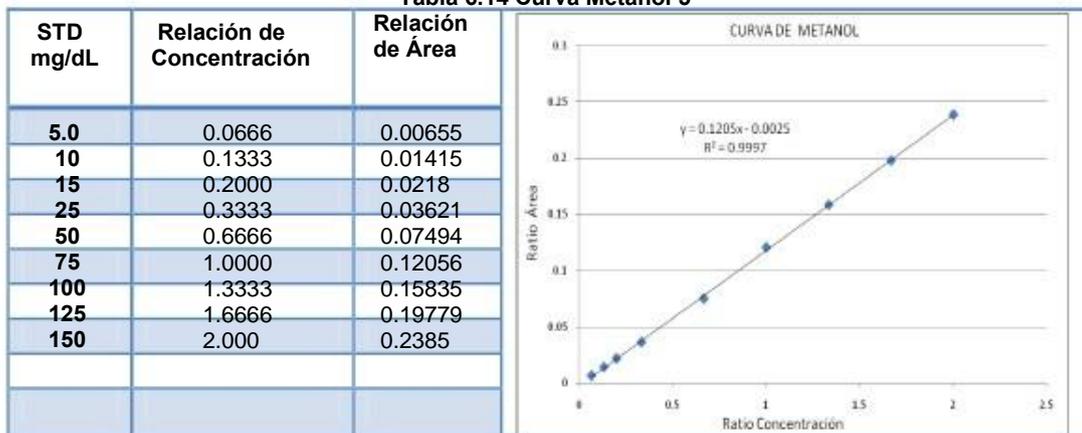


Tabla 6.14 Curva Metanol 5



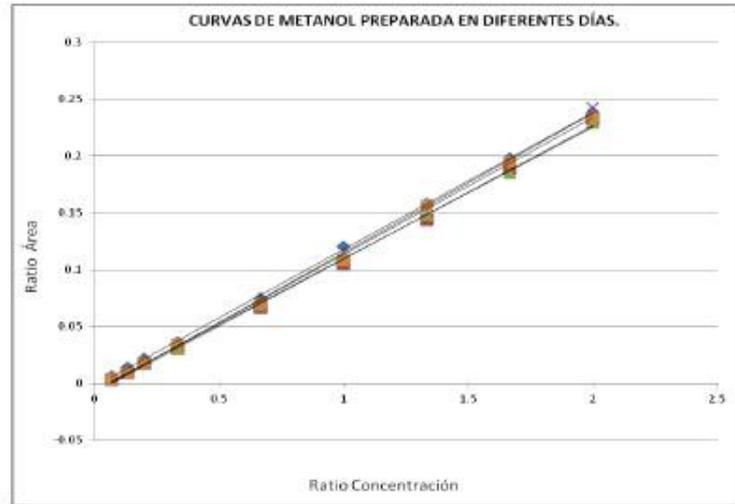


Figura 6.6. Curvas de metanol preparadas en días diferentes.

Tabla 6.15 Curva Acetona 1

| STD mg/dL | Relación de Concentración | Relación de Área |
|-----------|---------------------------|------------------|
| 0.4 | | |
| 1.0 | 0.00533 | 0.01634 |
| 2.0 | 0.01333 | 0.02686 |
| 4.0 | 0.02666 | 0.04514 |
| 6.0 | 0.05333 | 0.08495 |
| 10 | 0.0800 | 0.1185 |
| 20 | 0.1333 | 0.1910 |
| 30 | 0.2666 | 0.3655 |
| 40 | 0.4000 | 0.5244 |
| 50 | 0.5333 | 0.7120 |
| 60 | 0.6666 | 0.8630 |
| | 0.8000 | 1.0444 |
| | | |
| | | |

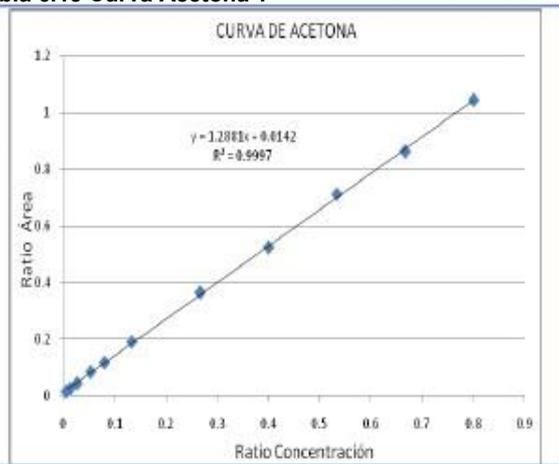


Tabla 6.16 Curva Acetona 2

| STD mg/dL | Relación de Concentración | Relación de Área |
|-----------|---------------------------|------------------|
| 0.4 | | |
| 1.0 | 0.00533 | 0.020793 |
| 2.0 | 0.01333 | 0.028034 |
| 4.0 | 0.02666 | 0.045748 |
| 6.0 | 0.05333 | 0.088269 |
| 10 | 0.0800 | 0.12398 |
| 20 | 0.1333 | 0.191326 |
| 30 | 0.2666 | 0.370025 |
| 40 | 0.4000 | 0.53944 |
| 50 | 0.5333 | 0.68100 |
| 60 | 0.6666 | 0.88371 |
| | 0.8000 | 1.04411 |
| | | |
| | | |

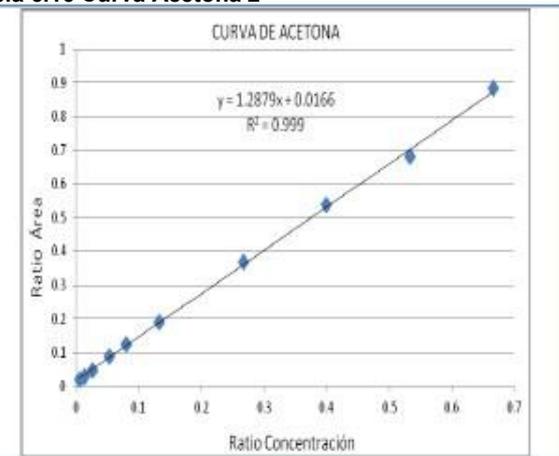




Tabla 6.17 Curva Acetona 3

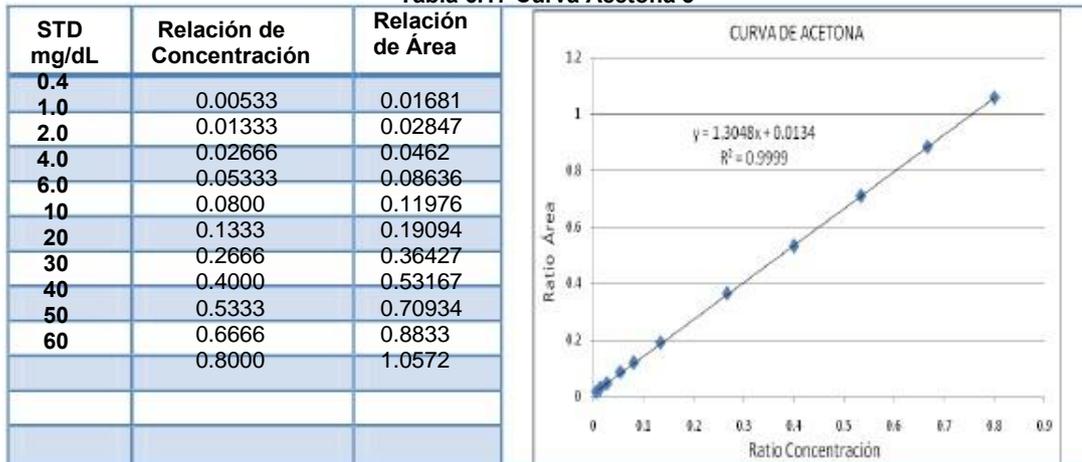


Tabla 6.18 Curva Acetona 4

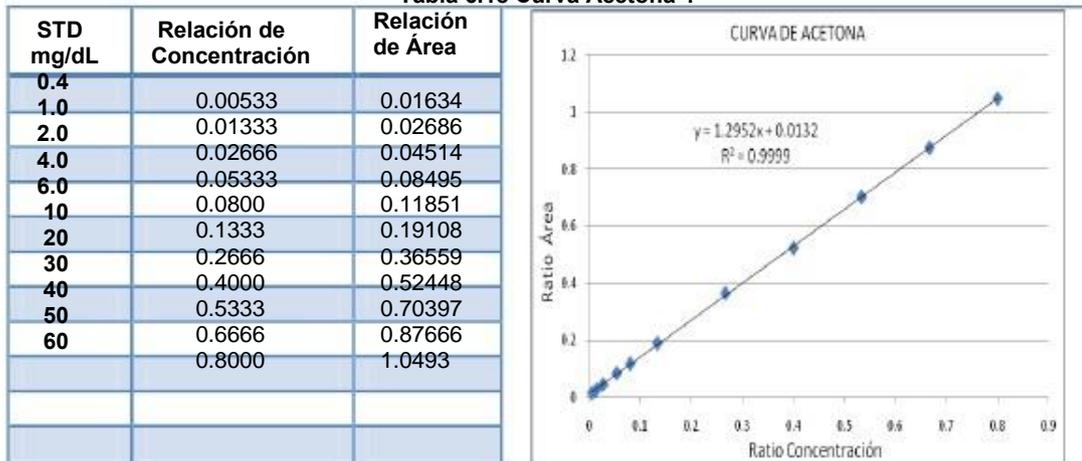
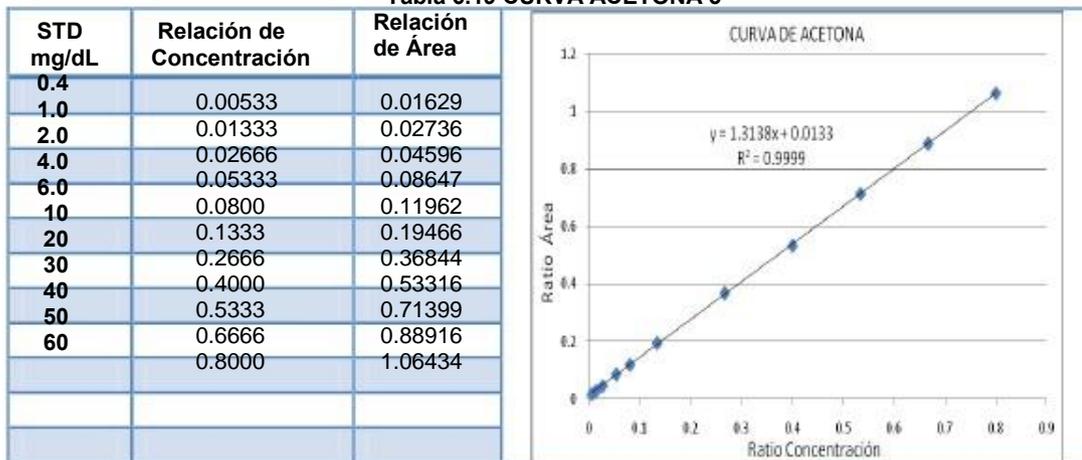


Tabla 6.19 CURVA ACETONA 5



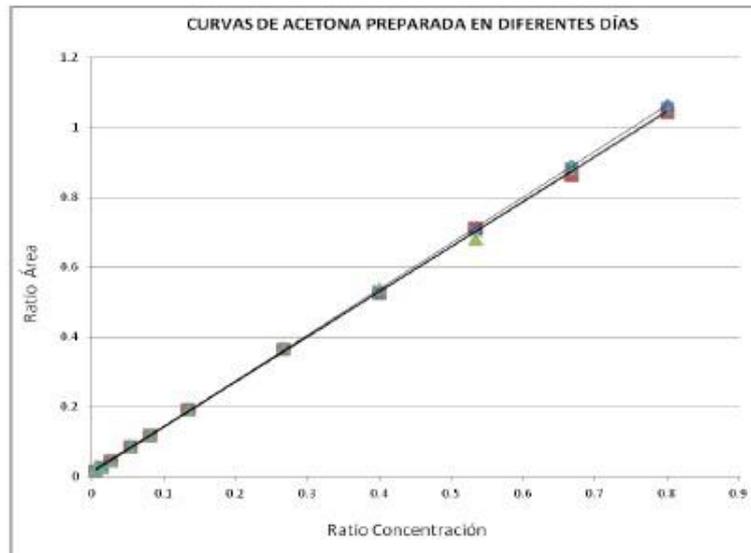


Figura 6.7. Curvas de Acetona preparadas en días diferentes.

b) Curvas de calibración preparadas por varios analistas

Tabla 6.20. Curva Metanol Analista 1.

| STD mg/dL | Relación de Relación Concentración de Área | |
|-----------|--|-------|
| 10 | | |
| 15 | 0.133 | 0.010 |
| 25 | 0.200 | 0.015 |
| 50 | 0.333 | 0.067 |
| 75 | 0.667 | 0.125 |
| 100 | 1.000 | 0.165 |
| 125 | 1.333 | 0.219 |
| 150 | 1.667 | 0.294 |
| 200 | 2.000 | 0.341 |
| | 2.667 | 0.465 |

CURVA DE METANOL

$y = 0.1765x - 0.0071$
 $R^2 = 0.9956$

Tabla 6.21. Curva Metanol Analista 2.

| STD mg/dL | Relación de Relación Concentración de Área | |
|-----------|--|-------|
| 10 | | |
| 15 | 0.133 | 0.009 |
| 25 | 0.200 | 0.015 |
| 50 | 0.333 | 0.028 |
| 75 | 0.667 | 0.119 |
| 100 | 1.000 | 0.152 |
| 125 | 1.333 | 0.216 |
| 150 | 1.667 | 0.264 |
| 200 | 2.000 | 0.288 |
| | 2.667 | 0.370 |

METANOL

$y = 0.148x - 0.0022$
 $R^2 = 0.9819$



Tabla 6.22. Curva Metanol Analista 3.

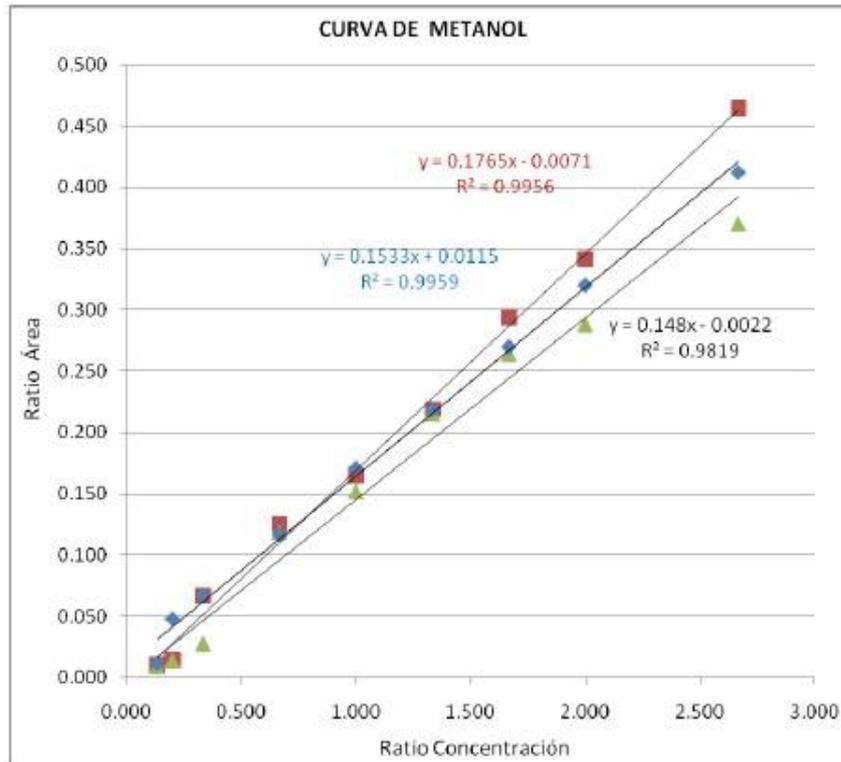
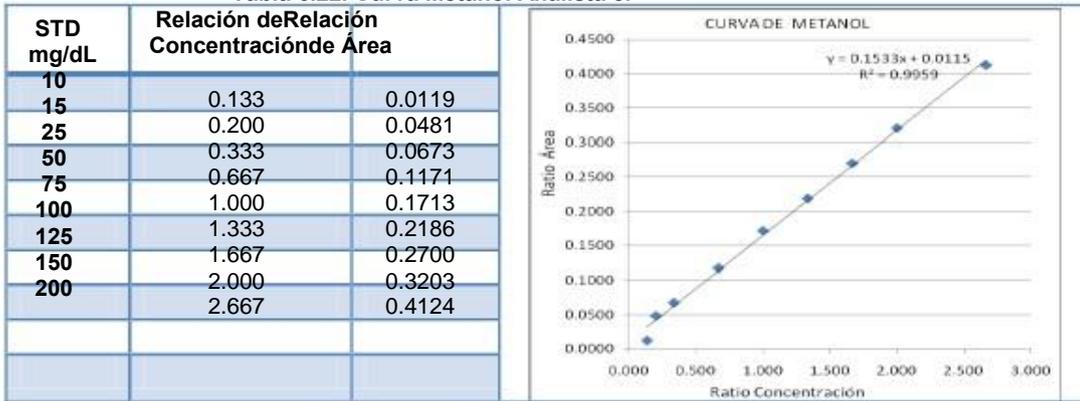


Figura 6.8. Curva de metanol diferentes analistas



Tabla 3.23. Curva Etanol Analista 1.

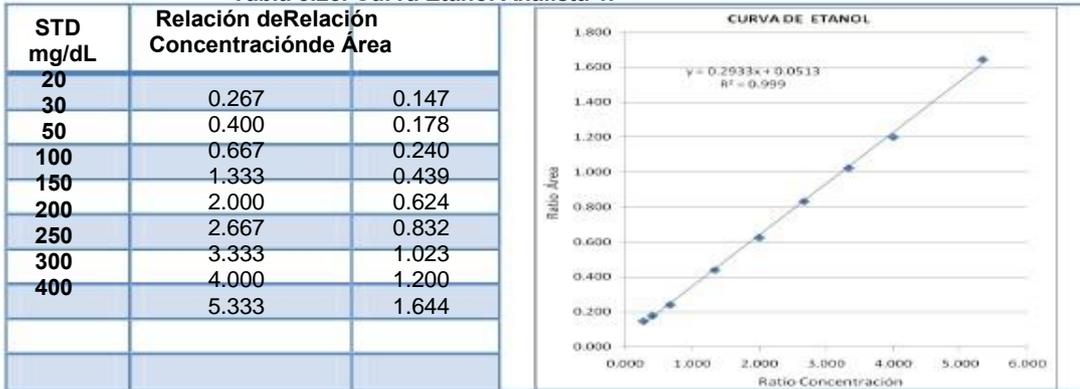


Tabla 3.24 Curva Etanol Analista 2.

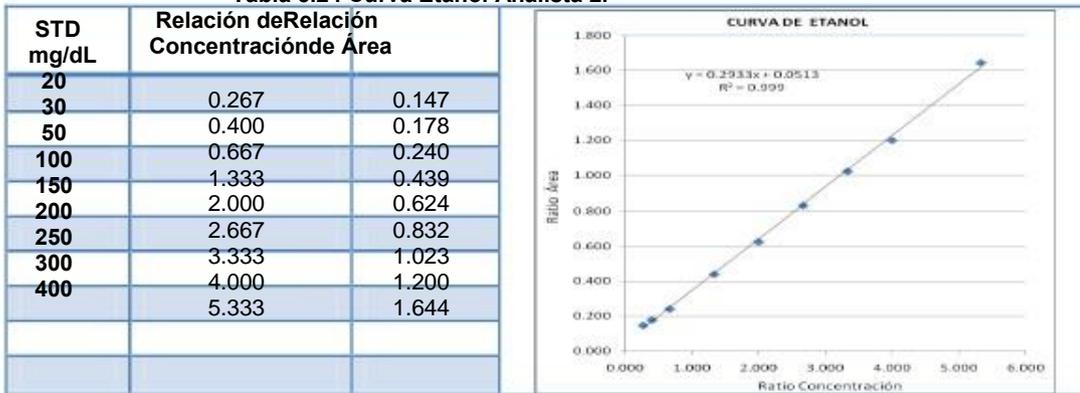
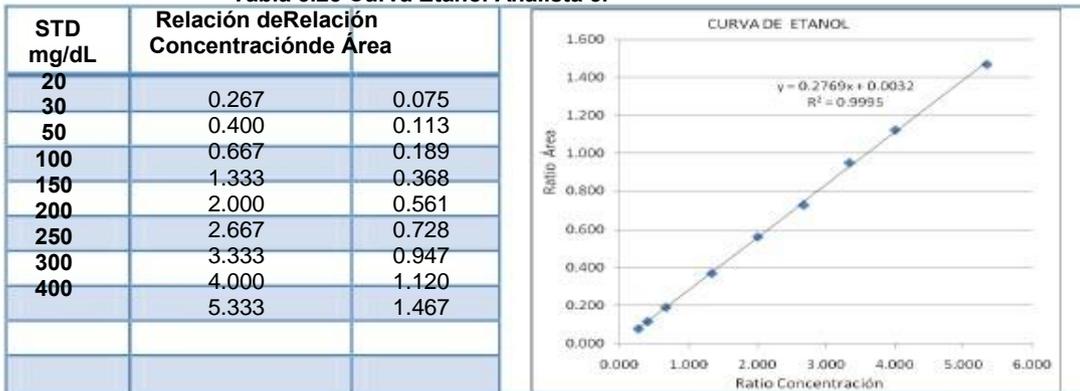


Tabla 3.25 Curva Etanol Analista 3.



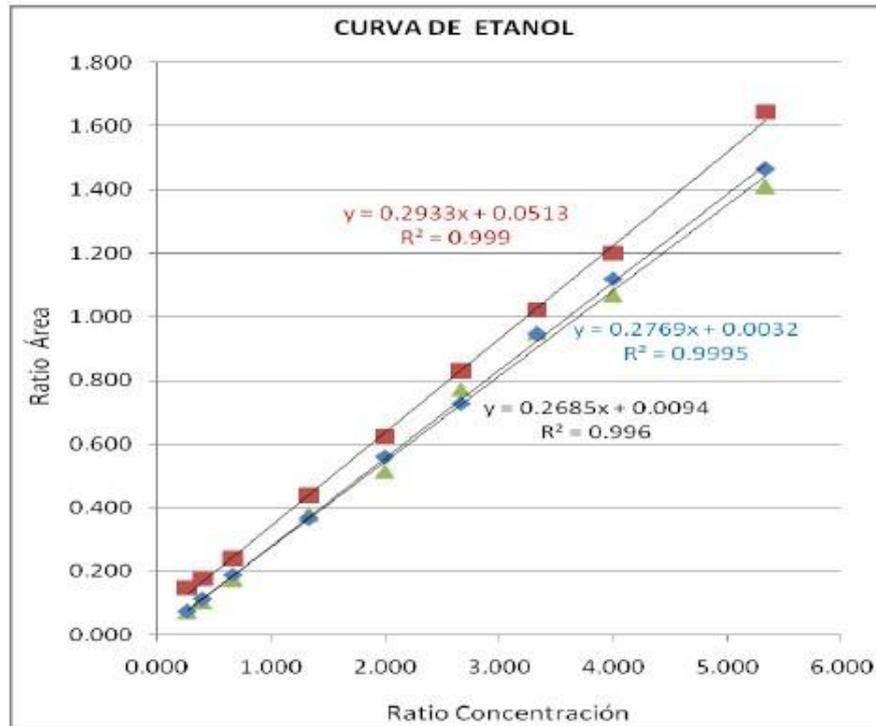


Figura 6.9. Curva de etanol diferentes analistas

Tabla 6.26 Curva Acetona Analista 1.

| STD mg/dL | Relación de Relación Concentración de Área | |
|-----------|--|-------|
| 4 | | |
| 6 | 0.053 | 0.184 |
| 10 | 0.080 | 0.215 |
| 20 | 0.133 | 0.283 |
| 30 | 0.267 | 0.436 |
| 40 | 0.400 | 0.626 |
| 50 | 0.533 | 0.776 |
| 60 | 0.667 | 1.061 |
| 80 | 0.800 | 1.208 |
| | 1.185 | 1.567 |

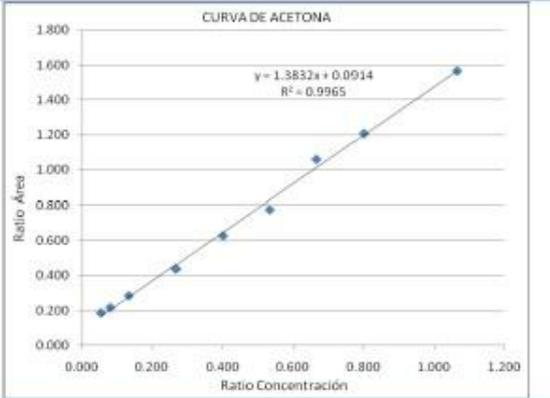




Tabla 6.27 Curva Acetona Analista 2.

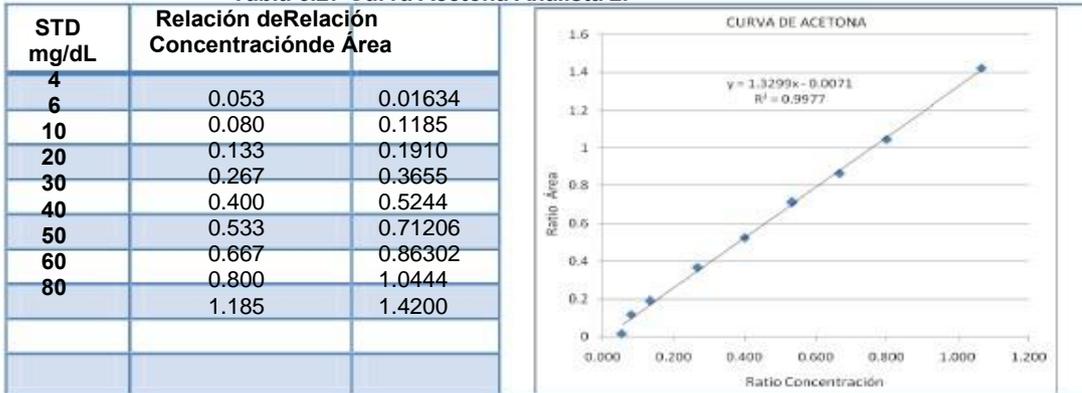


Tabla 6.28. Curva Acetona Analista 3.

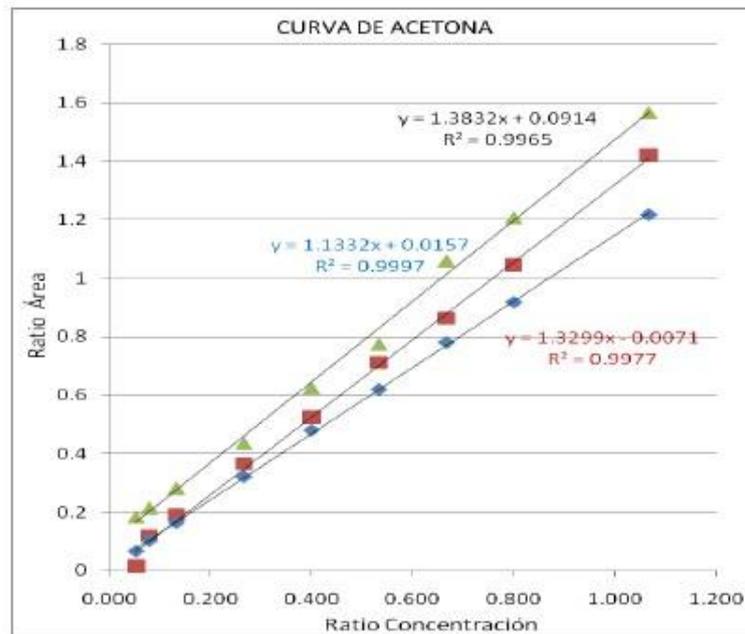
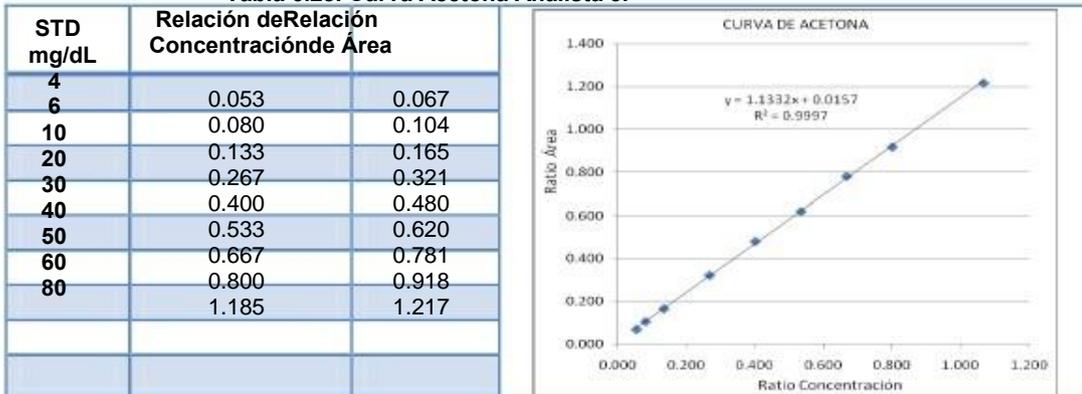


Figura 6.10. Curva de acetona diferentes analistas



Muestras preparadas por varios analistas.

Tabla 6.29 Concentración de Etanol mg/dL.

| No Analista | MUESTRA 179 | MUESTRA 180 | MUESTRA 181 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 110.593 | 141.53831 | 102.74149 |
| 2 | 121.7993 | 143.56935 | 103.18975 |
| 3 | 107.15648 | 131.0058 | 95.25341 |
| 4 | 125.1425 | 137.729 | 103.291 |
| Valor máximo | 125.1425 | 143.56935 | 103.291 |
| Promedio | 116.17282 | 138.4602 | 101.1190 |
| Valor mínimo | 107.15648 | 131.0058 | 95.25341 |
| σ | 8.6514 | 5.5281 | 3.9177 |

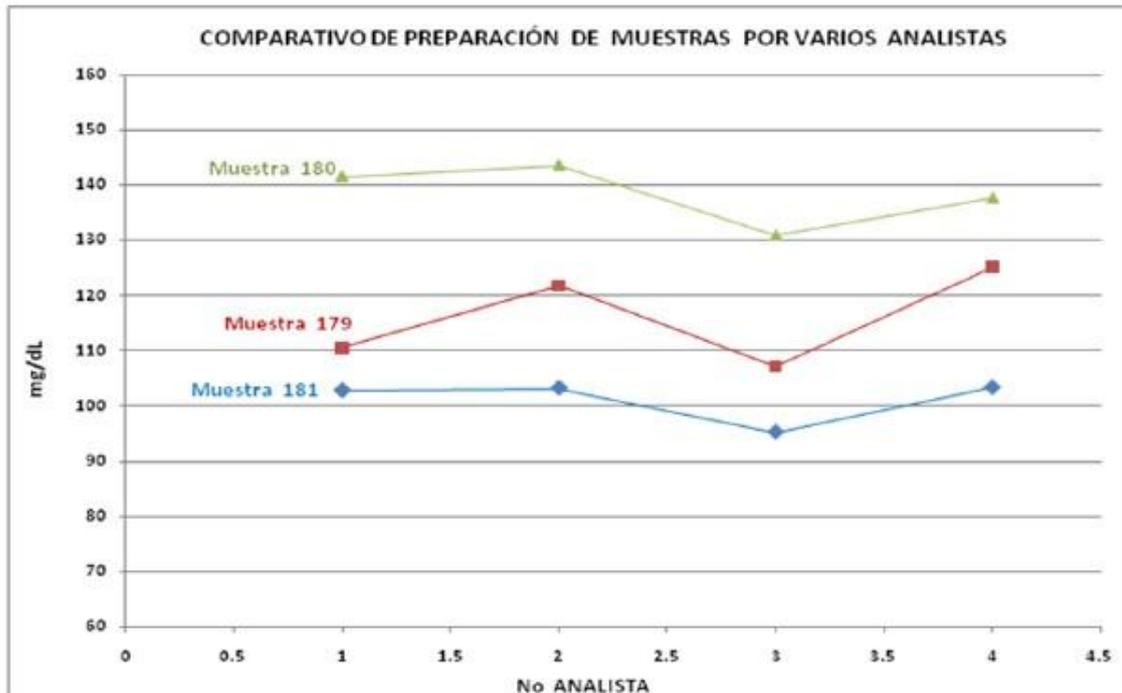


Figura 6.11. Comparativo de muestras por varios analistas.



LÍMITE DE DETECCIÓN LOD, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN LOQ E INTERVALO TRABAJO.

✓ **ETANOL:**

- Curva De Calibración
- Límite De Detección y Límite De Cuantificación
- Rango De Trabajo

Tabla 6.30 Curvas de Calibración de Etanol

| ESTÁNDAR | | RELACIÓN DE AREA (Yi) | | | |
|----------|---------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-------------|
| No | RELACIÓN CONCENTRACIÓN Xi | REPLICA 1 | REPLICA 2 | REPLICA 3 | Yi promedio |
| 1 | 0.02666 | 0.04464 | 0.04566 | 0.05272 | 0.049404 |
| 2 | 0.06666 | 0.05229 | 0.05399 | 0.06426 | 0.057698 |
| 3 | 0.13333 | 0.07319 | 0.07261 | 0.08394 | 0.076208 |
| 4 | 0.26666 | 0.11992 | 0.12192 | 0.13088 | 0.124262 |
| 5 | 0.4 | 0.15485 | 0.16039 | 0.16065 | 0.160864 |
| 6 | 0.66666 | 0.23832 | 0.24136 | 0.24218 | 0.241582 |
| 7 | 1.33333 | 0.43255 | 0.434 | 0.43877 | 0.435826 |
| 8 | 2 | 0.62102 | 0.61637 | 0.62605 | 0.621828 |

$$Yi_{promedio} = \frac{\Sigma(Yi_{replica1} + Yi_{replica2} + Yi_{replica3})}{n}$$

Donde:

Yi promedio= promedio de las replicas de cada estándar
 Yi= relación de área de cada estándar donde i va de 1 a 8
 n = número de replicas

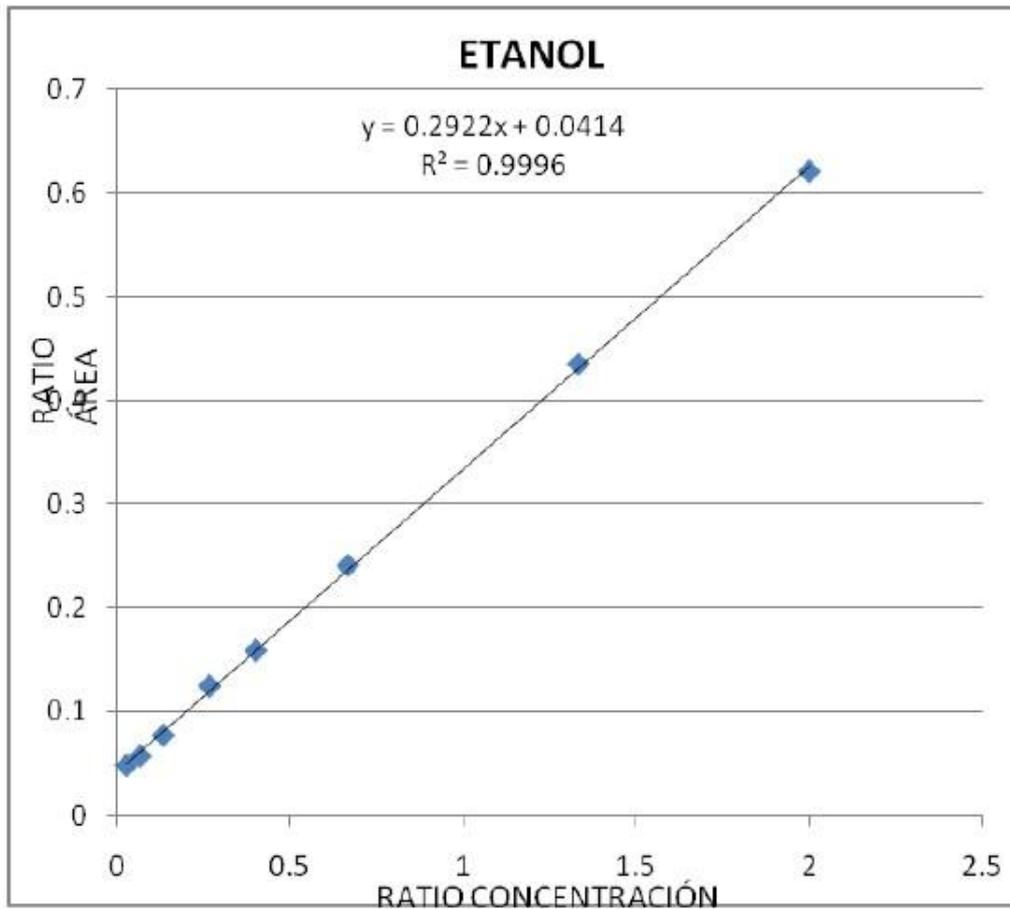


Figura 6.12. Curva de calibración del etanol

De la regresión lineal de la curva de calibración $Y = mx + b$

| | |
|-----------------------------|--------------|
| Pendiente | $m = 0.2922$ |
| Ordenada al origen | $b = 0.0414$ |
| Coefficiente de correlación | $R = 0.9996$ |



Tabla 6.31 Varianza Etanol

| No estándar | Desviación estándar Yi | Varianza Yi |
|-------------|------------------------|-------------|
| 1 | 0.00440 | 9.22989 |
| 2 | 0.00647 | 11.39232 |
| 3 | 0.00638 | 8.33186 |
| 4 | 0.00583 | 4.69793 |
| 5 | 0.00327 | 2.06528 |
| 6 | 0.00203 | 0.84515 |
| 7 | 0.00325 | 0.74793 |
| 8 | 0.00484 | 0.77940 |

Cálculo de la desviación estándar de

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum(C_i - C_{promedio})^2}{n - 1}}$$

Cálculo de la varianza.

$$CV = \frac{Si}{Y_{Promedio}}$$

Tabla 6.32 Cálculos Etanol

| No estándar N | RELACIÓN DE CONCENTRACIÓN Xi | Xi ² | (Xi - Xpromedio) | (Xi - Xpromedio) ² |
|---------------|------------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|
| 1 | 0.02666 | 0.00071 | -0.58500 | 0.34222 |
| 2 | 0.06666 | 0.00444 | -0.54500 | 0.29702 |
| 3 | 0.13333 | 0.01777 | -0.47833 | 0.22880 |
| 4 | 0.26666 | 0.07110 | -0.34500 | 0.11902 |
| 5 | 0.4000 | 0.16000 | -0.21166 | 0.04480 |
| 6 | 0.6666 | 0.44443 | 0.05499 | 0.00302 |
| 7 | 1.3333 | 1.77776 | 0.72166 | 0.05499 |
| 8 | 2.000 | 4.00000 | 1.38833 | 1.92748 |
| | Xipromedio= 0.611662 | Σ= 6.47624 | | Σ= 3.48319 |

$$X_{i \text{ promedio}} = \frac{\sum Xi}{n}$$

Donde:

Xi promedio= promedio de los Xi (Relación de concentración)

Xi= Relación de concentración de cada estándar donde i va de 1 a 8

n = número de estándares



Tabla 6.33 Cálculos Etanol

| No estándar | RELACIÓN DE ÁREA Y_i promedio | Y_i absoluta | $(Y_i \text{ promedio} - Y_i \text{ absoluta})^2$ |
|-------------|---------------------------------|----------------|---|
| 1 | 0.049404 | 0.049190 | 2.300 E-06 |
| 2 | 0.057698 | 0.060878 | 1.6252 E-05 |
| 3 | 0.076208 | 0.080359 | 1.4281 E-05 |
| 4 | 0.124262 | 0.11931 | 2.4225 E-05 |
| 5 | 0.160864 | 0.15828 | 1.2250 E-05 |
| 6 | 0.241582 | 0.23619 | 1.9553 E-05 |
| 7 | 0.435826 | 0.43099 | 1.6872 E-05 |
| 8 | 0.621828 | 0.62580 | 2.1653 E-05 |
| | | | $\Sigma = 0.0001152$ |

Con la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración:

$$Y_{i \text{ absoluta}} = mX_i + b = 0.2922 X_i + 0.0414$$

Donde:

- $Y_{i \text{ absoluta}}$ = Relación de área de cada estándar calculado con la ecuación de la curva
- X_i = Relación concentración de cada estándar
- m = pendiente de la curva
- b = ordenada a la origen

Cálculo de la desviación estándar del blanco.

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\Sigma(Y_i \text{ promedio} - Y_i \text{ absoluta})^2}{n-2}}$$

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{0.0001152}{8-2}} = 0.00438295$$

o **Límite de detección LOD del Etanol.**

Para el cálculo de límite de detección se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{X/Y}$ ($3S_{X/Y}$)

Para el límite de detección LOD

$$Y_i = mX_i + b \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{\text{LOD}} = b + 3(S_{X/Y}) \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$



Sustituyendo Y_{LOD} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 3(S_{x/Y}) = mX_{LOD} + b$$

Despejando X_{LOD}

$$X_{LOD} = \frac{b + 3(S_{x/Y}) - b}{m}$$

$$X_{LOD} = \frac{3(0.00438295)}{0.2922} = 0.044999$$

Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de detección se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{\text{Etanol}}}{C_{\text{STD interno}}}$$

Donde :
 $X_i = X_{LOD} = 0.044999$
 $C_{\text{STD interno}} = 75 \text{ mg/dl}$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{\text{Etanol LOD}} = (X_{LOD})(C_{\text{STD interno}}) = (0.044999)(75) \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$$

| |
|---|
| $C_{\text{Etanol LOD}} = 3.37496 \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$ |
|---|

o **Límite de Cuantificación LOQ Etanol.**

Para el cálculo de límite de cuantificación se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{x/Y}$ ($10 S_{x/Y}$)

$$Y_i = mX_i + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{LOQ} = b + 10(S_{x/Y}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo Y_{LOQ} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 10(S_{x/Y}) = mX_{LOQ} + b$$

Despejando X_{LOQ}

$$X_{LOQ} = \frac{b + 10(S_{x/Y}) - b}{m}$$

$$X_{LOQ} = \frac{10(0.00438295)}{0.2922} = 0.14999$$



Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de cuantificación se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{e \text{ tan ol}}}{C_{STD \text{ interno}}}$$

Donde :
 $X_i = X_{LOQ} = 0.14999$
 $C_{STD \text{ interno}} = 75 \text{ mg/dl}$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{e \text{ tan ol}} = (X_{LOQ})(C_{STD \text{ interno}}) = (0.14999)(75 \text{ mg/dl})$$

$C_{e \text{ tan ol}} \text{ LOQ} = 11.24986 \text{ mg/dl}$
 Para la confirmación de los límites de detección se preparó un estándar de 15 mg/dl, obteniendo la desviación estándar de los resultados de 9 replicas del estándar para confirmar el límite de detección.

Tabla 6.34 Cálculos Etanol

| ÁREA | RELACIÓN CONC. | RELACIÓN AREA | C mg/dl |
|----------|----------------|-----------------|--------------------|
| 30.2441 | 0.229024382 | 0.06894429 | 17.17682861 |
| 29.85349 | 0.22409499 | 0.06759167 | 16.80712428 |
| 28.84789 | 0.218989668 | 0.06619076 | 16.42422513 |
| 28.8494 | 0.211313874 | 0.06408453 | 15.84854056 |
| 29.96104 | 0.216562104 | 0.06552464 | 16.24215778 |
| 26.02076 | 0.213867707 | 0.0647853 | 16.04007802 |
| 29.25676 | 0.212934887 | 0.06452933 | 15.97011649 |
| 29.08326 | 0.214465517 | 0.06494934 | 16.08491376 |
| 28.8833 | 0.218934263 | 0.06617556 | 16.42006971 |
| | | Promedio | 16.33489493 |

Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 0.42934 \text{ Como el LOQ es } = 10 \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.42934 = 4.293$$

Como el LOQ sale más bajo que el obtenido de 11.24 mg/dl entonces se considera un nuevo límite de detección que es de 4.2 mg/dl, y se preparan replicas de esta concentración



Tabla 6.35 Cálculos Etanol

| AREA ETANOL | RELACIÓN AREA | CONCENTRACIÓN |
|-------------|---------------|---------------|
| 13.64976 | 0.029310351 | 6.95393064 |
| 14.18135 | 0.031565762 | 7.573011488 |
| 9.25005 | 0.020243666 | 4.462545574 |
| 6.97162 | 0.019968807 | 4.38703479 |
| 8.91241 | 0.019301332 | 4.203662563 |
| 8.92397 | 0.018719571 | 4.043838229 |
| 9.42275 | 0.019106849 | 4.150233195 |
| 8.72838 | 0.019811573 | 4.34383876 |
| 8.93846 | 0.019008015 | 4.12308108 |
| | Promedio | 5.065 |
| | | |
| | | |
| | | |

Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 1.3466$$

Como el LOQ es= 10σ

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.42934 = 13.466$$

Como el LOQ sale más ALTO que el obtenido de 11.24 mg/dl entonces se considera 11.24 mg/dl como verdadero límite de detección del etanol.

LOQ fina= 11.24 mg/dl para el ETANOL

o Rango de trabajo del etanol

Para la curva de calibración después de obtener el límite de cuantificación de 11.25 mg/dl. Se consideró el inicio del rango de trabajo de 15 mg/dl y se preparó la curva de calibración hasta una concentración de 1000 mg/dl de etanol, comprobando que aún sigue con la linealidad la curva de calibración (rango de trabajo), ya no se estudió rangos más altos porque las concentraciones en humanos no llegaría a valores más allá de 1000 mg/dl.



Tabla 6.36 Cálculos Etanol

| C mg/dl | RELACIÓN CONCENTRACIÓN | RELACIÓN AREA |
|---------|------------------------|---------------|
| 15 | 0.2 | 0.0617 |
| 20 | 0.266 | 0.0747 |
| 30 | 0.4 | 0.1130 |
| 50 | 0.666 | 0.1887 |
| 100 | 1.333 | 0.3678 |
| 150 | 2 | 0.5605 |
| 200 | 2.666 | 0.7281 |
| 250 | 3.333 | 0.9471 |
| 300 | 4 | 1.1201 |
| 400 | 5.333 | 1.4668 |
| 500 | 6.666 | 1.8561 |
| 600 | 8 | 2.1857 |
| 700 | 9.333 | 2.5473 |
| 800 | 10.666 | 2.8839 |
| 1000 | 13.333 | 3.7071 |
| | | |
| | | |
| | | |

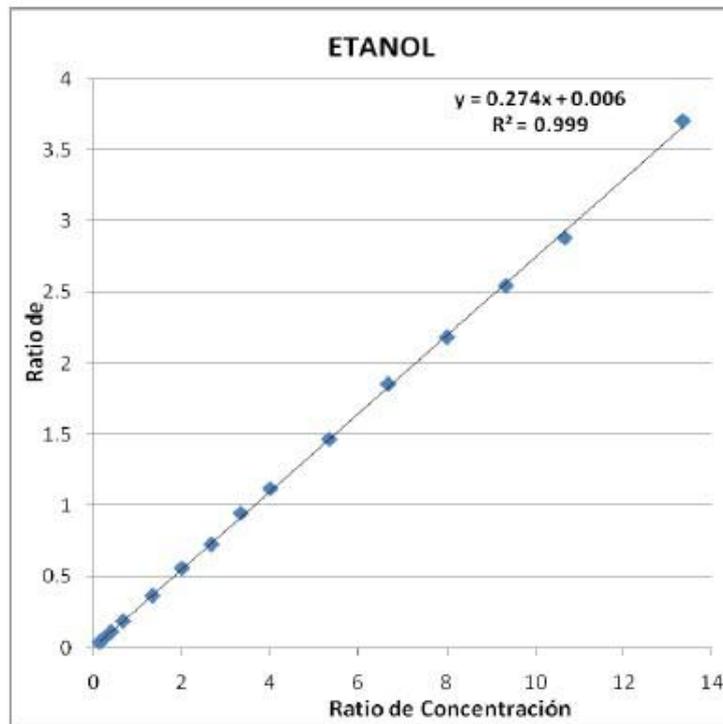


Figura 6.13. Curva de calibración del etanol.



✓ **METANOL:**

- Curva De Calibración
- Límite De Detección y Límite De Cuantificación
- Rango De Trabajo

Tabla 6.37 Cálculos Metanol

| ESTÁNDAR | | RELACIÓN DE AREA (Yi) | | | |
|----------|------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-------------|
| No | RELACIÓN DE CONCENTRACIÓN Xi | REPLICA 1 | REPLICA 2 | REPLICA 3 | Yi promedio |
| 1 | 0.0666 | 0.00397 | 0.00655 | 0.00393 | 0.004816 |
| 2 | 0.13333 | 0.00917 | 0.01415 | 0.01104 | 0.011453 |
| 3 | 0.200 | 0.01751 | 0.0218 | 0.01717 | 0.018826 |
| 4 | 0.33333 | 0.03444 | 0.03621 | 0.03064 | 0.033763 |
| 5 | 0.66666 | 0.07016 | 0.07494 | 0.06899 | 0.071363 |
| 6 | 1.000 | 0.10895 | 0.12056 | 0.10821 | 0.112573 |
| 7 | 1.33333 | 0.15619 | 0.15835 | 0.14817 | 0.154236 |
| 8 | 1.6666 | 0.19518 | 0.19779 | 0.18507 | 0.192680 |

$$Yi_{\text{promedio}} = \frac{\sum(Yi_{\text{replica1}} + Yi_{\text{replica2}} + Yi_{\text{replica3}})}{n}$$

Donde:

Yi promedio= promedio de las replicas de cada estándar
Yi= relación de área de cada estándar donde i va de 1 a 8
n = número de replicas (8)

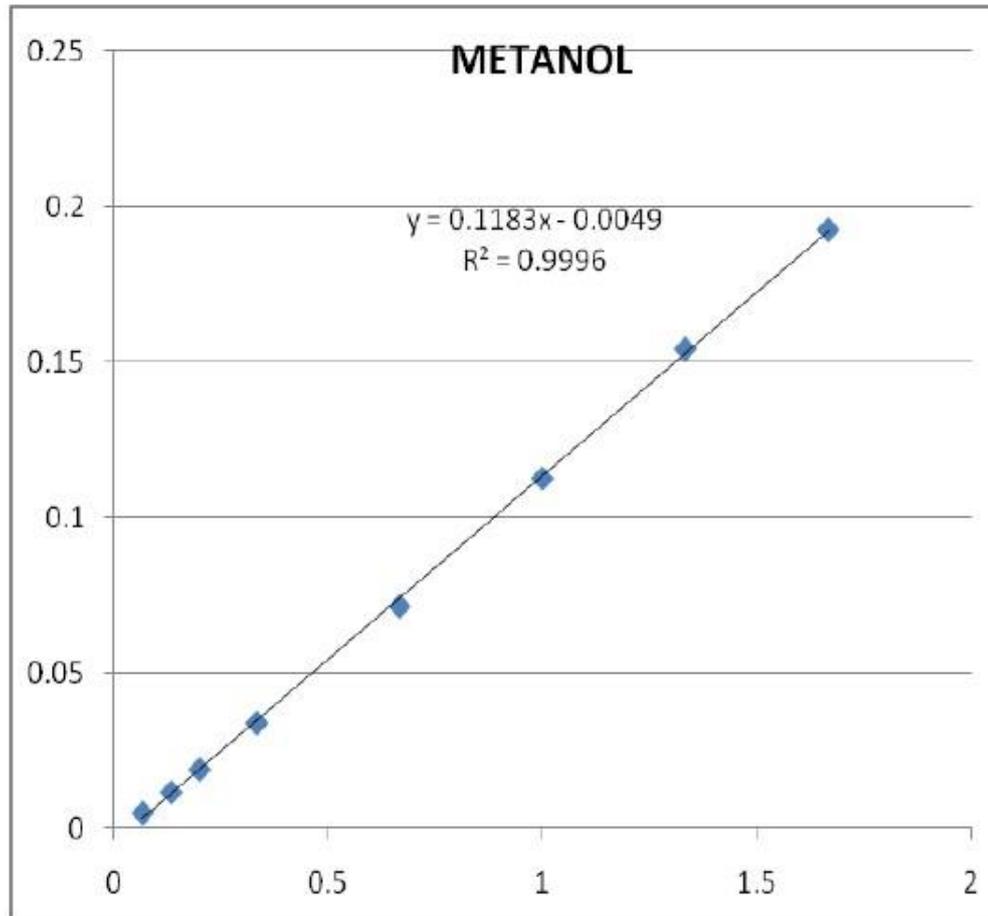


Figura 6.14. Curva de calibración metanol

De la regresión lineal de la curva de calibración $Y = mx + b$

| | |
|-----------------------------|--------------|
| Pendiente | $m = 0.1183$ |
| Ordenada al origen | $b = 0.0049$ |
| Coefficiente de correlación | $R = 0.9996$ |



Tabla 6.38 Cálculos Metanol

| No estándar | Desviación estándar Yi | Varianza Yi |
|-------------|------------------------|-------------|
| 1 | 0.001501 | 31.16769 |
| 2 | 0.002515 | 21.9638 |
| 3 | 0.002580 | 13.70708 |
| 4 | 0.002845 | 8.42921 |
| 5 | 0.003152 | 4.41717 |
| 6 | 0.006926 | 6.152918 |
| 7 | 0.005363 | 3.47760 |
| 8 | 0.006718 | 3.48682 |
| | | |
| | | |

Cálculo de la desviación estándar de

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(C_i - C_{promedio})^2}{n - 1}}$$

Cálculo de la varianza.

$$CV = \frac{Si}{Y_{Promedio}}$$

Tabla 6.39 Cálculos Metanol

| No estándar n | RELACIÓN CONCENTRACIÓN Xi | Xi ² | (Xi-Xpromedio) | (Xi-Xpromedio) ² |
|---------------|----------------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | 0.0666 | 0.00444 | -0.60833 | 0.37007 |
| 2 | 0.13333 | 0.01777 | -0.54166 | 0.29340 |
| 3 | 0.200 | 0.0400 | -0.47499 | 0.22562 |
| 4 | 0.33333 | 0.1111 | -0.34166 | 0.11673 |
| 5 | 0.66666 | 0.44443 | -0.008336 | 0.0000694 |
| 6 | 1.000 | 1.0000 | 0.32500 | 0.105627 |
| 7 | 1.33333 | 1.7777 | 0.658333 | 0.43340 |
| 8 | 1.6666 | 2.7777 | 0.991663 | 0.983396 |
| | Xipromedio= 0.67499 | | | |
| | | | | |
| | | Σ= 6.17328 | | Σ= 2.52832 |

$$X_{i \text{ promedio}} = \frac{\sum Xi}{n}$$

Donde:

Xi promedio= promedio de los Xi (Relación de concentración)
 Xi= Relación de concentración de cada estándar donde i va de 1 a 8
 n = número de estándares



Tabla 6.40 Cálculos Metanol

| No estándar | RELACIÓN ÁREA Y_i promedio | Y_i absoluta | $(Y_i \text{ promedio} - Y_i \text{ absoluta})^2$ |
|-------------|------------------------------|----------------|---|
| 1 | 0.004816 | 0.002985 | 3.35179 E-06 |
| 2 | 0.011453 | 0.010872 | 3.36858 E-07 |
| 3 | 0.018826 | 0.018760 | 4.4444 E-09 |
| 4 | 0.033763 | 0.034532 | 5.9229 E-07 |
| 5 | 0.071363 | 0.073965 | 6.77324 E-06 |
| 6 | 0.112573 | 0.113400 | 6.83378 E-07 |
| 7 | 0.154236 | 0.15283 | 1.97045 E-06 |
| 8 | 0.192680 | 0.19226 | 1.71497 E-07 |
| | | | $\Sigma = 1.38839 \text{ E-}05$ |

Con la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración:

$$Y_{i \text{ absoluta}} = mX_i + b = 0.1183 X_i - 0.0049$$

Donde:

$Y_{i \text{ absoluta}}$ = Relación de área de cada estándar calculado con la ecuación de la curva
 X_i = Relación concentración de cada estándar
 m = pendiente de la curva
 b = ordenada a la origen

Cálculo de la desviación estándar del blanco.

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\Sigma(Y_i \text{ promedio} - Y_i \text{ absoluta})^2}{n-2}}$$

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{1.38839 \text{ E-}05}{8-2}} = 0.0015211$$

o **Límite de Detección LOD del Metanol**

Para el cálculo de límite de detección se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{x/Y}$ ($3 S_{x/Y}$)



Para el límite de detección LOD

$$Y_i = mX_i + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{LOD} = b + 3(S_{x/Y}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo Y_{LOD} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 3(S_{x/Y}) = mX_{LOD} + b$$

Despejando X_{LOD}

$$X_{LOD} = \frac{b + 3(S_{x/Y}) - b}{m}$$

$$X_{LOD} = \frac{3(0.0015211)}{0.1183} = 0.038576$$

Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de detección se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{\text{etanol}}}{C_{\text{STD interno}}}$$

Donde :

$$X_i = X_{LOD} = 0.038576$$

$$C_{\text{STD interno}} = 75 \text{ mg/dl}$$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{\text{etanol}} = (X_{LOD})(C_{\text{STD interno}}) = (0.038576)(75) \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$$

| |
|--|
| $C_{\text{etanol LOD}} = 2.8932 \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$ |
|--|

o **Límite de Cuantificación LOQ del Metanol.**

Para el cálculo de límite de cuantificación se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{x/Y}$ ($10 S_{x/Y}$)

$$Y_i = mX_i + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{LOQ} = b + 10(S_{x/Y}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo Y_{LOQ} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 10(S_{x/Y}) = mX_{LOQ} + b$$



Despejando X_{LOQ}

$$X_{LOQ} = \frac{b + 10(S_{X/Y}) - b}{10(S_{X/Y})}$$

$$X_{LOQ} = \frac{10(0.0015211)}{0.1183} = 0.12858$$

Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de cuantificación se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{e\text{tan ol}}}{C_{STD\text{int erno}}}$$

Donde :

$X_i = X_{LOQ} = 0.12858$

$C_{STD\text{int erno}} = 75 \text{ mg/dl}$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{me\text{tan ol}} = (X_{LOQ})(C_{STD\text{int erno}}) = (0.12858)(75) = 9.6440$$

$$C_{me\text{tan ol}} LOQ = 9.6440$$

Para la confirmación de los límites de detección se preparó un estándar de 9.5 mg/dl, obteniendo la desviación estándar de los resultados de 9 replicas del estándar para confirmar el límite de detección.

Tabla 6.41 Cálculos Metanol

| ÁREA | RELACIÓN CONC. | RELACIÓN AREAC | mg/dl |
|---------|----------------|-----------------|---------------|
| 12.8119 | 0.1243 | 0.0292 | 9.3281 |
| 13.6257 | 0.1353 | 0.0308 | 10.1480 |
| 12.2275 | 0.1167 | 0.0280 | 8.7545 |
| 12.7475 | 0.1184 | 0.0283 | 8.8846 |
| 14.3217 | 0.1384 | 0.0313 | 10.3831 |
| 11.7499 | 0.1246 | 0.0292 | 9.3523 |
| 13.4680 | 0.1276 | 0.0297 | 9.5771 |
| 13.6520 | 0.1328 | 0.0304 | 9.9673 |
| 13.7995 | 0.1404 | 0.0316 | 10.53025 |
| | | Promedio | 9.6584 |



Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 0.6369 \text{ Como el LOQ es } = 10 \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.6369 = 6.369$$

Como el LOQ sale más bajo que el obtenido de 9.64 mg/dl entonces se considera un nuevo límite de detección que es de 7.0 mg/dl, y se preparan replicas de esta concentración

Tabla 6.42 Cálculos Metanol

| AREA ETANOL | RELACIÓN AREA | CONCENTRACIÓN |
|-------------|-----------------|---------------|
| 6.6017 | 0.0141 | 5.3128 |
| 9.8499 | 0.02192 | 8.4373 |
| 8.1499 | 0.01783 | 6.7887 |
| 6.4674 | 0.01852 | 7.0663 |
| 8.7362 | 0.01891 | 7.2257 |
| 8.7963 | 0.01845 | 7.0370 |
| 9.1831 | 0.01862 | 7.1052 |
| 8.4990 | 0.01929 | 7.3754 |
| 8.9348 | 0.01900 | 7.2581 |
| | Promedio | 7.0674 |

Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 0.08055$$

$$\text{Como el LOQ es } = 10 \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.42934 = 8.055$$

Como el LOQ se encuentra muy cercano de la concentración del LOQ preparada de 7 mg/dl, se define como límite de cuantificación para el metanol de 8.0 mg/dl.

LOQ FINAL: 8.0 mg/dl para el metanol

RANGO DE TRABAJO DEL METANOL

Para la curva de calibración después de obtener el límite de Cuantificación de 8.0 mg/dl. Se consideró el inicio del rango de trabajo de 10 mg/dl y se preparó la curva de calibración hasta una concentración de 500 mg/dl de metanol, comprobando que aún sigue con la linealidad la curva de calibración, dejando hasta ahí como rango de trabajo.



Tabla 6.43 Cálculos Metanol
RELACIÓN
mg/dl CONCENTRACIÓN
ÁREA

100.13330.0119

150.20.0481

| | | |
|-----|--------|--------|
| 25 | 0.3333 | 0.0672 |
| 50 | 0.6666 | 0.1178 |
| 75 | 1 | 0.1712 |
| 100 | 1.3333 | 0.2186 |
| 125 | 1.6666 | 0.2700 |
| 150 | 2 | 0.3203 |
| 200 | 2.6666 | 0.4123 |
| 250 | 3.3333 | 0.5179 |
| 300 | 4 | 0.6054 |
| 350 | 4.6666 | 0.7060 |
| 400 | 5.3333 | 0.7974 |
| 500 | 6.6666 | 1.0216 |

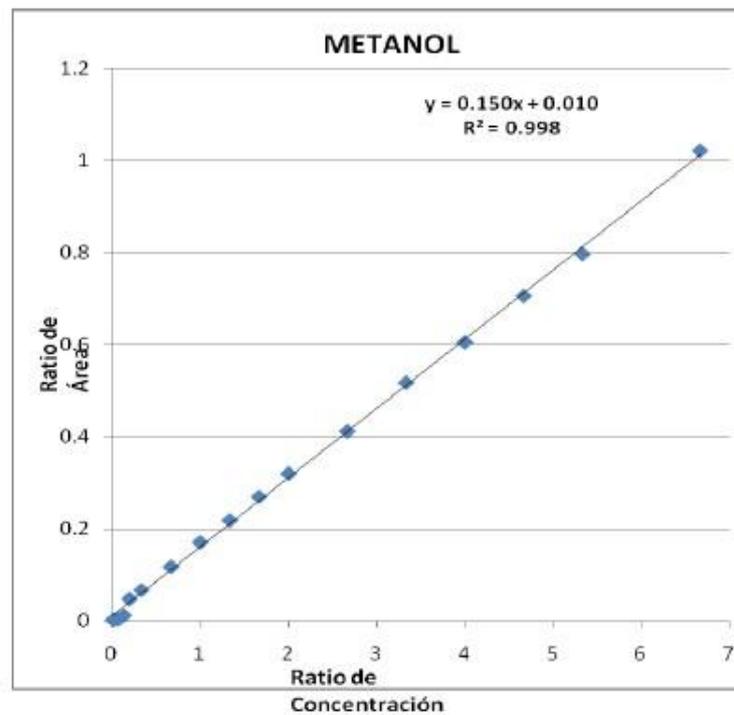


Figura 6. 15. Rango de trabajo del Metanol



✓ **ACETONA:**

- Curva De Calibración
- Límite De Detección y Límite De Cuantificación
- Rango De Trabajo

Tabla 6.44 Cálculos Acetona

| ESTÁNDAR | | RELACIÓN DE AREA (Yi) | | | |
|----------|---------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-------------|
| No | RELACIÓN CONCENTRACIÓN Xi | REPLICA 1 | REPLICA 2 | REPLICA 3 | Yi promedio |
| 1 | 0.00533 | 0.01681 | 0.01634 | 0.01629 | 0.01648 |
| 2 | 0.01333 | 0.02847 | 0.02686 | 0.02736 | 0.02756 |
| 3 | 0.02666 | 0.04620 | 0.04514 | 0.04596 | 0.04576 |
| 4 | 0.05333 | 0.08636 | 0.08495 | 0.08647 | 0.08592 |
| 5 | 0.0800 | 0.11976 | 0.11850 | 0.11962 | 0.11929 |
| 6 | 0.1333 | 0.19094 | 0.19108 | 0.19466 | 0.19222 |
| 7 | 0.26666 | 0.36427 | 0.36559 | 0.36844 | 0.3661 |
| 8 | 0.4000 | 0.53167 | 0.52448 | 0.53316 | 0.52977 |

$$Yi_{promedio} = \frac{\Sigma(Yi_{replica1} + Yi_{replica2} + Yi_{replica3})}{n}$$

Donde:

Yi promedio= promedio de las replicas de cada estándar
 Yi= Relación de área de cada estándar donde i va de 1 a 8
 n = número de replicas

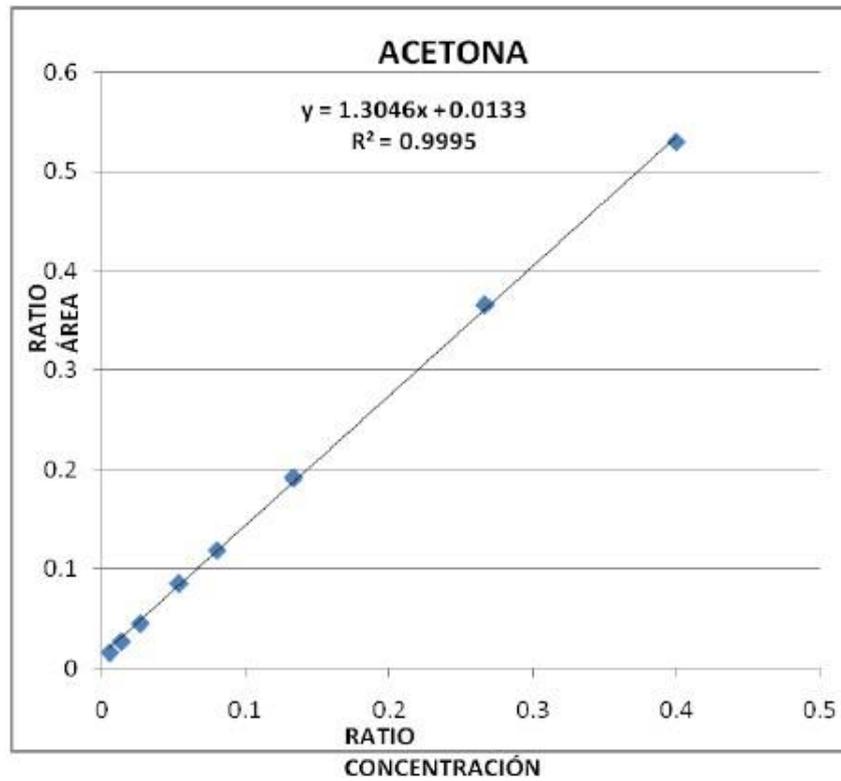


Figura 6.16. Curva de calibración acetona

De la regresión lineal de la curva de calibración $Y = mx + b$

| | |
|-----------------------------|--------------|
| Pendiente | $m = 1.3046$ |
| Ordenada al origen | $b = 0.0133$ |
| Coefficiente de correlación | $R = 0.9995$ |



Tabla 6.45 Cálculos Acetona

| No estándar | Desviación estándar Yi | Varianza Yi |
|-------------|------------------------|-------------|
| 1 | 0.000286 | 1.74077 |
| 2 | 0.0008240 | 2.9896 |
| 3 | 0.0005558 | 1.2144 |
| 4 | 0.0008476 | 0.9864 |
| 5 | 0.0006848 | 0.5740 |
| 6 | 0.002108 | 1.0968 |
| 7 | 0.002131 | 0.5821 |
| 8 | 0.004641 | 0.87612 |
| | | |
| | | |

Cálculo de la desviación estándar de

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(C_i - C_{promedio})^2}{n - 1}}$$

Cálculo de la varianza.

$$CV = \frac{Si}{Y_{Promedio}}$$

Tabla 6.46. Cálculos Acetona

| No estándar N | RELACIÓN CONCENTRACIÓN Xi | Xi ² | (Xi-Xpromedio) | (Xi-Xpromedio) ² |
|---------------|----------------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | 0.00533 | 0.0000284 | -0.1170 | 0.01368 |
| 2 | 0.01333 | 0.0001776 | -0.10900 | 0.01188 |
| 3 | 0.02666 | 0.0007107 | -0.09567 | 0.009152 |
| 4 | 0.05333 | 0.0002844 | -0.06900 | 0.004700 |
| 5 | 0.0800 | 0.00640 | -0.04233 | 0.001791 |
| 6 | 0.1333 | 0.01777 | 0.01100 | 0.000121 |
| 7 | 0.26666 | 0.071107 | 0.14433 | 0.02083 |
| 8 | 0.4000 | 0.16000 | 0.27767 | 0.07710 |
| | Xipromedio= 0.12233 | | | |
| | | | | |
| | | Σ= 0.25904 | | Σ= 0.13932 |

$$X_{i \text{ promedio}} = \frac{\sum Xi}{n}$$

Donde:

- Xi promedio= promedio de los Xi (Relación de concentración)
- Xi= Relación de concentración de cada estándar donde i va de 1 a 8
- n = número de estándares



Tabla 6.47. Cálculos Acetona

| No estándar | RELACIÓN ÁREA Yi promedio | Yi absoluta | (Yi promedio – Yi absoluta) ² |
|-------------|---------------------------|-------------|--|
| 1 | 0.01648 | 0.02025 | 1.4239 E-05 |
| 2 | 0.02756 | 0.03069 | 9.77803 E-06 |
| 3 | 0.04576 | 0.04808 | 5.35445 E-06 |
| 4 | 0.08592 | 0.08187 | 9.31683 E-06 |
| 5 | 0.11929 | 0.11766 | 2.6525 E-06 |
| 6 | 0.19222 | 0.18724 | 2.4843 E-05 |
| 7 | 0.3661 | 0.36118 | 2.4160 E-05 |
| 8 | 0.52977 | 0.53514 | 2.8836 E-05 |
| | | | $\Sigma = 0.00011983$ |

Con la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración:

$$Y_{i\text{absoluta}} = mX_i + b = 1.3046 X_i + 0.0133$$

Donde:

Y_{iabsoluta} = Relación de área de cada estándar calculado con la ecuación de la curva
 X_i = Relación concentración de cada estándar
 m = pendiente de la curva
 b = ordenada a la origen

Cálculo de la desviación estándar del blanco.

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\Sigma(Y_i \text{ promedio} - Y_i \text{ absoluta})^2}{n-2}}$$

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{0.000119183}{8-2}} = 0.0044568$$

o **Límite de Detección LOD de la Acetona**

Para el cálculo de límite de detección se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{x/Y}$ ($10 S_{x/Y}$)



Para el límite de detección LOD

$$Y_i = mX_i + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{LOD} = b + 3(S_{x/Y}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo Y_{LOD} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 3(S_{x/Y}) = mX_{LOD} + b$$

Despejando X_{LOD}

$$X_{LOD} = \frac{b + 3(S_{x/Y}) - b}{m}$$

$$X_{LOD} = \frac{3(0.0044568)}{1.3046} = 0.010248$$

Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de detección se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{e \text{ tan ol}}}{C_{STD \text{ interno}}}$$

Donde :

$$X_i = X_{LOD} = 0.010248$$

$$C_{STD \text{ interno}} = 75 \text{ mg/dl}$$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{e \text{ tan ol}} = (X_{LOD})(C_{STD \text{ interno}}) = (0.010248)(75) \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$$

| |
|--|
| $C_{e \text{ tan ol}} \text{ LOD} = 0.76866 \frac{\text{mg}}{\text{dl}}$ |
|--|

o **Límite de Cuantificación LOQ de la Acetona**

Para el cálculo de límite de cuantificación se considera la ecuación de la regresión lineal y la señal de la desviación estándar del blanco $S_{x/Y}$ ($10 S_{x/Y}$)

$$Y_i = mX_i + b \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

$$Y_{LOQ} = b + 10(S_{x/Y}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Sustituyendo Y_{LOQ} la ecuación 2 en Y_i de la ecuación 1

$$b + 10(S_{x/Y}) = mX_{LOQ} + b$$



Despejando X_{LOQ}

$$X_{LOQ} = \frac{b + 10(S_{X/Y}) - b10(S_{X/Y})}{1.3046}$$

$$X_{LOQ} = \frac{10(0.0044568)}{1.3046} = 0.03416$$

Cómo X_i es una relación de concentración para obtener la concentración del límite de cuantificación se despeja la concentración de etanol de la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{C_{e\ tan\ ol}}{C_{STD\ interno}}$$

Donde :
 $X_i = X_{LOQ} = 0.03416$
 $C_{STD\ interno} = 75\ mg/dl$

Despejando la concentración de etanol para el límite de detección se tiene que:

$$C_{e\ tan\ ol} = (X_{LOQ})(C_{STD\ interno}) = (0.03416)(75)$$

$$C_{e\ tan\ ol} = 2.5622\ mg/dl$$

Para confirmar los límites de detección se preparó un estándar de 4.0 mg/dl, obteniendo la desviación estándar de los resultados de 9 replicas del estándar para confirmar el límite de detección.

Tabla 6.48. Cálculos Acetona

| ÁREA | RELACIÓN CONC. | RELACIÓN AREA | C mg/dl |
|--------|----------------|---------------|---------|
| 32.358 | 0.05372 | 0.0737 | 4.02967 |
| 32.003 | 0.05257 | 0.07245 | 3.9431 |
| 30.848 | 0.05109 | 0.07077 | 3.8318 |
| 31.626 | 0.05062 | 0.07025 | 3.7969 |
| 32.459 | 0.05127 | 0.07098 | 3.8456 |
| 28.534 | 0.05132 | 0.07104 | 3.8492 |
| 32.054 | 0.05101 | 0.07069 | 3.8264 |
| 31.668 | 0.05104 | 0.07072 | 3.8281 |
| 30.555 | 0.05040 | 0.07000 | 3.7805 |
| | | Promedio | 3.8590 |



Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 0.07844 \text{ Como el LOQ es } = 10 \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.07844 = 0.7844$$

Como el LOQ sale más bajo que el obtenido de 2.56 mg/dl entonces se considera un nuevo límite de detección que es de 0.7844 mg/dl, y se preparan replicas de la concentración de 1.0

Tabla 6.49. Cálculos Acetona

| AREA ETANOL | RELACIÓN AREA | CONCENTRACIÓN |
|-------------|-----------------|---------------|
| 9.31878 | 0.0200 | 1.04829 |
| 11.45282 | 0.02549 | 1.3861 |
| 9.1140 | 0.01994 | 1.0443 |
| 7.1769 | 0.02055 | 1.0819 |
| 8.5565 | 0.01853 | 0.9571 |
| 8.7458 | 0.01834 | 0.9457 |
| 9.0848 | 0.01842 | 0.9503 |
| 8.4367 | 0.01914 | 0.9952 |
| 8.8819 | 0.01888 | 0.9791 |
| | Promedio | 1.043 |
| | | |
| | | |
| | | |

Desviación estándar de los valores de concentración:

$$\sigma = 0.1374$$

$$\text{Como el LOQ es } = 10 \sigma$$

$$\text{LOQ} = 10 \times 0.1374 = 1.374 \text{ mg/dl}$$

Como el LOQ sale prácticamente 1 mg/dl entonces se considera 1 mg/dl como verdadero límite de detección de la acetona

LOQ FINAL: 1.0 mg/dl para la Acetona

Rango de trabajo de la acetona

Para la curva de calibración después de obtener el límite de Cuantificación de 2.56 mg/dl. Se consideró el inicio del rango de trabajo de 3 mg/dl y se preparó la curva de calibración hasta una concentración de 1000 mg/dl de etanol, comprobando que aún sigue con la linealidad la curva de calibración, dejando hasta ahí como rango de trabajo.



Tabla 3.50. Cálculos Acetona

| C mg/dl | RELACIÓN CONCENTRACIÓN | RELACIÓN ÁREA |
|---------|------------------------|---------------|
| 3 | 0.0533 | 0.0400 |
| 4 | 0.0582 | 0.0669 |
| 6 | 0.08 | 0.1042 |
| 10 | 0.1333 | 0.1648 |
| 20 | 0.2666 | 0.3214 |
| 30 | 0.4 | 0.4803 |
| 40 | 0.5333 | 0.6197 |
| 50 | 0.6666 | 0.7809 |
| 60 | 0.8 | 0.9179 |
| 80 | 1.0666 | 1.2172 |
| 100 | 1.3333 | 1.5271 |
| 120 | 1.6 | 1.8177 |
| 140 | 1.8666 | 2.1073 |
| 160 | 2.1333 | 2.4330 |
| 200 | 2.6666 | 3.0275 |

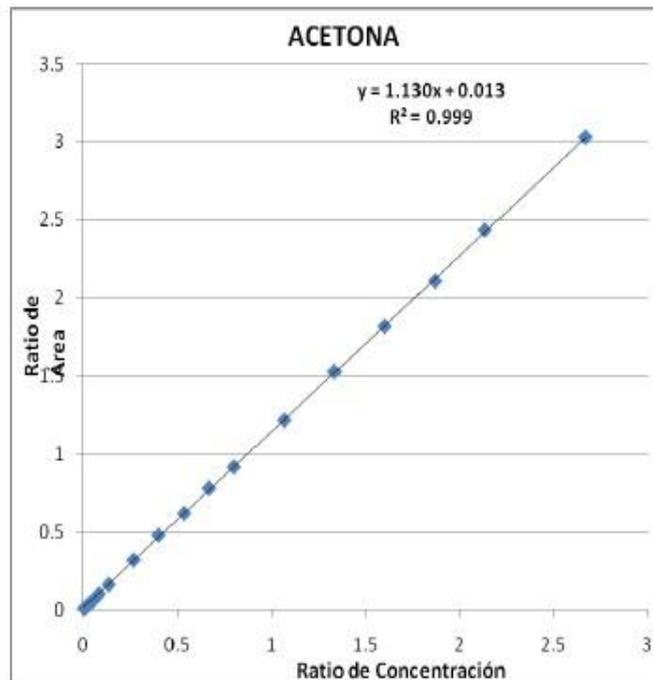
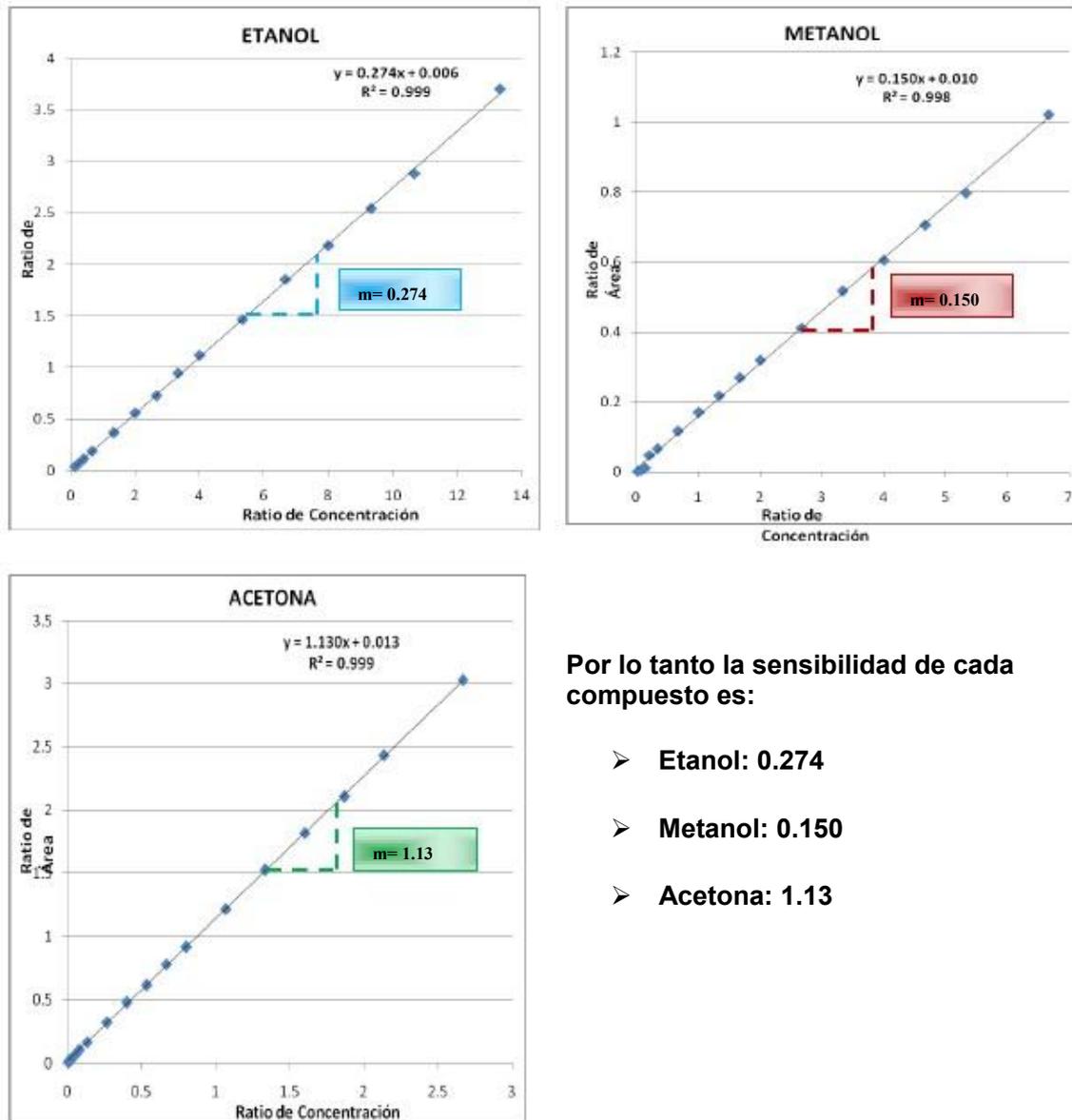


Figura 6.17 Curva de calibración de la acetona.



SENSIBILIDAD



Por lo tanto la sensibilidad de cada compuesto es:

- Etanol: 0.274
- Metanol: 0.150
- Acetona: 1.13

Figura 6.18 Sensibilidad curvas de calibración.



ANÁLISIS DE ROBUSTEZ

✓ Tipos de matriz:

TABLA 6.51. Curvas de calibración en matriz de Sangre.

| MATRIZ DE SANGRE | | | | | |
|------------------|------------|---------------------|--------|-------------------|------------------|
| | CONC mg/dL | Isobutanol 75 mg/dL | Área | Relación de Conc. | Relación de Area |
| METANOL | 15 | 499.06 | 24.010 | 0.200 | 0.04811 |
| | 25 | 493.73 | 33.227 | 0.333 | 0.06729 |
| | 50 | 486.23 | 57.281 | 0.666 | 0.1178 |
| | 75 | 483.23 | 82.769 | 1.000 | 0.1712 |
| | 100 | 485.9 | 106.24 | 1.333 | 0.2186 |
| | 125 | 486.56 | 131.41 | 1.666 | 0.2700 |
| | 150 | 486.77 | 155.93 | 2.000 | 0.3203 |
| ETANOL | 30 | 499.06 | 56.424 | 0.400 | 0.1131 |
| | 50 | 493.73 | 93.208 | 0.666 | 0.1888 |
| | 100 | 486.23 | 178.85 | 1.333 | 0.3678 |
| | 150 | 483.23 | 270.86 | 2.000 | 0.5605 |
| | 200 | 485.9 | 353.79 | 2.666 | 0.7281 |
| | 250 | 486.56 | 460.85 | 3.333 | 0.9472 |
| | 300 | 486.77 | 545.27 | 4.00 | 1.1202 |
| ACETONA | 6 | 499.06 | 52.049 | 0.0800 | 0.1042 |
| | 10 | 493.73 | 81.375 | 0.1333 | 0.1648 |
| | 20 | 486.23 | 156.32 | 0.2666 | 0.3214 |
| | 30 | 483.23 | 232.1 | 0.4000 | 0.4803 |
| | 40 | 485.9 | 301.14 | 0.5333 | 0.6197 |
| | 50 | 486.56 | 379.99 | 0.6666 | 0.7809 |
| | 60 | 486.77 | 446.84 | 0.8000 | 0.9179 |



TABLA 6.52. Curvas de calibración en matriz de Orina.

| MATRIZ DE ORINA | | | | | |
|-----------------|------------|---------------------|--------|-------------------|------------------|
| | CONC mg/dL | Isobutanol 75 mg/dL | Área | Relación de Conc. | Relación de Area |
| METANOL | 15 | 509.38 | 20.942 | 0.200 | 0.0411 |
| | 25 | 519.32 | 30.603 | 0.333 | 0.0589 |
| | 50 | 499.62 | 52.300 | 0.666 | 0.1046 |
| | 75 | 511.08 | 77.386 | 1.000 | 0.1514 |
| | 100 | 509.99 | 99.806 | 1.333 | 0.1957 |
| | 125 | 516.54 | 125.62 | 1.666 | 0.2431 |
| | 150 | 503.27 | 143.79 | 2.000 | 0.2857 |
| ETANOL | 30 | 509.38 | 60.284 | 0.400 | 0.1183 |
| | 50 | 519.32 | 92.868 | 0.666 | 0.1788 |
| | 100 | 499.62 | 182.78 | 1.333 | 0.3658 |
| | 150 | 511.08 | 275.34 | 2.000 | 0.5387 |
| | 200 | 509.99 | 360.70 | 2.666 | 0.7072 |
| | 250 | 516.54 | 457.30 | 3.333 | 0.8853 |
| | 300 | 503.27 | 530.12 | 4.00 | 1.0533 |
| ACETONA | 6 | 509.38 | 51.523 | 0.0800 | 0.1011 |
| | 10 | 519.32 | 84.040 | 0.1333 | 0.1618 |
| | 20 | 499.62 | 156.33 | 0.2666 | 0.3128 |
| | 30 | 511.08 | 241.47 | 0.4000 | 0.4724 |
| | 40 | 509.99 | 312.36 | 0.5333 | 0.6124 |
| | 50 | 516.54 | 399.77 | 0.6666 | 0.7739 |
| | 60 | 503.27 | 452.90 | 0.8000 | 0.8999 |



TABLA 6.53 Curvas de calibración en matriz de Agua.

| MATRIZ DE AGUA | | | | | |
|----------------|------------|---------------------|--------|-------------------|------------------|
| | CONC mg/dL | Isobutanol 75 mg/dL | Área | Relación de Conc. | Relación de Area |
| METANOL | 15 | 511.63 | 16.634 | 0.200 | 0.03251 |
| | 25 | 522.00 | 26.982 | 0.333 | 0.05168 |
| | 50 | 504.20 | 52.919 | 0.666 | 0.1049 |
| | 75 | 530.91 | 79.326 | 1.000 | 0.1494 |
| | 100 | 501.10 | 99.744 | 1.333 | 0.1990 |
| | 125 | 512.40 | 125.61 | 1.666 | 0.2451 |
| | 150 | 506.33 | 148.37 | 2.000 | 0.2930 |
| ETANOL | 30 | 511.63 | 55.345 | 0.400 | 0.1081 |
| | 50 | 522.00 | 90.638 | 0.666 | 0.1736 |
| | 100 | 504.20 | 177.38 | 1.333 | 0.3518 |
| | 150 | 530.91 | 285.35 | 2.000 | 0.5374 |
| | 200 | 501.10 | 349.21 | 2.666 | 0.6968 |
| | 250 | 512.40 | 448.99 | 3.333 | 0.8762 |
| | 300 | 506.33 | 539.76 | 4.00 | 1.0660 |
| ACETONA | 6 | 511.63 | 51.285 | 0.0800 | 0.1004 |
| | 10 | 522.00 | 83.691 | 0.1333 | 0.1603 |
| | 20 | 504.20 | 153.92 | 0.2666 | 0.3052 |
| | 30 | 530.91 | 254.07 | 0.4000 | 0.4785 |
| | 40 | 501.10 | 310.22 | 0.5333 | 0.6190 |
| | 50 | 512.40 | 397.2 | 0.6666 | 0.7751 |
| | 60 | 506.33 | 456.34 | 0.8000 | 0.9012 |

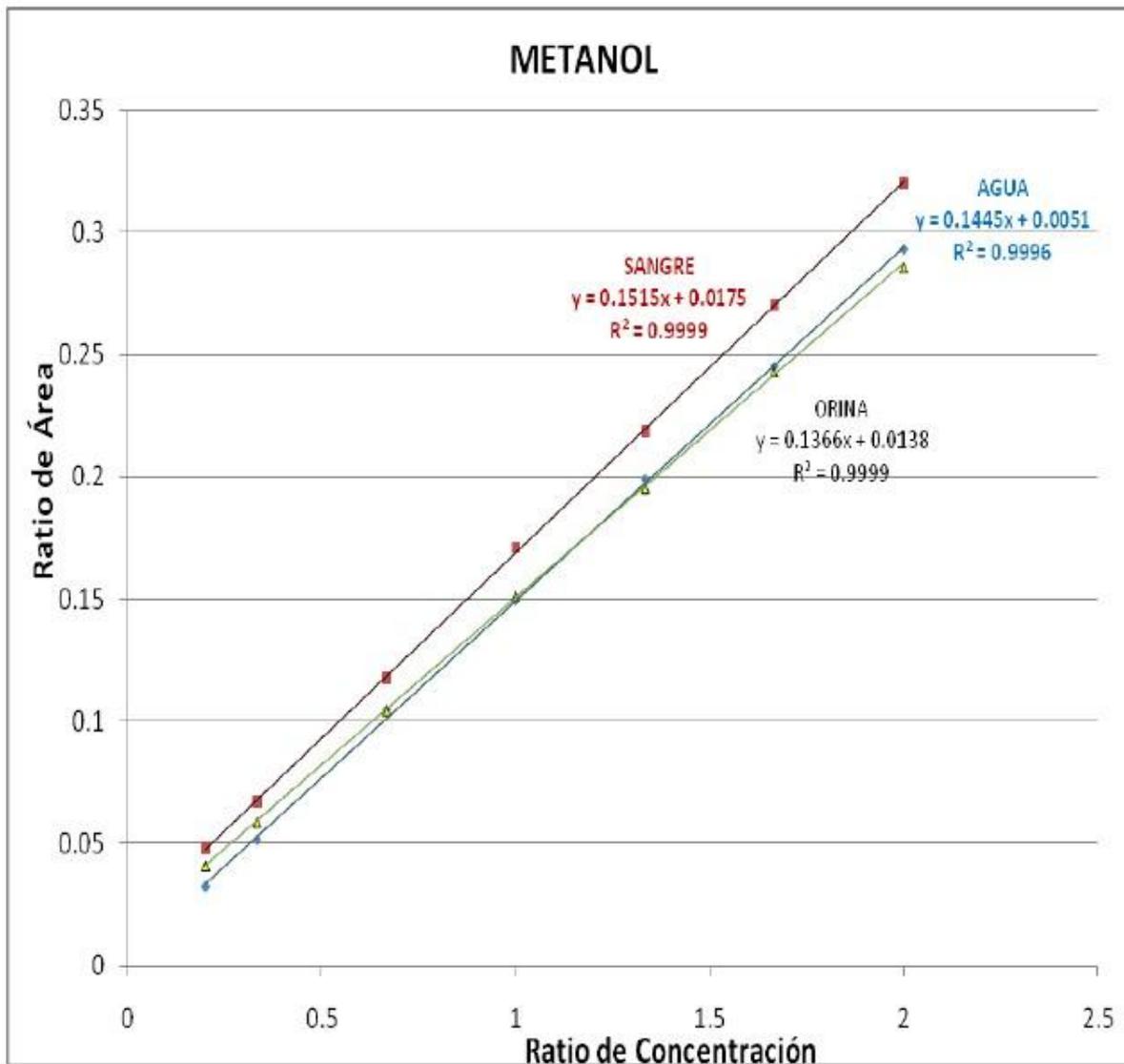


Figura 6.19. Curva de calibración metanol en matrices diferentes

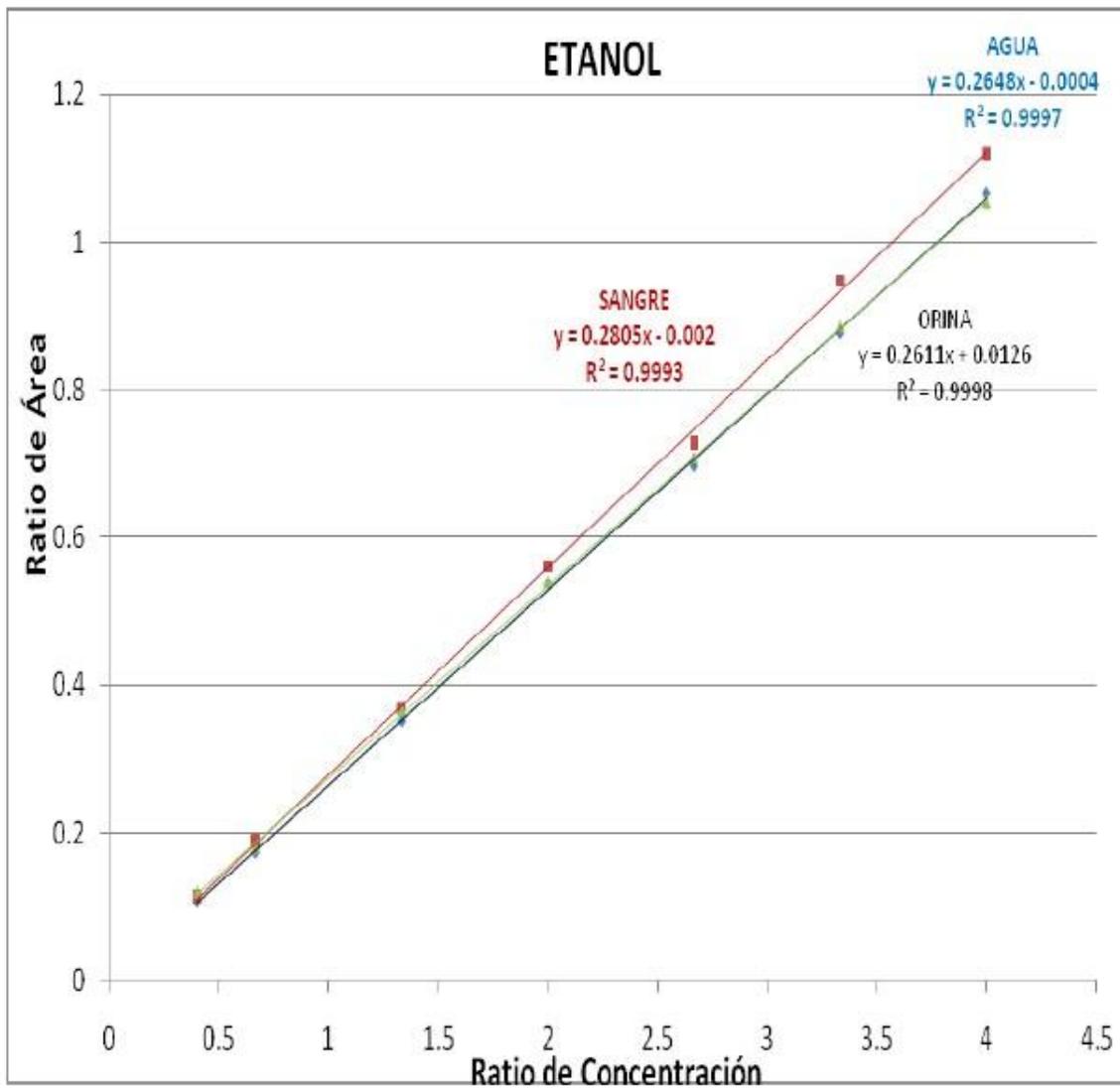


Figura 6.20. Curva de calibración etanol en matrices diferentes

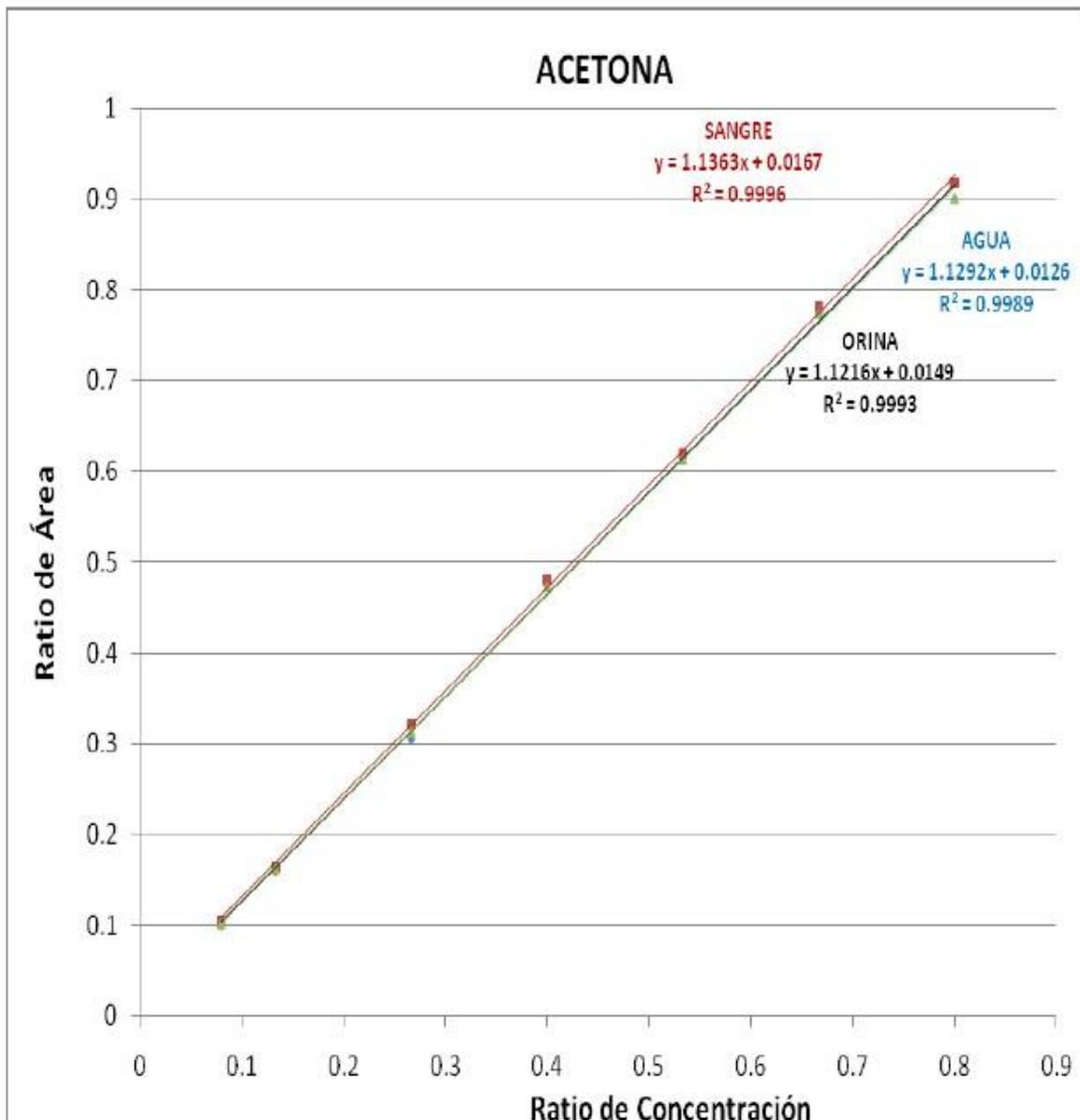


Figura 6.21. Curva de calibración acetona en matrices diferentes



✓ **Tiempo de presurización:**

Se varió el tiempo de presurización de vial en headspace.

Tabla 6.54. Tiempo de Presurización del vial

| Tiempo min. | No Réplica | Isobutanol 75 mg/dL | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|----------------------------|------------|---------------------|---------|--------|--------|-------|---------|-------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| 0.1 | 1 | 460.777 | 52.96 | 41.00 | 174.24 | 75.65 | 196.16 | 25.88 |
| | 2 | 463.59723 | 52.83 | 40.61 | 175.32 | 75.66 | 198.11 | 25.99 |
| 0.3 | 1 | 460.9869 | 54.44 | 42.27 | 198.19 | 78.48 | 182.73 | 23.95 |
| | 2 | 463.35217 | 52.10 | 40.00 | 199.14 | 78.45 | 184.26 | 24.03 |
| 0.5 | 1 | 450.4889 | 48.28 | 37.88 | 177.44 | 79.25 | 181.43 | 24.37 |
| | 2 | 450.13916 | 47.05 | 36.81 | 174.19 | 77.67 | 179.81 | 24.15 |
| 1.0 | 1 | 447.89175 | 50.67 | 40.27 | 174.69 | 78.36 | 177.53 | 23.95 |
| | 2 | 431.50616 | 50.67 | 40.26 | 169.67 | 79.09 | 172.83 | 24.22 |
| Promedio | | | | 39.85 | | 80.07 | | 24.57 |
| Desviación estándar | | | | 1.7364 | | 1.423 | | 0.855 |



Figura 6.22. Presurización Metanol



ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA METANOL

 SourceSum of Squares DfMean Square F-RatioP-Value

Between groups18.009736.003257.450.0410

Within groups3.22540.80625

Total (Corr.)21.23477

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de prezurización es un parámetro que afecta el método para el metanol

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE METANOL

 Method: 95.0 percent LSD

Count MeanHomogeneous Groups

Tiempo 3237.345X

Tiempo 4240.265X

Tiempo 1240.805X

Tiempo 2241.135X

ContrastDifference+/- Limits

Tiempo 1 - Tiempo 2-0.332.49302

Tiempo 1 - Tiempo 3*3.462.49302

Tiempo 1 - Tiempo 40.542.49302

Tiempo 2 - Tiempo 3*3.792.49302

Tiempo 2 - Tiempo 40.872.49302

Tiempo 3 - Tiempo 4*-2.922.49302

* denotes a statistically significant difference.



Figura 6.23. Presurización Etanol

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ETANOL

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 12.663434 221 1511.140 0206

Within groups 1.5151540 378 788

Total (Corr.) 14.17867

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de presurización es un parámetro que afecta el método para el etanol



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ETANOL

Method: 95.0 percent LSD
Count MeanHomogeneous Groups

Tiempo 1275.655X
Tiempo 3278.46X
Tiempo 2278.465X
Tiempo 4278.725X

ContrastDifference+/- Limits

Tiempo 1 - Tiempo 2*-2.811.70879
Tiempo 1 - Tiempo 3*-2.8051.70879
Tiempo 1 - Tiempo 4*-3.071.70879
Tiempo 2 - Tiempo 30.0051.70879
Tiempo 2 - Tiempo 4-0.261.70879
Tiempo 3 - Tiempo 4-0.2651.70879

* denotes a statistically significant difference.



Figura 6.24. Presurización Acetona.



ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ACETONA

 Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 5.0618531.6872896.550.0003

Within groups 0.069940.017475

Total (Corr.) 5.131757

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de prezurización es un parámetro que afecta el método para la acetona.

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ACETONA

 Method: 95.0 percent LSD

Count Mean Homogeneous Groups

Tiempo 2 223.99X

Tiempo 4 224.085X

Tiempo 3 224.26X

Tiempo 1 225.935X

Contrast Difference +/- Limits

Tiempo 1 - Tiempo 2 * 1.9450.367028

Tiempo 1 - Tiempo 3 * 1.6750.367028

Tiempo 1 - Tiempo 4 * 1.850.367028

Tiempo 2 - Tiempo 3 - 0.270.367028

Tiempo 2 - Tiempo 4 - 0.0950.367028

Tiempo 3 - Tiempo 4 0.1750.367028

* denotes a statistically significant difference.



✓ Temperatura de calentamiento del vial: 40, 60, 70 y 90 °C

Tabla 6.55. Temperatura de Calentamiento del vial

| TEMP. °C | No Réplica | Isobutanol 75 mg/DI | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|-------------|---------------|------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| 40°C | 1 | 110.36753 | 11.1978 | 35.581 | 40.283 | 72.646 | 53.693 | 29.885 |
| | 2 | 88.31628 | 9.80926 | 39.444 | 32.887 | 74.332 | 44.491 | 31.023 |
| | 3 | 81.28142 | 8.7663 | 38.150 | 29.761 | 72.910 | 40.653 | 30.785 |
| | 4 | 79.04202 | 8.1089 | 36.035 | 29.382 | 74.186 | 40.101 | 31.258 |
| | 5 | 111.74454 | 12.9015 | 41.208 | 42.174 | 75.484 | 55.684 | 30.664 |
| | 6 | 79.77711 | 8.5419 | 37.838 | 29.860 | 74.771 | 40.254 | 31.077 |
| 60°C | 1 | 430.637 | 46.9276 | 38.601 | 162.699 | 75.574 | 154.621 | 21.492 |
| | 2 | 284.292 | 30.6156 | 38.086 | 106.421 | 74.780 | 102.110 | 21.500 |
| | 3 | 308.239 | 33.593 | 38.606 | 115.987 | 75.226 | 111.768 | 21.726 |
| 70°C | 1 | 422.215 | 47.979 | 40.477 | 158.745 | 75.156 | 135.710 | 19.014 |
| | 2 | 580.852 | 66.693 | 40.952 | 220.137 | 75.843 | 185.974 | 18.932 |
| | 3 | 526.522 | 60.170 | 40.734 | 198.723 | 75.485 | 168.406 | 18.910 |
| 90°C | 1 | 803.810 | 96.6043 | 43.108 | 339.949 | 85.881 | 217.166 | 15.638 |
| | 2 | 808.0235 | 97.438 | 43.271 | 343.307 | 86.327 | 216.590 | 15.499 |
| | 3 | 797.1314 | 96.9960 | 43.711 | 341.718 | 87.198 | 214.425 | 15.561 |
| | 4 | 795.5150 | 97.212 | 43.919 | 40.526 | 87.054 | 214.412 | 15.596 |
| | 5 | 807.87970 | 98.854 | 43.985 | 345.461 | 86.953 | 217.419 | 15.569 |
| | 6 | 812.0629 | 98.887 | 43.747 | 347.214 | 86.943 | 218.622 | 15.576 |
| Promedio | | | | 40.414 | | 78.708 | | 22.205 |
| σ | | | | 2.772 | | 5.898 | | 6.595 |

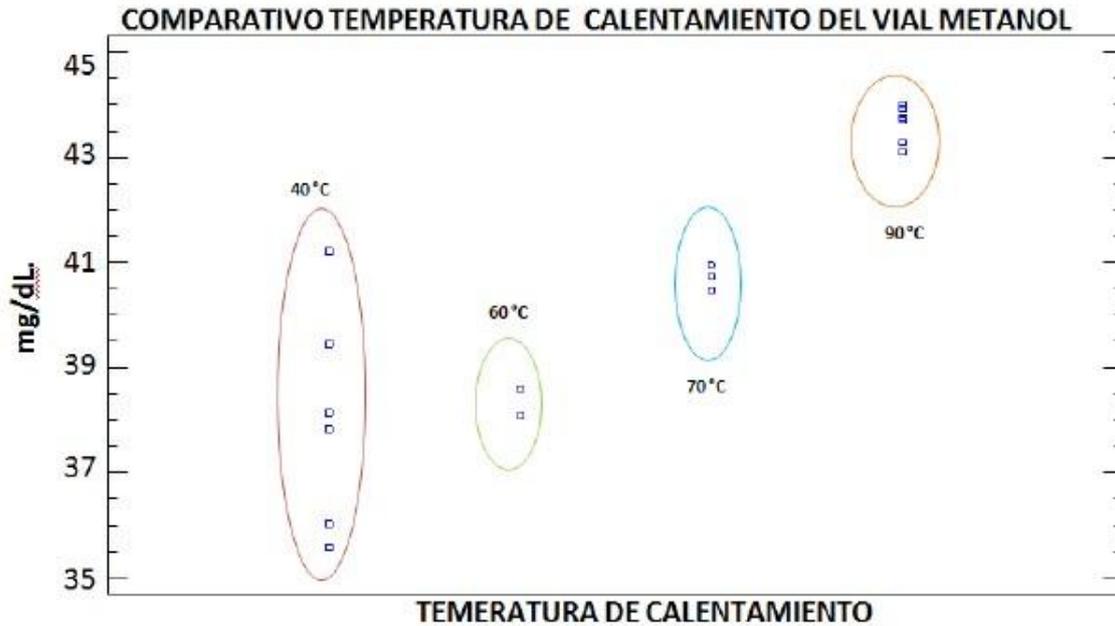


Figura 6.25 Calentamiento del vial Metanol

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA METANOL

SourceSum of Squares Df Mean Square F-RatioP-Value

Between groups107.624335.874821.790.0000
Within groups23.0495141.6464

Total (Corr.)130.674 17

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del temperatura de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la metanol.



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE METANOL

Method: 95.0 percent LSD
Count MeanHomogeneous Groups

TEMP1638.0427X
TEMP2338.431X
TEMP3340.721X
TEMP4643.6235X

ContrastDifference+/- Limits

TEMP1 - TEMP2-0.3883331.94597
TEMP1 - TEMP3*-2.678331.94597
TEMP1 - TEMP4*-5.580831.58888
TEMP2 - TEMP3*-2.292.24702
TEMP2 - TEMP4*-5.19251.94597
TEMP3 - TEMP4*-2.90251.94597

* denotes a statistically significant difference.

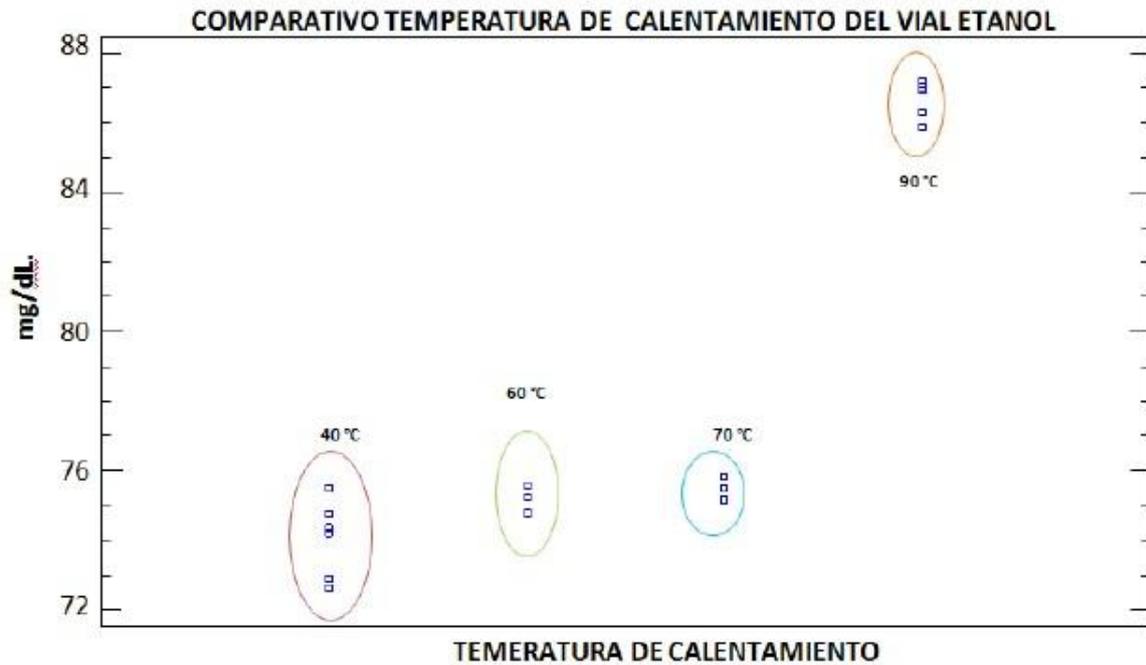


Figura 6.26. Calentamiento del vial Etanol



ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ETANOL

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|--------|----------------|----|-------------|---------|---------|
|--------|----------------|----|-------------|---------|---------|

| | | | | | |
|----------------|-------------|-----|---------|--------|--|
| Between groups | 583.6773194 | 559 | 349.210 | 0.0000 | |
|----------------|-------------|-----|---------|--------|--|

| | | | | | |
|---------------|------------|-----|-----|--|--|
| Within groups | 7.80005140 | 557 | 146 | | |
|---------------|------------|-----|-----|--|--|

| | | | | | |
|---------------|-----------|--|--|--|--|
| Total (Corr.) | 591.47717 | | | | |
|---------------|-----------|--|--|--|--|

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación de la temperatura de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la etanol.

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ETANOL

Method: 95.0 percent LSD

Count Mean Homogeneous Groups

TEMP1 674.0548X

TEMP2 375.1933X

TEMP3 375.4947X

TEMP4 686.726X

Contrast Difference +/- Limits

TEMP1 - TEMP2* -1.13851.13202

TEMP1 - TEMP3* -1.439831.13202

TEMP1 - TEMP4* -12.67120.924292

TEMP2 - TEMP3 0.3013331.30715

TEMP2 - TEMP4* -11.53271.13202

TEMP3 - TEMP4* -11.23131.13202

* denotes a statistically significant difference.

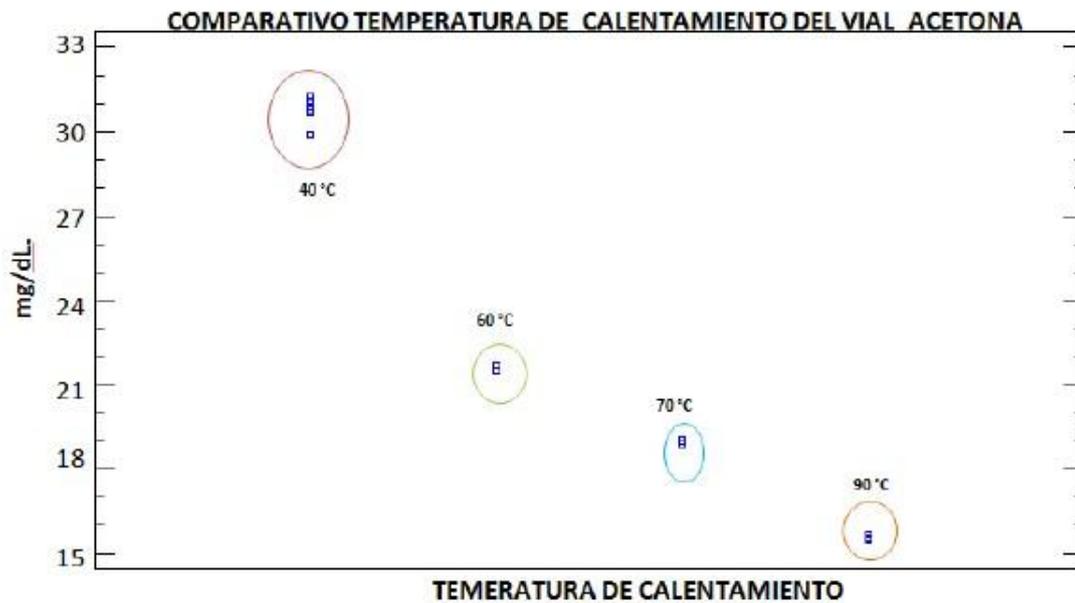


Figura 6.27. Calentamiento del Acetona.

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ACETONA

SourceSum of Squares DfMean Square F-RatioP-Value

Between groups738.2223246.0742773.940.0000

Within groups1.24193140.0887092

Total (Corr.)739.46417

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del temperatura de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la acetona.



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ACETONA

Method: 95.0 percent LSD
Count MeanHomogeneous Groups

TEMP4615.5732X
TEMP3318.952X
TEMP2321.5727X
TEMP1630.782X

ContrastDifference+/- Limits

TEMP1 - TEMP2*9.209330.451705
TEMP1 - TEMP3*11.830.451705
TEMP1 - TEMP4*15.20880.368815
TEMP2 - TEMP3*2.620670.521584
TEMP2 - TEMP4*5.99950.451705
TEMP3 - TEMP4*3.378830.451705

* denotes a statistically significant difference.

✓ **Agitación**

Tabla 6.56. Agitación del vial

| | No Réplica | Isobutanol 75 mg/dL | METANOLETANOL | | | | ACETONA | |
|-----------------------|------------|------------------------|---------------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|
| | | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área |
| Sin Agitación | 1 | 537.2501 | 54.3846 | 35.4880 | 195.1079 | 72.226 | 186.363 | 20.6911 |
| | 2 | 541.0473 | 51.047 | 32.672 | 189.133 | 69.015 | 184.5890 | 20.2852 |
| | 3 | 510.594 | 54.2809 | 37.531 | 189.287 | 73.953 | 180.4689 | 21.1234 |
| Agitación Baja | 1 | 625.11066 | 62.4088 | 34.9287 | 212.1081 | 66.777 | 234.4037 | 22.5414 |
| | 2 | 573.555 | 59.5471 | 36.5306 | 203.0581 | 70.141 | 210.222 | 21.9845 |
| | 3 | 598.9191 | 61.2159 | 35.883 | 206.0600 | 67.860 | 228.499 | 22.9721 |
| Agitación Alta | 1 | 653.87860 | 66.8865 | 35.915 | 222.061 | 66.844 | 232.3125 | 21.244 |
| | 2 | 600.7642 | 64.6055 | 38.025 | 213.6684 | 70.512 | 220.7642 | 22.001 |
| | 3 | 665.04187 | 67.7885 | 35.7708 | 222.6411 | 65.741 | 234.921 | 21.109 |
| Promedio | | | | 35.860 | | 69.229 | | 21.550 |
| Desviacion std | | | | 1.5455 | | 2.7286 | | 0.8806 |

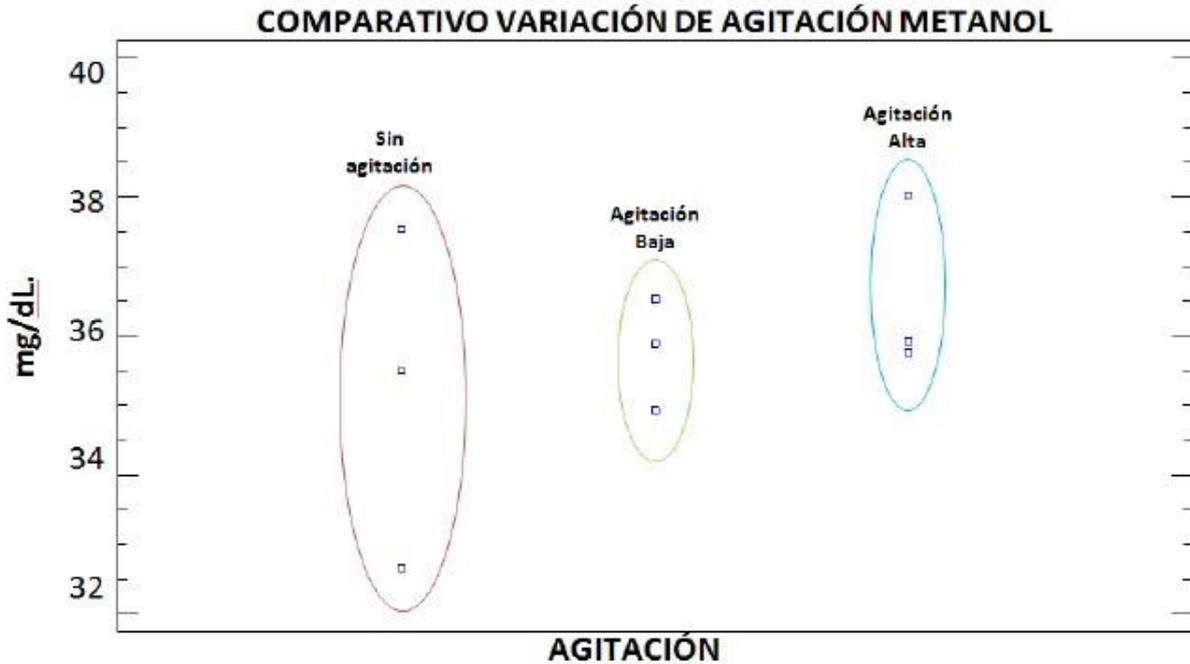


Figura 6.28. Agitación del vial Metanol

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA METANOL

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 2.7217121.360850.500.6307

Within groups 16.38862.73134

Total (Corr.) 19.10978

Como el valor de P-Value es mayor a 0.05 no hay ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación de la agitación no es un parámetro que afecte el método para el metanol



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE METANOL

Method: 95.0 percent LSD
CountMeanHomogeneous Groups

AGT1335.2303X
AGT2335.7808X
AGT3336.5703X

ContrastDifference+/- Limits

AGT1 - AGT2-0.5504333.30188
AGT1 - AGT3-1.339933.30188
AGT2 - AGT3-0.78953.30188

* denotes a statistically significant difference.

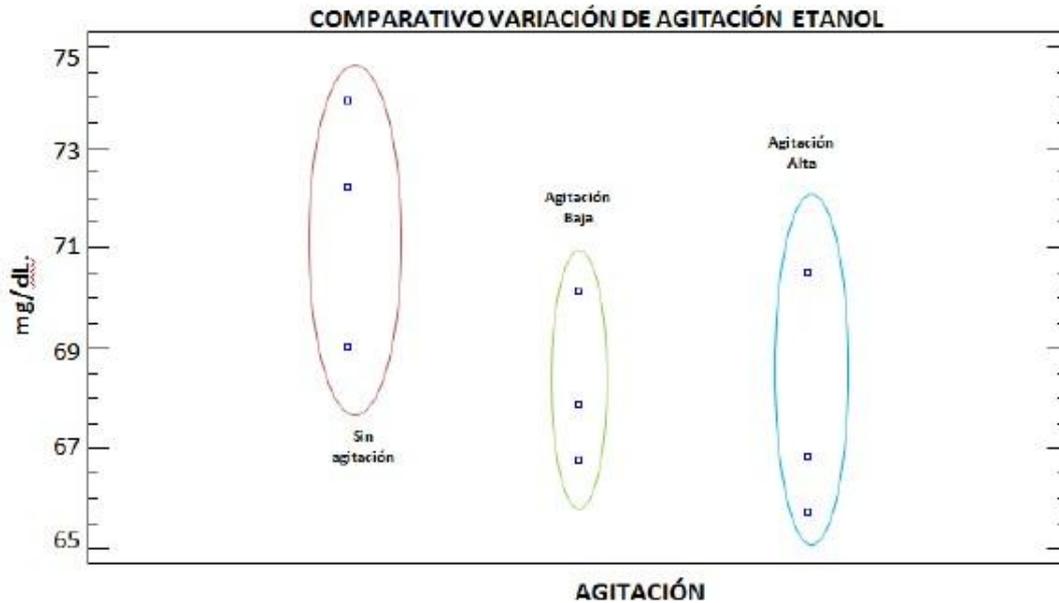


Figura 6.29 Agitación del vial Etanol



ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ETANOL

 SourceSum of Squares Df Mean Square F-RatioP-Value

Between groups28.6285214.31422.780.1401

Within groups30.934265.1557

Total (Corr.)59.56268

Como el valor de P-Value es mayor a 0.05 no hay ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación de la agitación no es un parámetro que afecte el método para el etanol

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ETANOL

 Method: 95.0 percent LSD

Count MeanHomogeneous Groups

AGT3367.699X

AGT2368.2593X

AGT1371.7313X

ContrastDifference+/- Limits

AGT1 - AGT23.4724.53646

AGT1 - AGT34.032334.53646

AGT2 - AGT30.5603334.53646

* denotes a statistically significant difference.

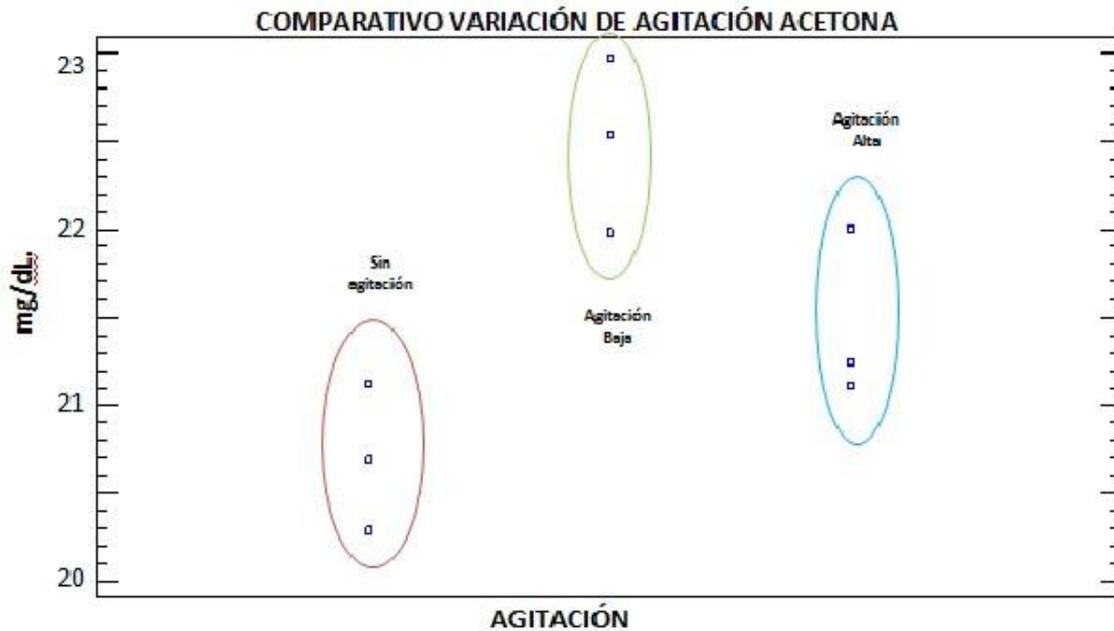


Figura 6.30 Agitación del vial Acetona

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ACETONA

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 4.9009222.4504611.270.0093

Within groups 1.3040560.217342

Total (Corr.) 6.204978

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación de la agitación es un parámetro que afecte el método para el acetona.



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ETANOL

Method: 95.0 percent LSD
Count MeanHomogeneous Groups

AGT1320.6999X
AGT3321.4513X
AGT2322.4993X

ContrastDifference+/- Limits

AGT1 - AGT2*-1.799430.931419
AGT1 - AGT3-0.7514330.931419
AGT2 - AGT3*1.0480.931419

* denotes a statistically significant difference.



✓ **Tiempo de Calentamiento: 5, 10, 15 minutos.**

Tabla 6.57. Tiempo de Calentamiento del vial

| Tiempo min. | No Réplica | Isobutanol 75 mg/dL | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|-------------|------------|------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|--------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| 5.0 | 1 | 380.00 | 44.85 | 42.24 | 140.71 | 73.85 | 139.00 | 21.98 |
| | 2 | 351.06 | 41.86 | 42.73 | 130.27 | 74.03 | 128.38 | 21.93 |
| | 3 | 269.11 | 33.06 | 44.19 | 101.45 | 75.38 | 99.51 | 22.20 |
| | 4 | 392.18 | 50.88 | 46.94 | 173.48 | 72.52 | 174.16 | 21.94 |
| 10 | 1 | 418.50 | 46.59 | 39.55 | 158.28 | 75.66 | 147.98 | 21.13 |
| | 2 | 506.95 | 55.72 | 38.97 | 187.16 | 73.60 | 176.29 | 20.74 |
| | 3 | 495.29 | 54.70 | 39.19 | 182.23 | 73.31 | 173.29 | 20.88 |
| | 4 | 384.31 | 42.72 | 39.49 | 142.04 | 73.69 | 135.79 | 21.11 |
| 15 | 1 | 220.21 | 26.22 | 42.66 | 77.96 | 70.14 | 77.88 | 21.13 |
| | 2 | 307.06 | 38.11 | 44.69 | 111.40 | 72.14 | 108.86 | 21.19 |
| | 3 | 323.35 | 41.38 | 46.24 | 116.94 | 71.88 | 114.36 | 21.13 |
| | 4 | 424.60 | 53.22 | 45.19 | 152.98 | 71.57 | 148.73 | 20.91 |
| Promedio | | | | 42.67 | | 73.14 | | 21.35 |
| σ | | | | 2.85 | | 1.58 | | 0.5061 |

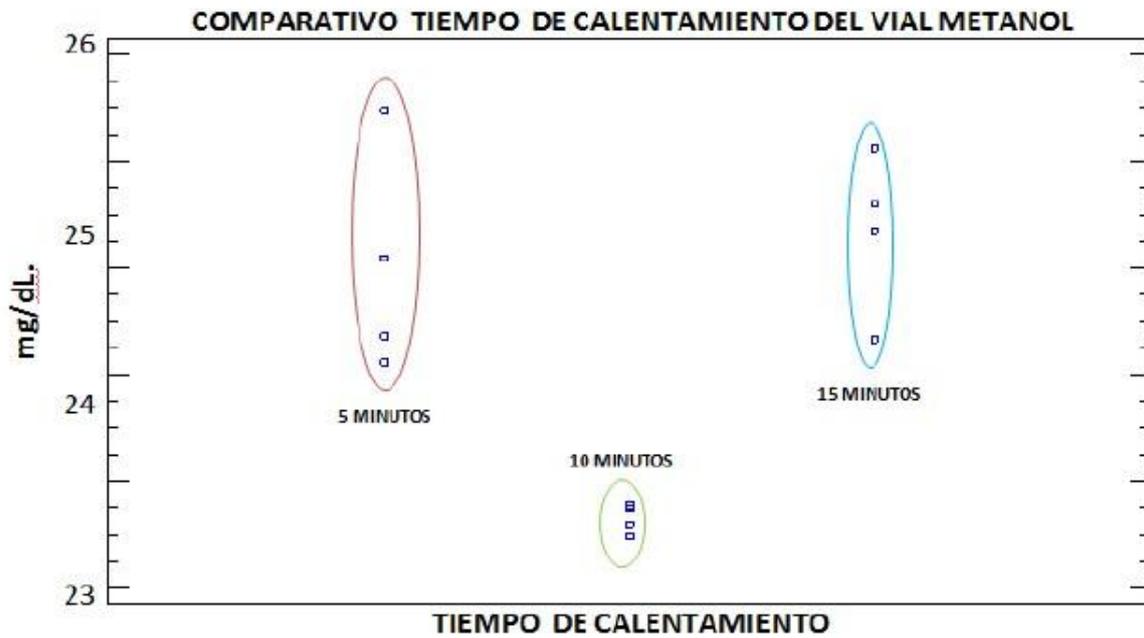


Figura 6.31 Tiempo de Calentamiento del vial Metanol

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA METANOL

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 69.1741234.58715.270.0013

Within groups 20.380692.26451

Total (Corr.) 89.554711

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la metanol



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE METANOL

Method: 95.0 percent LSD
CountMeanHomogeneous Groups

TCALE2439.3X
TCALE1444.025X
TCALE3444.695X

ContrastDifference+/- Limits

TCALE1 - TCALE2*4.7252.40711
TCALE1 - TCALE3-0.672.40711
TCALE2 - TCALE3*-5.3952.40711

* denotes a statistically significant difference.

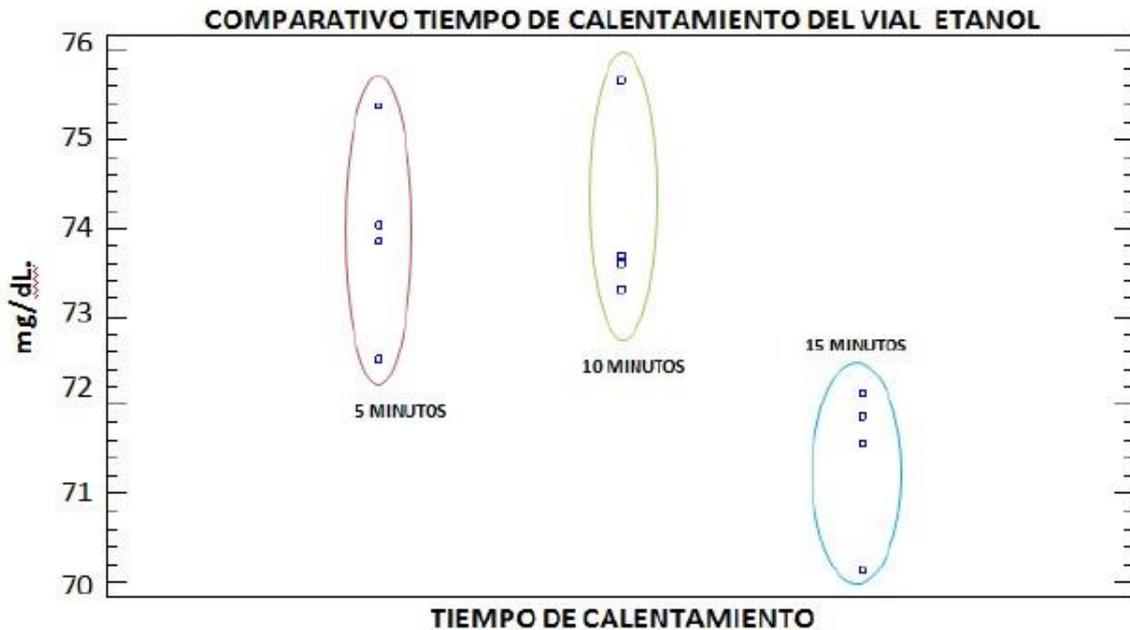


Figura 6.32 Tiempo de Calentamiento del vial Etanol



ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ETANOL

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 17.676228.838077.980.0101

Within groups 9.9672791.10747

Total (Corr.) 27.643411

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la etanol

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ETANOL

Method: 95.0 percent LSD

Count Mean Homogeneous Groups

TCALE3 471.4325X

TCALE1 473.945X

TCALE2 474.065X

Contrast Difference +/- Limits

TCALE1 - TCALE2 -0.121.68336

TCALE1 - TCALE3* 2.51251.68336

TCALE2 - TCALE3* 2.63251.68336

* denotes a statistically significant difference.



Figura 6.33 Tiempo de Calentamiento del vial Acetona

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA PARA ACETONA

Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value

Between groups 2.6185221.3092658.920.0000

Within groups 0.19997590.0222194

Total (Corr.) 2.8184911

Como el valor de P-Value es menor a 0.05 hay diferencia estadística significativa entre los grupos con valor de confianza de 95%, la variación del tiempo de calentamiento es un parámetro que afecta el método para la acetona



PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE ACETONA

Method: 95.0 percent LSD
Count MeanHomogeneous Groups

TCALE2439.3X
TCALE1444.025X
TCALE3444.695X

ContrastDifference+/- Limits

TCALE1 - TCALE2*4.7252.40711
TCALE1 - TCALE3-0.672.40711
TCALE2 - TCALE3*-5.3952.40711

* denotes a statistically significant difference.



✓ **Varias Inyecciones con la misma la Septum**

Tabla 6.58. Inyecciones en la misma Septum

| | No Inyección | Isobutanol 75 mg/dL | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|--------------|--------------|------------------------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| Std 1 | 1 | 413.558 | 65.375 | 71.647 | 261.44 | 177.22 | 238.97 | 37.672 |
| | 2 | 274.0678 | 44.6233 | 73.865 | 174.80 | 178.77 | 147.65 | 35.054 |
| | 3 | 208.21553 | 31.4105 | 68.267 | 132.48 | 178.35 | 111.72 | 34.908 |
| | 4 | 4.37337 | 1.2133 | 103.34 | 4.2999 | 223.37 | 4.1755 | 51.011 |
| | 5 | 4.35931 | 0.9570 | 100.41 | 3.809 | 243.61 | 1.883 | 27.906 |
| Std 2 | 1 | 922.586 | 179.536 | 86.925 | 705.54 | 196.47 | 499.91 | 31.727 |
| | 2 | 667.3443 | 132.233 | 88.689 | 526.53 | 202.82 | 354.34 | 31.075 |
| | 3 | 18.2122 | 3.5149 | 86.121 | 13.049 | 183.85 | 42.738 | 139.67 |
| Std 3 | 1 | 841.72144 | 140.570 | 73.159 | 551.22 | 167.71 | 397.89 | 27.591 |
| | 2 | 807.9041 | 135.731 | 73.658 | 536.33 | 170.06 | 399.33 | 28.881 |
| | 3 | 3.400 | 0.93136 | 126.47 | 2.9938 | 226.78 | 1.1073 | 18.797 |
| Std 4 | 1 | 819.1497 | 57.722 | 25.024 | 204.65 | 61.689 | 144.91 | 9.899 |
| | 2 | 637.6660 | 44.866 | 24.972 | 160.67 | 62.249 | 115.62 | 10.163 |
| | 3 | 14.761 | 4.086 | 127.93 | 10.816 | 188.107 | 23.039 | 92.667 |

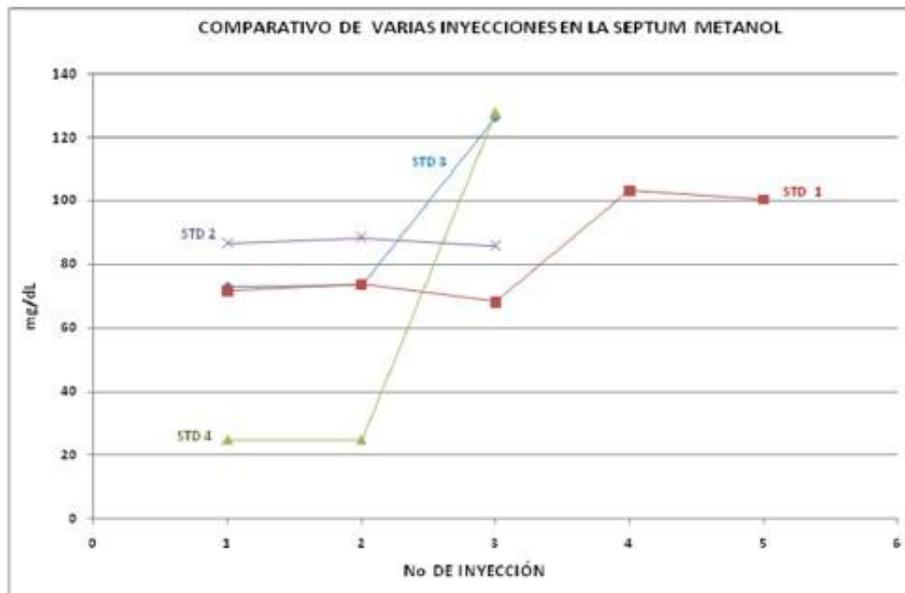


Figura 6.34. Inyecciones de septum Metanol

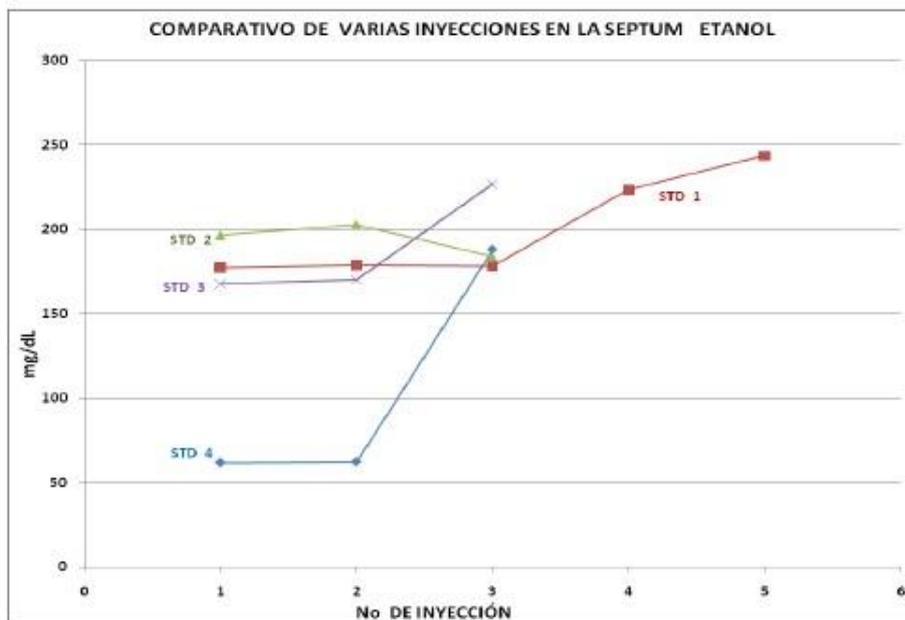


Figura 6.35. Inyecciones de septum Etanol

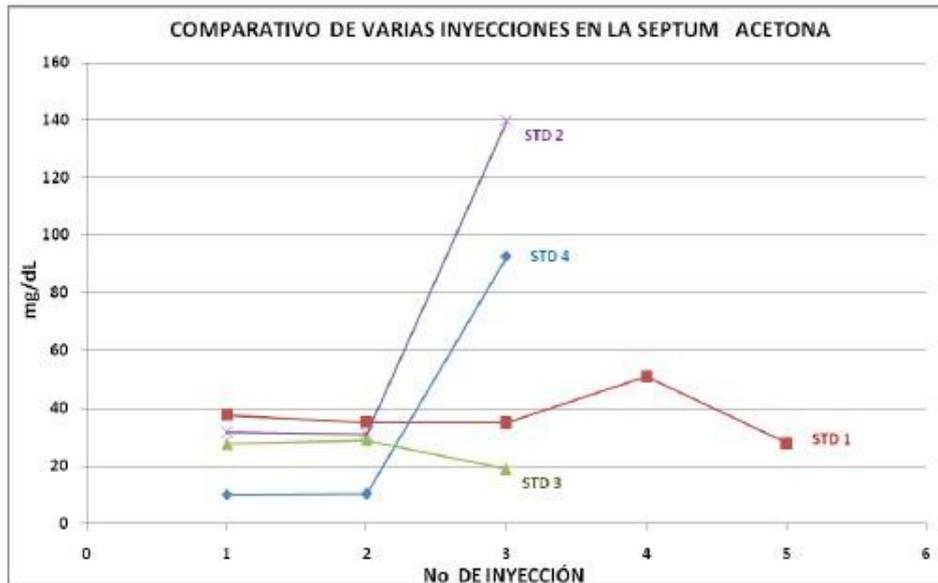


Figura 6.36. Inyecciones de septum Acetona

✓ Volumen de muestra

Tabla 6.59. Volumen de muestra

| | | Isobutanol ETANOL | | |
|---------------------|---|---------------------|-----------|-----------|
| | | No Réplica 75 mg/Dl | | |
| | | Área | Área | mg/dL |
| 0.4 - 1.6 | 1 | 675.43365 | 561.135 | 218.385 |
| | 2 | 390.01297 | 321.1592 | 216.3095 |
| | 3 | 616.09760 | 509.7435 | 217.41909 |
| 0.2 - 0.8 | 1 | 472.5334 | 394.8359 | 219.7413 |
| | 2 | 462.77689 | 368.7785 | 208.7896 |
| | 3 | 261.2984 | 212.4003 | 213.3086 |
| 0.5 - 2.0 | 1 | 462.13409 | 351.1305 | 198.27690 |
| | 2 | 519.05231 | 378.45929 | 189.58940 |
| | 3 | 496.55103 | 350.85110 | 183.1987 |
| Promedio | | | | 207.2242 |
| Desviación Estándar | | | | 13.58 |

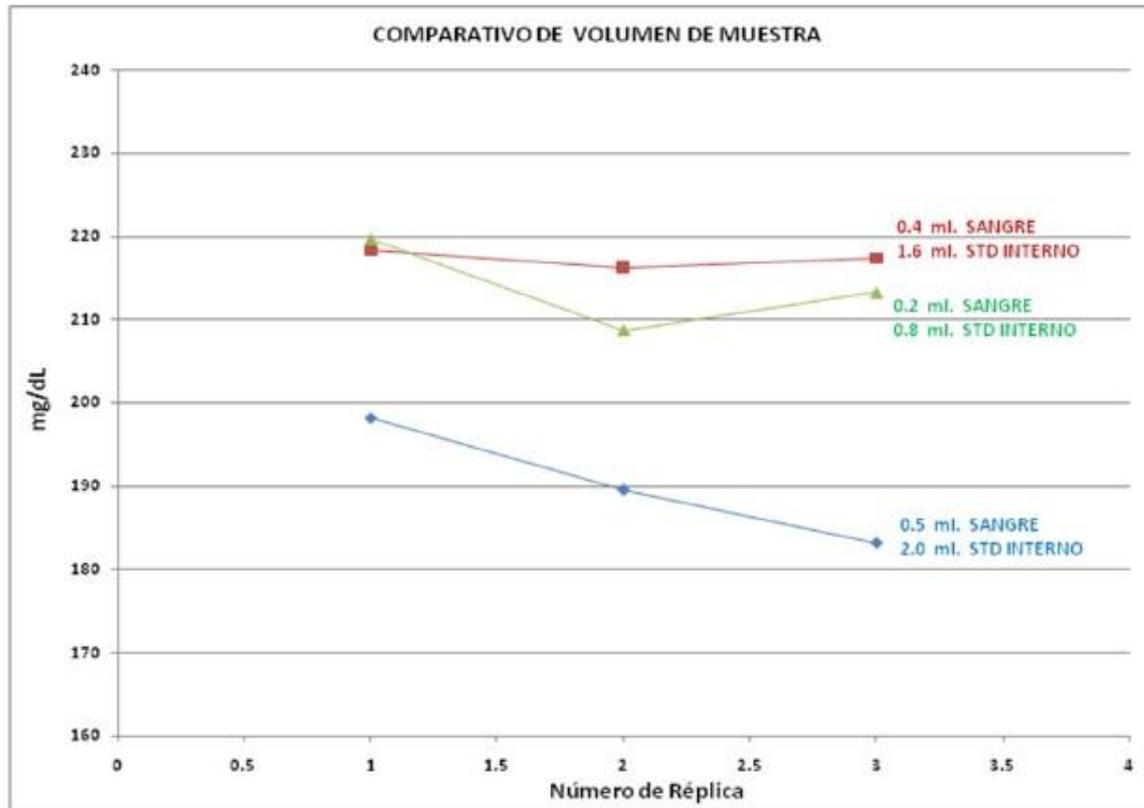


Figura 6.37 Volumen de muestra Etanol.

Se escogió la proporción de dilución de 0.4 de muestra a 1.6 de estándar interno, se elige con la finalidad de homogenizar la densidad y hacer menos densa la muestra, debido a que la sangre es muy variada y el homogenizar este factor ayuda a estandarizar la liberación de los analitos de la matriz dentro de la extracción con el headspace.



Tabla 6.60. Densidad de la sangre con y sin estándar

| | | | g/L(mtr+std) g | | | g/L |
|---------|--------|---------------|----------------|--------|------------|----------------|
| Muestra | Peso g | Volumen en ml | DENSIDA REAL | Peso | Volumen ml | DENSIDAD FINAL |
| 184 | 0.4151 | 0.4 | 1037.75 | 2.0149 | 2 | 1007.45 |
| 185 | 0.4333 | 0.4 | 1083.25 | 2.0322 | 2 | 1016.1 |
| 187 | 0.4353 | 0.4 | 1088.25 | 2.0076 | 2 | 1003.8 |
| 188 | 0.422 | 0.4 | 1055 | 2.015 | 2 | 1007.5 |
| 198 | 0.4304 | 0.4 | 1076 | 2.0157 | 2 | 1007.85 |
| 194 | 0.4177 | 0.4 | 1044.25 | 2.0083 | 2 | 1004.15 |
| 192 | 0.4361 | 0.4 | 1090.25 | 2.0268 | 2 | 1013.4 |
| 149 | 0.4407 | 0.4 | 1101.75 | 2.0172 | 2 | 1008.6 |
| 208 | 0.4285 | 0.4 | 1071.25 | 2.01 | 2 | 1005 |
| 207 | 0.4368 | 0.4 | 1092 | 2.0244 | 2 | 1012.2 |
| 195 | 0.4247 | 0.4 | 1061.75 | 2.0009 | 2 | 1000.45 |
| 206 | 0.4429 | 0.4 | 1107.25 | 2.0242 | 2 | 1012.1 |
| 242 | 0.4321 | 0.4 | 1080.25 | 2.0073 | 2 | 1003.65 |
| 234 | 0.4416 | 0.4 | 1104 | 2.034 | 2 | 1017 |
| 255 | 0.4382 | 0.4 | 1095.5 | 2.0583 | 2 | 1029.15 |
| 254 | 0.4318 | 0.4 | 1079.5 | 2.0405 | 2 | 1020.25 |
| 253 | 0.4266 | 0.4 | 1066.5 | 2.052 | 2 | 1026 |
| 252 | 0.4288 | 0.4 | 1072 | 2.0641 | 2 | 1032.05 |
| 251 | 0.4318 | 0.4 | 1079.5 | 2.0649 | 2 | 1032.45 |
| 250 | 0.4322 | 0.4 | 1080.5 | 2.056 | 2 | 1028 |
| 256 | 0.4343 | 0.4 | 1085.75 | 2.0464 | 2 | 1023.2 |
| 257 | 0.4193 | 0.4 | 1048.25 | 2.0214 | 2 | 1010.7 |
| 259 | 0.4227 | 0.4 | 1056.75 | 2.0314 | 2 | 1015.7 |
| 192 | 0.4336 | 0.4 | 1084 | 2.0435 | 2 | 1021.75 |
| 262 | 0.4423 | 0.4 | 1105.75 | 2.0399 | 2 | 1019.95 |
| 266 | 0.4367 | 0.4 | 1091.75 | 2.0535 | 2 | 1026.75 |
| 265 | 0.4207 | 0.4 | 1051.75 | 2.0322 | 2 | 1016.1 |
| 274 | 0.4285 | 0.4 | 1071.25 | 2.0447 | 2 | 1022.35 |
| 273 | 0.4348 | 0.4 | 1087 | 2.0573 | 2 | 1028.65 |
| 272 | 0.4321 | 0.4 | 1080.25 | 2.0572 | 2 | 1028.6 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

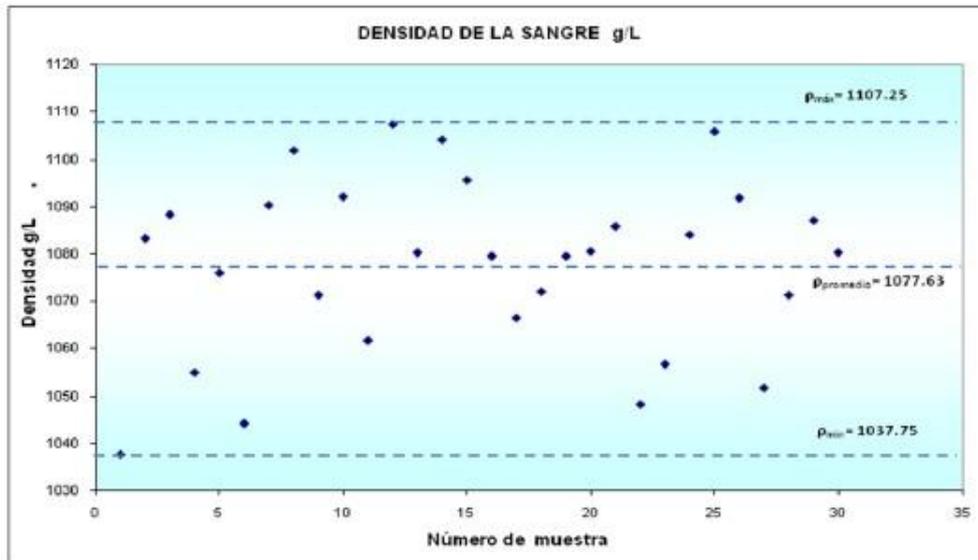


Figura 6.38. Densidad real de la sangre

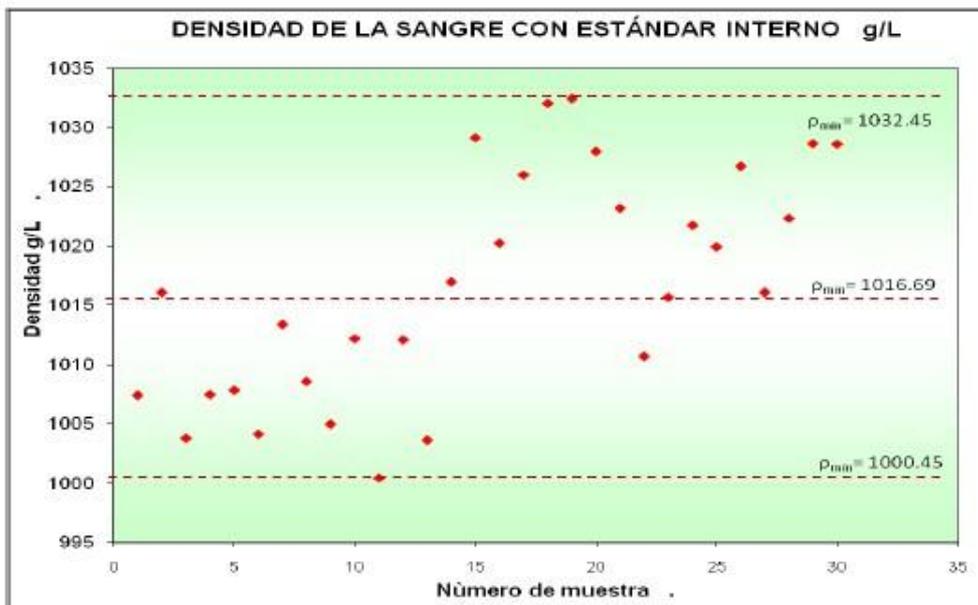


Figura 6.39. Densidad real de la sangre con el estándar interno.

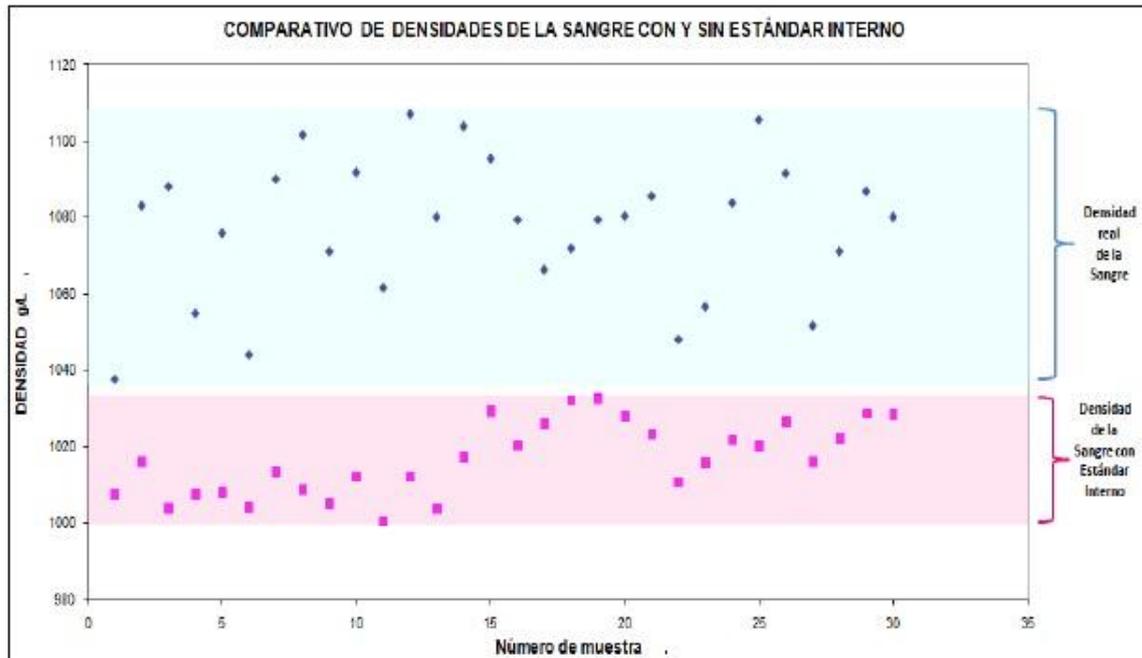


Figura 6.40. Comparación de densidades de sangre y Sangre con estándar Interno.



✓ **Degradación por almacenamiento de muestra:**

Preparar la muestra en el vial y dejar en refrigeración:

Tabla 6.61. Degradación de la muestra en refrigeración.

| | No Réplica | Isobutanol 75 mg/dL | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|-------|------------|------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| DÍA 0 | 1 | 474.93192 | 49.6217 | 46.937 | 171.030 | 81.111 | 148.572 | 20.948 |
| | 2 | 513.2987 | 52.2840 | 45.817 | 182.743 | 80.076 | 161.846 | 21.115 |
| | 3 | 485.12759 | 52.546 | 48.575 | 175.487 | 81.520 | 150.514 | 20.775 |
| DÍA 2 | 1 | 490.490 | 23.977 | 23.188 | 173.368 | 79.430 | 153.622 | 20.973 |
| | 2 | 485.417 | 27.059 | 26.119 | 178.875 | 83.229 | 149.636 | 20.641 |
| | 3 | 480.394 | 23.763 | 23.436 | 163.851 | 76.301 | 150.651 | 21.000 |
| DÍA 3 | 1 | 486.094 | 50.679 | 46.841 | 172.652 | 79.865 | 144.859 | 19.951 |
| | 2 | 470.578 | 53.126 | 50.532 | 174.382 | 83.753 | 140.662 | 20.012 |
| | 3 | 491.2196 | 49.535 | 45.382 | 167.880 | 76.474 | 144.116 | 19.640 |
| DÍA 4 | 1 | 387.717 | 43.1249 | 49.818 | 126.774 | 72.738 | 110.075 | 19.002 |
| | 2 | 435.437 | 46.433 | 47.857 | 130.830 | 66.038 | 120.227 | 18.477 |
| | 3 | 447.668 | 48.512 | 48.596 | 126.118 | 61.304 | 121.434 | 18.151 |
| DÍA 5 | 1 | 469.880 | 46.811 | 44.863 | 47.632 | 15.736 | 132.540 | 18.879 |
| | 2 | 479.839 | 46.690 | 43.872 | 54.153 | 18.638 | 135.627 | 18.918 |
| | 3 | 483.503 | 47.490 | 44.263 | 69.920 | 26.662 | 130.353 | 18.040 |
| DÍA 6 | 1 | 133.194 | 37.285 | 121.88 | 0.94423 | 0 | 123.724 | 62.393 |
| | 2 | 398.303 | 43.055 | 48.481 | 6.1183 | 0 | 137.846 | 23.185 |
| | 3 | 147.502 | 42.256 | 240.70 | 1.503 | 0 | 147.502 | 130.960 |
| DÍA 7 | 1 | 4.0603 | 42.2568 | 4447.9 | 0 | 0 | 155.069 | 2569.16 |
| | 2 | 0.9606 | 40.2198 | 17886 | 0 | 0 | 153.140 | 10724.2 |
| | 3 | 92.926 | 35.086 | 163.59 | 26.364 | 61.807 | 154.079 | 111.449 |

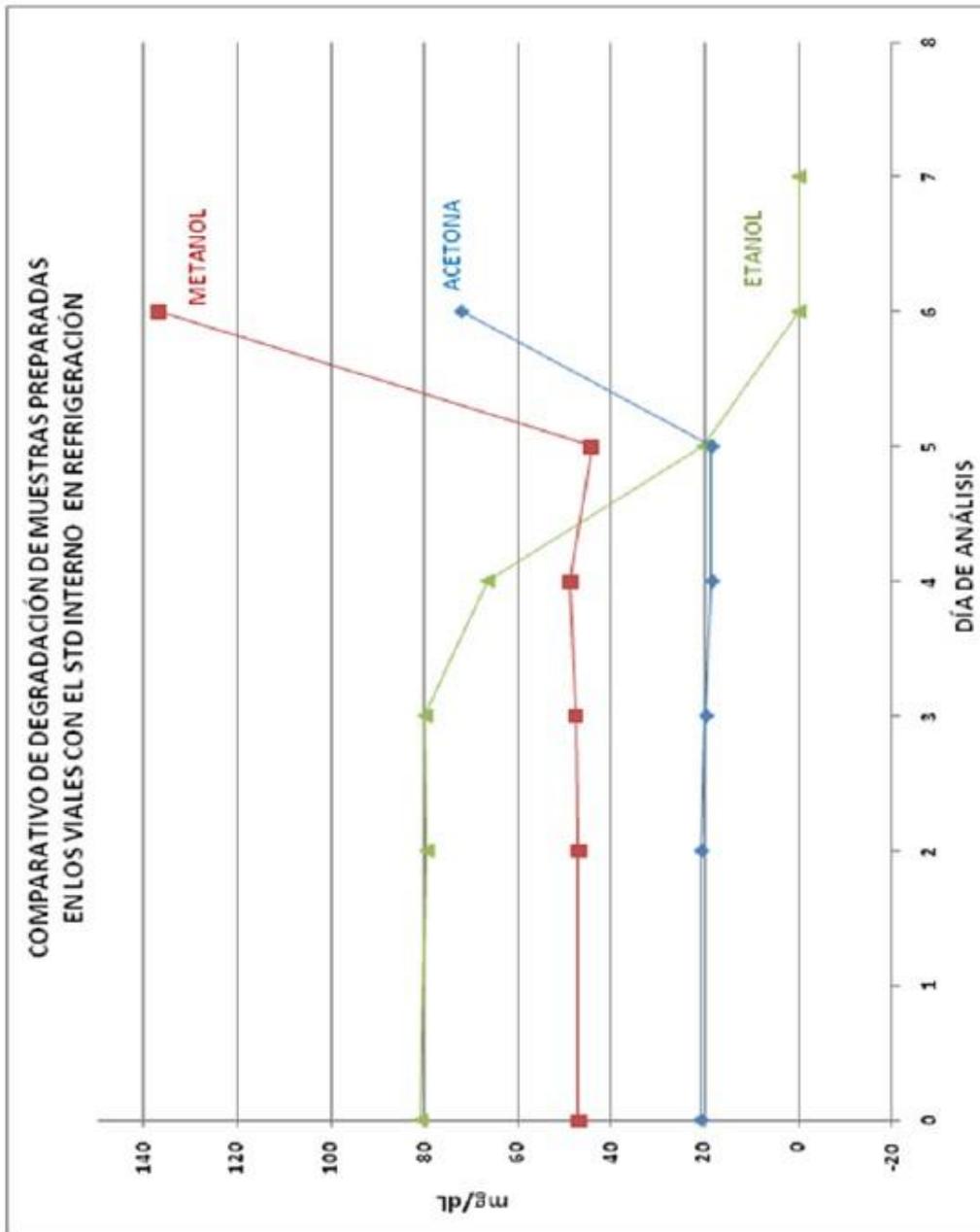


Figura 6.41. Degradación de la muestra en refrigeración.



✓ Refrigeración de un estándar para curva de calibración

Tabla 6.62. Refrigeración de un estándar

| | No Réplica | Isobutanol 75 mg/dL | METANOL | | ETANOL | | ACETONA | |
|----------|------------|------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | | Área | Área | mg/dL | Área | mg/dL | Área | mg/dL |
| DÍA 0 | 1 | 474.93192 | 49.6217 | 46.937 | 171.030 | 81.111 | 148.572 | 20.948 |
| | 2 | 513.2987 | 52.2840 | 45.817 | 182.743 | 80.076 | 161.846 | 21.115 |
| | 3 | 485.12759 | 52.546 | 48.575 | 175.487 | 81.520 | 150.514 | 20.775 |
| DÍA 2 | 1 | 490.420 | 58.620 | 53.366 | 168.295 | 76.828 | 153.799 | 21.000 |
| | 2 | 494.923 | 27.765 | 26.271 | 169.056 | 76.428 | 154.623 | 20.920 |
| | 3 | 481.475 | 61.625 | 56.981 | 170.689 | 79.696 | 151.136 | 21.020 |
| DÍA 3 | 1 | 508.322 | 59.802 | 52.561 | 175.233 | 77.224 | 155.919 | 20.538 |
| | 2 | 508.446 | 29.2619 | 26.890 | 173.734 | 76.458 | 155.672 | 20.500 |
| | 3 | 485.485 | 59.459 | 54.703 | 173.994 | 80.676 | 150.011 | 20.690 |
| DÍA 4 | 1 | 468.222 | 54.270 | 51.818 | 171.52 | 82.684 | 147.379 | 21.078 |
| | 2 | 476.797 | 175.890 | 51.865 | 175.890 | 83.331 | 149.205 | 20.955 |
| | 3 | 490.3466 | 57.364 | 52.279 | 182.543 | 84.183 | 153.412 | 20.950 |
| DÍA 5 | 1 | 489.479 | 53.716 | 49.185 | 168.156 | 76.924 | 151.003 | 20.656 |
| | 2 | 499.272 | 56.511 | 50.656 | 170.301 | 76.307 | 153.204 | 20.546 |
| | 3 | 483.301 | 54.855 | 50.790 | 172.092 | 80.091 | 149.683 | 20.738 |
| DÍA 6 | 1 | 491.276 | 62.054 | 56.263 | 189.081 | 87.368 | 147.130 | 20.050 |
| | 2 | 506.303 | 65.357 | 57.448 | 193.964 | 86.918 | 150.881 | 19.951 |
| DÍA 7 | 1 | 581.070 | 71.164 | 54.622 | 194.811 | 74.832 | 168.195 | 19.376 |
| | 2 | 495.331 | 55.518 | 50.184 | 158.318 | 70.880 | 140.049 | 18.924 |
| | 3 | 431.266 | 51.816 | 53.630 | 149.495 | 77.707 | 121.148 | 18.801 |
| Promedio | | | | 49.54 | | 79.56 | | 20.47 |
| σ | | | | 8.44 | | 4.10 | | 0.7012 |



Figura 6.42. Refrigeración Etanol

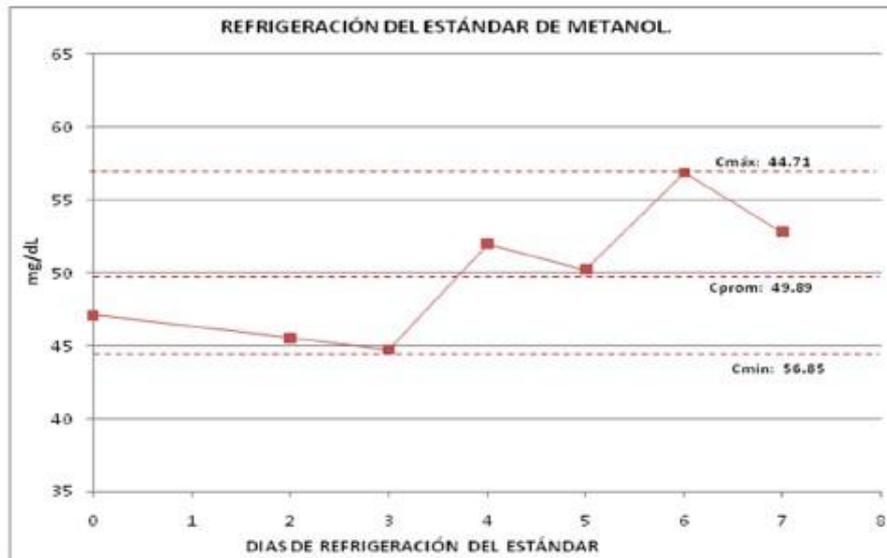


Figura 6.43. Refrigeración Metanol

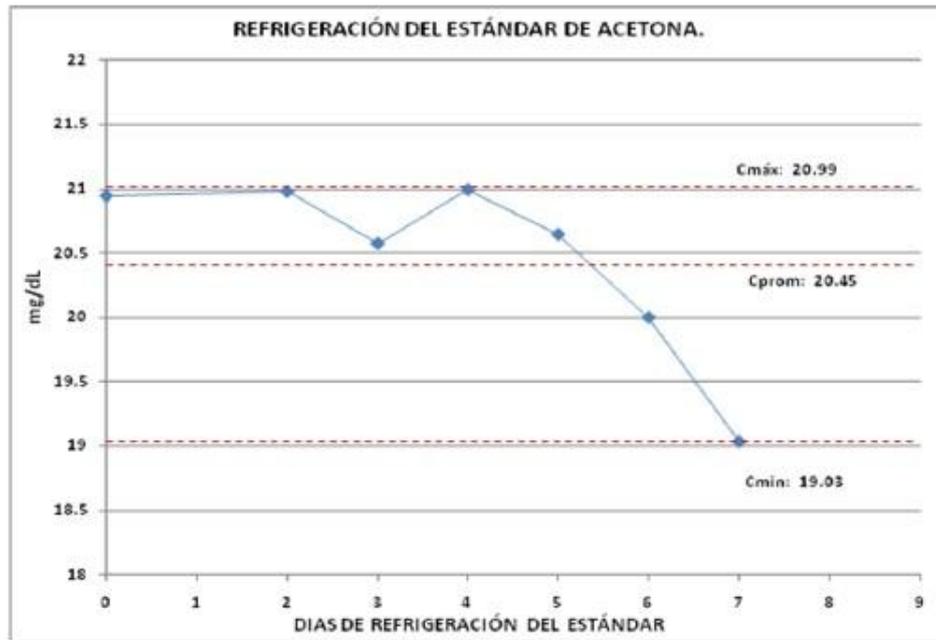


Figura 6.44 Refrigeración Acetona



- ✓ Dejar la muestra en el tubo para química sanguínea en refrigeración y preparar la muestra en el vial:

Tabla 6.63. Degradación de la muestra en refrigeración.

| DÍA | Répica | MTR 250 | | | MTR 252 | | | MTR 253 | | |
|-----|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | | STD I | Área | mg/dL | STD I | Área | mg/dL | STDI | Área | mg/dL |
| 0 | 1 | 504.376 | 465.59 | 223.36 | 558.09 | 265.99 | 110.54 | 589.24 | 344.85 | 137.99 |
| | 2 | 499.451 | 475.58 | 230.71 | 508.68 | 257.74 | 118.14 | 567.26 | 341.11 | 142.05 |
| 1 | 1 | 486.868 | 486.27 | 242.47 | 461.98 | 336.64 | 174.23 | 495.01 | 353.50 | 170.55 |
| | 2 | 461.695 | 456.89 | 240.16 | 572.55 | 415.56 | 173.50 | 477.02 | 355.72 | 178.53 |
| 2 | 1 | 471.989 | 453.36 | 232.81 | 466.00 | 369.30 | 190.35 | 491.60 | 336.77 | 163.21 |
| | 2 | 454.070 | 437.13 | 233.36 | 462.68 | 371.17 | 192.81 | 462.03 | 336.87 | 174.34 |
| 4 | 1 | 463.483 | 443.48 | 231.88 | 443.56 | 368.78 | 200.18 | 469.80 | 330.37 | 167.79 |
| | 2 | 447.980 | 482.35 | 262.17 | 441.42 | 383.46 | 209.61 | 458.79 | 325.83 | 169.56 |
| 5 | 1 | 451.355 | 430.57 | 231.15 | 441.19 | 342.96 | 186.53 | 457.14 | 331.52 | 173.35 |
| | 2 | | | | 429.77 | 376.90 | 211.70 | 464.45 | 334.30 | 171.98 |
| 6 | 1 | 458.878 | 393.89 | 207.00 | 449.92 | 368.42 | 197.01 | 465.47 | 325.56 | 166.84 |
| | 2 | 466.476 | 399.93 | 206.74 | 460.95 | 352.37 | 183.27 | 472.25 | 323.35 | 163.12 |
| 8 | 1 | 454.743 | 167.12 | 82.979 | 462.35 | 406.13 | 212.06 | 476.10 | 344.98 | 173.20 |
| | 2 | 217.859 | 243.04 | 271.98 | 449.44 | 400.81 | 215.44 | 488.62 | 350.88 | 171.56 |
| 9 | 1 | 443.85 | 456.30 | 249.87 | 448.13 | 391.81 | 211.03 | 453.63 | 314.05 | 165.04 |
| | 2 | 448.243 | 466.16 | 252.88 | 462.16 | 382.53 | 199.25 | 451.19 | 315.80 | 166.97 |

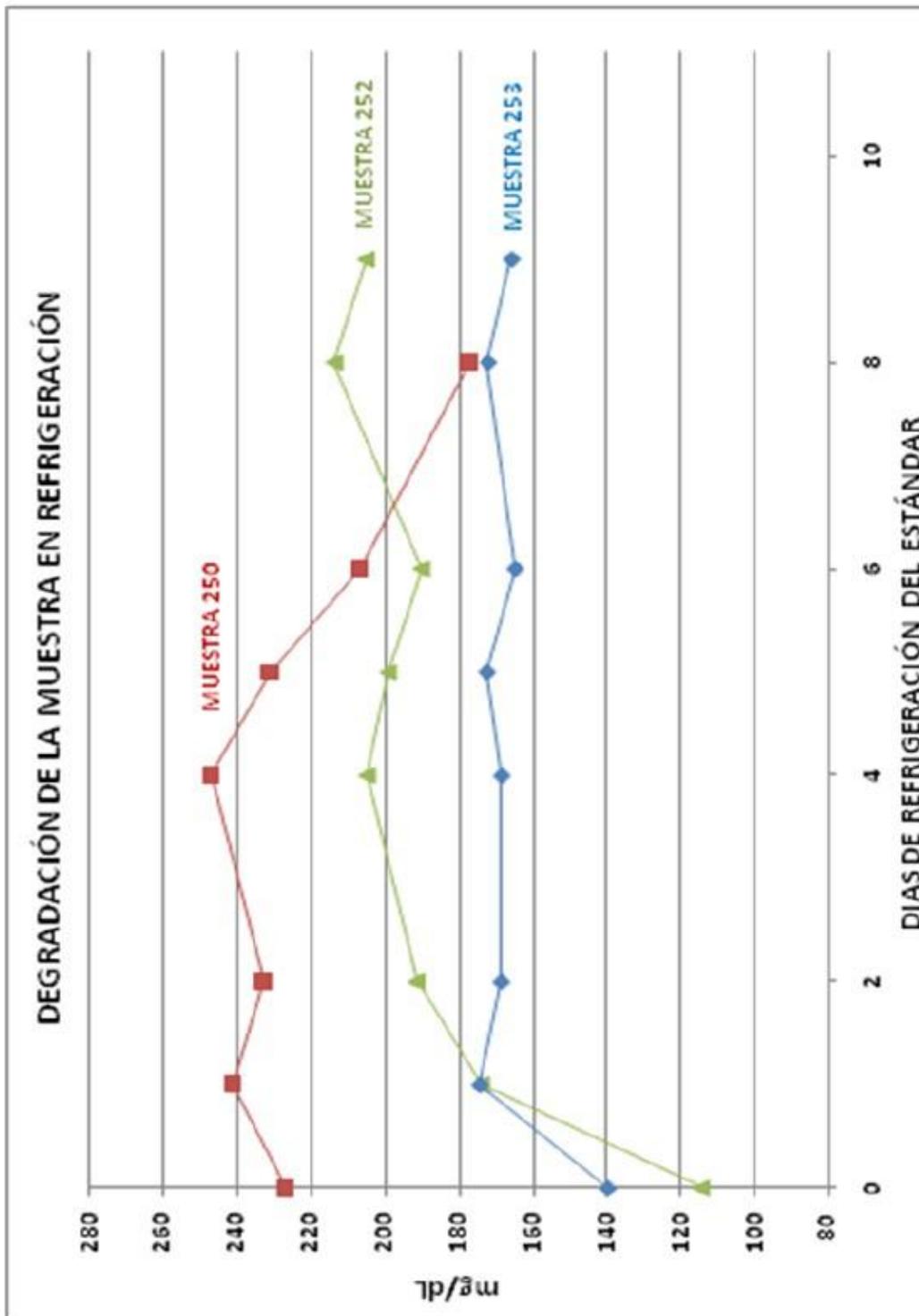


Figura 6.45. Degradación muestras Etanol.



RECUPERACIÓN

Tabla 6.64. Resultados de Recuperación

| | | MUESTRAS REAL | | | MUESTRA FORTIFICADA | | |
|--|---------|-----------------|-------------|--------------|---------------------|-------------|--------------|
| | Replica | Isobutanol área | Etanol Área | Etanol mg/dL | ISOBUTANOL área | Etanol Área | Etanol mg/dL |
| | 1 | 406.53622 | 152.4774 | 84.888 | 402.31540 | 310.788 | 185.305 |
| | 2 | 469.81760 | 173.998 | 83.698 | 402.9578 | 312.947 | 186.347 |
| | 3 | | | | 405.40421 | 310.791 | 183.820 |
| | 1 | 411.532 | 176.404 | 98.428 | 403.50131 | 337.631 | 201.54 |
| | 2 | 408.5887 | 176.9577 | 99.550 | 397.603 | 336.02 | 203.65 |
| | 3 | | | | 406.597 | 337.144 | 199.62 |

Tabla 6.65. % de Recuperación

| Muestra | Muestra Real Etanol mg/dL Valores promedio | Muestra Fortificada Etanol mg/dL Valores promedio | % Recuperación |
|---------|---|--|----------------|
| 1 | 84.293 | 185.15 | 100 % |
| 2 | 98.989 | 201.603 | 102% |



CAPÍTULO VII.

ANÁLISIS DE RESULTADOS, OBSERVACIONES Y CONCLUSIONES.

El análisis de resultados, las observaciones y conclusiones a las cuales se llegaron, se desglosadas según el orden del desarrollo de la validación.

SELECTIVIDAD: En el estudio de selectividad fueron considerados a demás del etanol que es nuestro compuesto de interés. Metanol y Acetona por la adulteración de bebidas alcohólicas, isobutanol que es el estándar interno del método, éter etílico, benceno y tolueno por el consumo de inhalantes, hexano debido a la putrefacción de las muestras biológicas, isopropanol y acetona que pueden estar presentes en cadáveres diabéticos, cloroformo presente debido a su uso como anestésico. Todos los compuestos mencionados anteriormente fueron inyectados al método cromatográfico e identificados sus tiempos de retención, los cuales no interfieren en el tiempo de retención del etanol ni entre sí. También fueron calculadas las resoluciones de los picos cromatográficos obteniendo como resolución más baja de 1.15 entre la acetona y el isopropanol, el resto de las resoluciones fueron mayores de 3.75, lo que permite concluir que existe buena separación cromatográfica entre los compuestos considerados y mismo que de estar presentes en la matriz de sangre no interferirán en la cuantificación del etanol.

Las observaciones y mejoras futuras que se proponen con respecto a la selectividad son: En el estudio no fueron inyectados todos los compuestos mencionados en subcapítulo 5.2 por falta de acceso a ello como los anestésicos, sevofluranos, y halotanos, por mencionar algunos, se propone que más adelante se puedan conseguir e inyectar en el método.



También se observó, que en el cromatograma aparece un pico pegado al metanol en la muestra de sangre, principalmente las de mayor grado de putrefacción, no se logro identificar con los compuestos considerados para selectividad, pero se sospecha que el algún compuestos generado por la descomposición de la sangre en particular acetaldehído.

REPETIBILIDAD: El estudio de repetibilidad fue realizado con 25 réplicas de un estándar de concentración en mg/dl de 110 para el etanol, 25 para el metanol y 10 para la acetona. Se obtuvieron las desviaciones estándar y el coeficiente de variación, los valores obtenidos son:

- Desviación estándar: Etanol = 1.1347 Metanol=0.5153 Acetona=0.07196
- Coeficiente variación: Etanol=1.59% Metanol=1.86% Acetona=0.6624%

También fueron preparadas 6 réplicas de 2 concentraciones diferentes para los tres compuestos y las desviaciones estándar y coeficientes de variación obtenidos fueron muy cercanos a los mencionados con anterioridad, esto permite concluir que la variación es aceptable en los resultados.

Los gráficos de las figuras 3.2 para el etanol, 3.3 para el metanol y 3.4 para la acetona muestran que la variación de resultados en este método y tipo de muestras son: para etanol de +4 mg/dl, de +2 mg/dl para el metanol y +0.5 para la acetona.

REPRODUCIBILIDAD: La reproducibilidad consideró 2 parámetros de variación curvas de calibración preparadas en días diferentes y diferentes analistas para la preparación de la curva de calibración y muestras, obteniendo los siguientes resultados.

- Las 5 curvas de calibración preparadas en días diferentes para metanol, etanol y acetona no presentaron variación significativa en el comportamiento de las curvas de calibración, lo que concluye que la curva de calibración es reproducible y que no será alterada por el día de la preparación.
- Al preparar las curvas de calibración por diferentes analistas estas no presentaron la misma reproducibilidad que la obtenida en las curvas preparadas en días diferentes, las variaciones que se presentan es debido al pipeteo y aforo de cada analista, para el etanol la pendiente de la curva de calibración vario 0.03 unidades, para el metanol 0.03 y para la acetona 0.2 Las variaciones observadas se consideran dentro de un rango aceptable.
- Al preparar la muestras por diferentes analistas para análisis de etanol, se observó que la variación va desde un 3.91 al 8.65, el valor más lejano del promedio fueron los generados por el analista No 4.



La reproducibilidad del método es confirmada pero se recomienda homogenizar el modo de pipeteo de los analistas para obtener variaciones más pequeñas y mejorar la reproducibilidad de los resultados.

LÍMITE DE DETECCIÓN LOD, CUANTIFICACIÓN LOQ Y RANGO DE

TRABAJO: Los valores de LOD, LOQ y rango de trabajo de la curva de calibración para el etanol, metanol y acetona son:

Etanol: LOD= 3.37 mg/dl LOQ=11.24 mg/dl Rango lineal= 15mg/dl–1000 mg/dl.

Metanol: LOD= 2.89 mg/dl LOQ=8.0 mg/dl Rango lineal= 10mg/dl–500 mg/dl.

Acetona: LOD= 0.768 mg/dl LOQ=1.0 mg/dl Rango lineal= 3mg/dl–1000 mg/dl.

SENSIBILIDAD: La sensibilidad está dada por la pendiente de la curva de calibración entre mayor sea el valor de la pendiente el detector tiene un respuesta más sensible a la variación de concentración, para el etanol es de 0.27, para el metanol de 0.150 y para la acetona de 1.13, los 3 compuestos presentan sensibilidad de respuesta con el detector, sin embargo la que presenta mayor sensibilidad es la acetona.

ROBUSTEZ

El análisis de robustez permite analizar las variaciones que pudieran influir en el desempeño del método y de presentarse saber el grado de afectación en el resultado cuantitativo.

• **Tipo de Matriz:** Las muestras de sangre que llegan al laboratorio de química del SEMEFO DF son muy variadas, desde una sangre muy ligera o muy pesada, relativamente fresca o en estado de putrefacción, con altos niveles de grasa, por mencionar los más comunes, en algunos casos llega como muestra en lugar de sangre, orina, hígado o contenido gástrico, surge la incertidumbre que tanto afecta en el método el tipo de matriz que sea utilizado.

No es fácil la obtención de una sangre libre 100% alcohol, por lo cual en muchos laboratorios de esta área, preparan la muestra en agua, por lo cual se consideró la preparación de la curva de calibración en 3 matrices diferentes, agua, sangre y orina observando que las pendiente del metanol en sangre varía 0.02 unidades con la pendiente de la matriz de orina, y 0.01 con la pendiente de la curva en agua, para el etanol la pendiente de la curva de calibración en sangre varía 0.02 unidades con respecto a la de orina y agua, y en la acetona la pendiente de la matriz de sangre varía 0.01 con respecto a las pendientes en la matriz de orina y agua, concluyendo se podría considerar calibrar la muestra de orina en la misma curva de sangre, pero se propone dejar un método calibrado con la matriz de orina para su uso cuando se



requiera y obtener resultados con mayor precisión.

- **Tiempo de Presurización en el headspace:** Se varió el tiempo de presurización del vial en el headspace de 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 minutos y se observó que existen variaciones al modificar este parámetro, para el metanol el tiempo de presurización de 0.5 presenta una disminución en los valores de concentración, en el caso del etanol y acetona se presenta también una disminución en el valor de concentración pero en el tiempo de 0.1 min, concluyendo que el tiempo de 0.6 para el metanol y el 0.1 para etanol y acetona influirá en un valor menor al real cuantitativamente.
- **Temperatura de calentamiento del vial:** Se consideró el estudio a 4 temperaturas diferentes de calentamiento en el headspace, de 40, 60, 70 y 90°C, el estudio muestra que la temperatura en todos los rangos y en todos compuestos (metanol, etanol, acetona) afectan significativamente el valor de concentración por lo cual es un parámetro crítico con el que se tiene que tener precaución.
- **Agitación de los viales en el headspace:** Variando el tipo de agitación dentro del los viales en el headspace (sin agitación, con agitación baja y con agitación alta) se observó que en el metanol y etanol no hay diferencias significativas al variar este parámetro, sin embargo en la acetona sí se presenta diferencias, concluyendo que no es un parámetro crítico para metanol y etanol pero sí para acetona.
- **Tiempo de calentamiento del vial:** Modificando el tiempo de calentamiento del vial en el headspace a 5, 19 y 15 minutos se concluye que es un parámetro que crítico que afecta directamente la variación de resultados cuantitativos en los tres compuestos metanol, etanol y acetona.
- **Inyectar varias veces la misma septum:** Utilizar las misma septum para más de una inyección de muestra no es muy recomendable, el estudio demostró que lo máximo al reutilizar un septum en 2 veces con un alto de confianza, una tercera inyección puede ser ligeramente confiable sí la concentración obtenida no es tan baja.
- **Volumen de muestra:** Se consideró modificar la cantidad de muestra y estándar interno sin cambiar la proporción entre ellos para no alterar los cálculos de dilución (0.4 ml sangre y 1.6 ml de estándar interno) (0.2 ml sangre y 0.8 ml de estándar interno) (0.5ml sangre y 2.0 ml de estándar interno). Se concluye que puede tomarse la mitad de la cantidad común de muestra y estándar sin obtener variaciones, pero no cantidades mayores de muestra y estándar porque se observa una disminución en los resultados cuantitativos esto se debe a que un volumen mayor reduce el espacio de cabeza en el vial.



La proporción de dilución que se maneja de 0.4 de sangre y 1.6ml de estándar interno es con el fin de homogenizar la densidad de las sangres y tener menor repetibilidad de resultados sin importar el tipo de sangre que se introduzca, las sangres pueden estar muy ligeras o pesadas. Con esta dilución se estandariza las densidades de la sangre y se trata de igualar a la del agua.

- **Estudio de degradación de la muestra refrigerada (ya preparar con estándar interno en el vial):** Se consideró la preparación de la muestra de sangre por 6 días, preparando la muestra de sangre con el estándar interno y dejándolo en refrigeración, se observó que es seguro dejar la muestra refrigerada hasta 3 días, después de este tiempo se empieza a perder la cantidad de alcoholes.
- **Tiempo de degradación de un estándar en refrigeración:** Si se prepara una curva de calibración y se deja en refrigeración sin contacto con la sangre, se observó que es confiable tomarlos para calibrar nuevamente en un lapso no mayor de 3 días, después los valores de concentración cambian y se recomienda mejor preparar una nueva curva de calibración.
- **Estudio de degradación de la muestra refrigerada.**
Si la muestra se deja refrigerando en el tubo de química sanguínea que se recibe y se prepara con el estándar el día que se va analizar, se observó que hay variaciones y no es confiable dejarlo en refrigeración aunque los cambios de concentración que presenta la muestra depende de varios factores, como grado de putrefacción, cantidad de grasas, densidad, se observa que inicialmente aumenta la cantidad de alcohol, se concluye que el estudio debe realizarse el mismo día que la muestra llega al laboratorio. De no poder realizarse el análisis el mismo día, es recomendable que se prepare la muestra en el vial con el estándar interno (listo para inyectar al cromatógrafo) y se deje en refrigeración, de este modo se degrada menos la muestra que si es refrigerada en el tubo de química sanguínea y preparada con estándar interno en días posteriores a la llegada de la muestra.

RECUPERACIÓN. El % de recuperación se llevo a cabo tomando 2 muestras positivas a etanol, una de 84.29 mg/dl y otra de 98.98 mg/dl, se fortificó a estas dos muestras con un estándar de etanol de 100 mg/dl, se leyó la cantidad de alcohol presente en la muestra fortificada y se realizó el % de recuperación obteniendo prácticamente el 100% de extracción de la muestra. La verificación y este parámetro se podría completar haciendo la prueba con un estándar certificado de etanol en la matriz sangre, eso ayudaría a ver además el sesgo cuantitativo que tiene el método. El estándar sólo existe en la matriz de sangre, no lo hay para orina u otro fluido biológico, se pidió a estados unidos pero no ha sido aun autorizada la compra por parte del SEMEFO-DF, sin embargo se tiene considerado adicionar a esta validación.



BIBLIOGRAFÍA.

Bartell Donald J.; McMurray Mary Catherine; Imobersteg Anne D. **Attacking and Defending Drunk Driving Tests**. 1Ed. Editorial James Publishing. 2007

Bell Suzanne. **Drugs, Poisons and chemistry**. 1Ed. Editorial infobase publishing, 2009

CLARKE de análisis de drogas y venenos, Londres: Farmacéutico de prensa. Versión electrónica, 2004.

Duran Arias, Jaime. **Criminalística Tomo I Utilización Científica de la Prueba Material en la Práctica Forense**. 1 Ed. Editoria Quito 1977, p.p. 29-55.

I. Calabrese, Alberto. A. Astolfi, Emilio (1969) **Toxicología**, Editorial Kapelusz. Alemania

James C. Garriott. **Medical – Legal Aspects of Alcohol**. 4 Ed. Editorial Lawyers & Judges 2003

Karch Steven B. **Drugs Abuse Handbook**. 1Ed. Editorial CRC PRESS LLC 1998.

Montiel Sosa, Juventino. **Manual de Criminalística 1. Tomo I. Ciencia y Técnica**, 1 Ed. Editorial iberoamericana

SKOOG, D.A; Leary J.J.; **Análisis Instrumental**, 4°Ed.; Ed. McGraw-Hill (1944), capítulos 3,4,5,6,8.

Willard Hobart H.; **Métodos Instrumentales de Análisis**, 1°Ed. Grupo Editorial Iberoamérica (1991), capítulos 6,7,11

Maroto Sánchez, Alicia. **“Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina”**. Tesis Doctoral, Universitat Rovira I Virgili Tarragona España, Departamento de Química Analítica, 2002



González Arriaga, Evelyn Rocio. **“Validación del Método para Determinación de Alcohol en Sangre, por Cromatografía de Gases Doble Columna con Detector de Ionización de Flama”**, Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas Y Farmacia, 2008

Guía Para La Validación de Métodos de Ensayo. OAA.DC-LE-05

NMX-EC-17025-IMNC-2000 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración

Guía Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 1998

Guía Eurachem, Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, Segunda Edición, Noviembre 2005

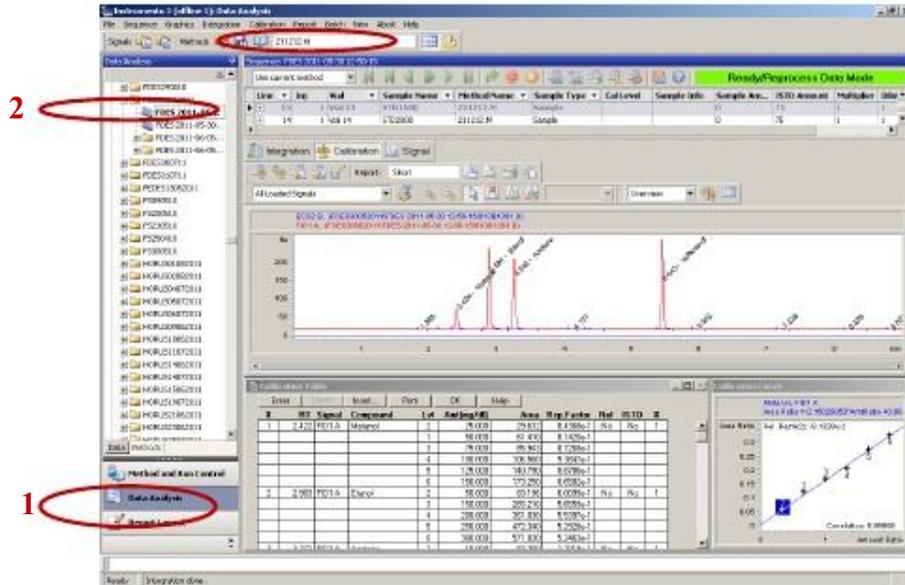
Guía Eurachem, Traceability in Chemical Measurement, 2003



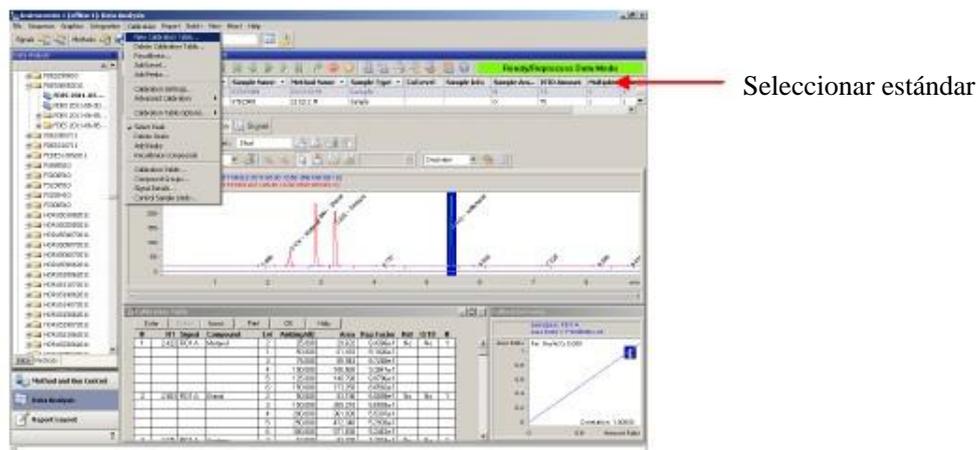
ANEXOS.

ANEXO 1. CALIBRACIÓN EN EL SOFTWARE CHEMSTATION.

Obtenidos los cromatogramas de los estándares se calibra la curva de calibración seleccionando data analysis, abrir la carpeta donde se grabó la corrida de los estándares y el método que se va a calibrar

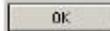


- Seleccionar el primer estándar e ir a la barra de menú → calibration → New calibration table





- Aparecerá inmediatamente la siguiente pantalla, seleccionar Automatic Setup level 1 y dar



- Se adicionará el primer nivel de la curva de calibración de cada estándar, seleccionar el Estándar número 2 e ir a la barra barra de menú → calibration→ Add level

| # | RT | Signal | Compound | Lvl | Amplng/dl | Area | Resp Factor | Ref | ISTD | # |
|---|-------|--------|----------|-----|-----------|---------|-------------|-----|------|---|
| 1 | 2.422 | FD1 A | Metanol | 2 | 25.000 | 28.832 | 8.4388e-1 | No | No | 1 |
| | | | | 1 | 50.000 | 61.410 | 8.1420e-1 | | | |
| | | | | 3 | 75.000 | 85.943 | 8.7288e-1 | | | |
| | | | | 4 | 100.000 | 106.560 | 8.3847e-1 | | | |
| | | | | 5 | 125.000 | 140.780 | 8.8786e-1 | | | |
| | | | | 6 | 150.000 | 173.250 | 8.6582e-1 | | | |
| 2 | 2.903 | FD1 A | Etanol | 2 | 50.000 | 83.196 | 6.0099e-1 | No | No | 1 |
| | | | | 3 | 150.000 | 265.210 | 5.6559e-1 | | | |
| | | | | 4 | 200.000 | 361.030 | 5.5397e-1 | | | |
| | | | | 5 | 250.000 | 472.340 | 5.2928e-1 | | | |
| | | | | 6 | 300.000 | 571.830 | 5.2463e-1 | | | |
| 3 | 3.774 | FD1 A | Acetona | 1 | 10.000 | 62.700 | 4.1019e-1 | No | No | 1 |



- Inmediatamente aparecerá la siguiente pantalla seleccionar que es el segundo nivel porque corresponde al segundo juego de concentraciones de los estándares, y dar



- Para el resto de los estándares seguir estos últimos dos pasos y una vez integrando todos los niveles de la tabla con los estándares, seleccionar el tiempo de retención de cada compuesto e ir identificando con el nombre los compuestos, (Metanol, Etanol, Acetona, e Isobutanol), colocar la concentración correspondiente de cada estándar y en la columna de ref e ISTD seleccionar en todos NO excepto en el isobutanol que es el estándar interno hay seleccionar Yes en ambas columnas

Nombre

Tiempo de Retención

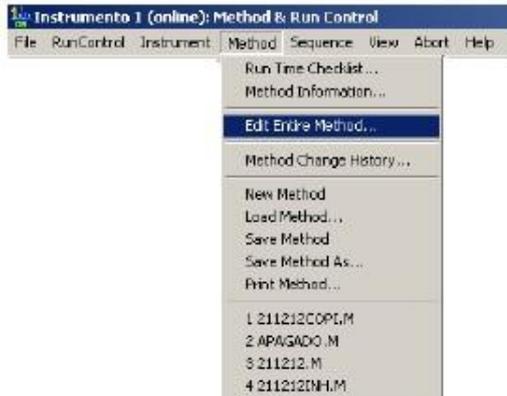
Concentración

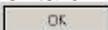
| RT | Signal | Compound | Conc | Ref | ISTD |
|----|---------|----------|---------|----------|------|
| 1 | 25.808 | Metanol | 29.832 | 0.5382e1 | No |
| 1 | 50.808 | Metanol | 61.413 | 0.1428e1 | No |
| 2 | 75.808 | Metanol | 85.141 | 0.0708e1 | No |
| 4 | 180.808 | Etanol | 185.863 | 3.3847e1 | No |
| 5 | 125.808 | Etanol | 140.758 | 0.0708e1 | No |
| 6 | 140.808 | Etanol | 132.268 | 0.0800e1 | No |
| 7 | 90.808 | Etanol | 85.196 | 6.0794e1 | No |
| 2 | 180.808 | Acetona | 285.313 | 5.0894e1 | No |
| 4 | 280.808 | Acetona | 281.829 | 2.0792e1 | No |
| 5 | 280.808 | Acetona | 422.248 | 5.2829e1 | No |
| 6 | 380.808 | Acetona | 297.838 | 5.5833e1 | No |
| 7 | 380.808 | Acetona | 83.308 | 1.3818e1 | No |



ANEXO 2 PROGRAMACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS EN EL SOFTWARE CHEMSTATION

1. Ingresar al software desde el icono del escritorio,
2. De la barra de menú ingresar Method → Edit Entire Method



3. Inmediatamente presentará las siguiente pantalla, seleccionar todos parámetros y dar 

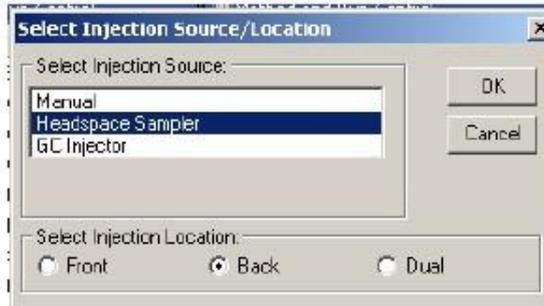
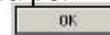


4. Escribir la información del Método y dar 





5. Seleccionar el tipo de inyección en este método la inyección será por Headspace sampler cuya Back seleccionar ambos y dar



6. Configurar las condiciones del horno seleccionar con las temperaturas y tiempos que indica la siguiente pantalla y dar



| Oven Ramp | °C/min | Next °C | Hold min | Run Time |
|-----------|--------|---------|----------|----------|
| Initial | | 60 | 4.00 | 4.00 |
| Ramp 1 | 30.00 | 120 | 3.00 | 9.00 |
| Ramp 2 | 0.00 | 0 | 0.00 | |
| Ramp 3 | 0.00 | 0 | 0.00 | |
| Ramp 4 | 0.00 | 0 | 0.00 | |
| Ramp 5 | 0.00 | 0 | 0.00 | |
| Ramp 6 | 0.00 | 0 | 0.00 | |
| Post Run | | 50 | 0.00 | 9.00 |



7. Configurar las condiciones del headspace y dar

OK

Method: Agilent G1888 Headspace Sampler

Temperatures --- deg C

Oven: 70

Loop: 80

Transfer Line: 90

Misc.

Multi HS Extr: Off

Extractions Per Vial: 2

Shaking: Off

Timing --- Minutes

Vial Equilibration: 5.2

Pressurization: 0.20

Loop Fill: 0.20

Loop Equilibration: 0.05

Inject: 1.00

GC Cycle: 5.0

Pressures, psi

Carrier: 14

Vial: 5

OK Cancel Assist... Help

8. Adicionar como Signal Description FID A y dar

OK

Signal Details: Instrument 1

Available Signals

Insert Row Append Row Delete Row

| Signal Description | Start | End | Delay |
|--------------------|-------|-------|-------|
| FID A | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

OK Cancel Help



9. Llenar los parámetros indicados en la siguiente pantalla y dar

OK

Edit Integration Events

Manual Events:

For All Signals:

| Integration Events | Value |
|------------------------------|----------|
| Tangent Skim Mode | Straight |
| Tall Peak Skim Height Ratio | 0.00 |
| Front Peak Skim Height Ratio | 0.00 |
| Skim Valley Ratio | 20.00 |
| Baseline Correction | Advanced |
| Peak to Valley Ratio | 0.00 |

Events Table: ECD2 B Specific

| Time | Integration Events | Value |
|---------|--------------------|--------|
| Initial | Slope Sensitivity | 0 |
| Initial | Peak Width | 0.0037 |
| Initial | Area Reject | 0 |
| Initial | Height Reject | 0 |
| Initial | Shoulders | OFF |

10. Seleccionar los parámetros marcados y presionar Ok

Specify Report: Instrumento 1

Destination:

- Printer
- Screen
- File

File Type:

- .TXT
- EMF
- .DIF
- CSV
- .XLS
- HTM

File Prefix: Report

Quantitative Results:

- Calculate: ISTD
- Based On: Area
- Sorted By: Signal

Signal Options...

Style:

Report Style: Short

- Sample info on each page
- Add Fraction Table and Ticks
- Add Chromatogram Output
- Add Summed Peaks Table

Report Layout For Uncalibrated Peaks:

- Separately
- With Calibrated Peaks
- Do Not Report

Chromatogram Output:

- Portrait
- Landscape
- Multi-Page (Landscape)

Size: % of Page

Time: 90

Response: 20

Pages: 1

OK Cancel Help



11. Seleccionar los parámetros marcados y presionar OK

Calibration Settings: Instrumento 1

Title: _____

Use Sample Data: **From Sample Defaults Below**

Sample Defaults

| Amount | # | Compound | ISTD Amount |
|---------------------|---|------------|-------------|
| 0.0000 | 1 | Isobutanol | 75.00000 |
| Amount Units: mg/dl | | | |
| Multiplier: 1.0000 | 1 | Isobutanol | 75.00000 |
| Diution: 1.0000 | | | |

Default RT Windows

| Reference Peaks | Minutes | % |
|-----------------|---------|--------|
| 0.00 | + 3.00 | |
| Other Peaks | 0.00 | + 3.00 |

Default Calibration Curve

Type: **Linear**

Origin: **Include**

Weight: **Equal**

Calculate Uncalibrated Peaks

For Signal: **FID1 A.**

Using Compound: **None**

With Resp Factor: **0.000**

Use ISTD: **None**

No

If Peaks Missing

Partial Calibration

Correct All RTs

ISTD Correction

Use Multiplier & Diution Factor with ISTDs

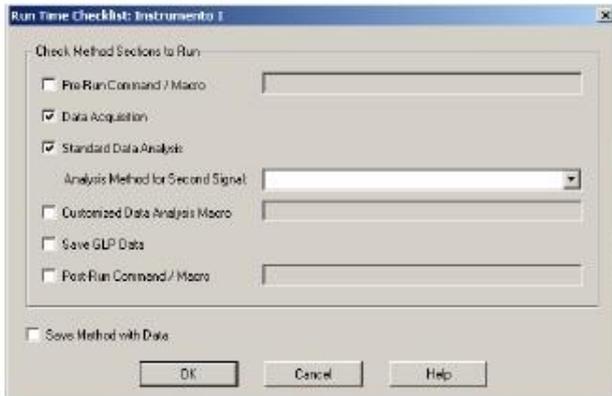
OK Cancel Help

12. Llenar la tabla de curva de calibración

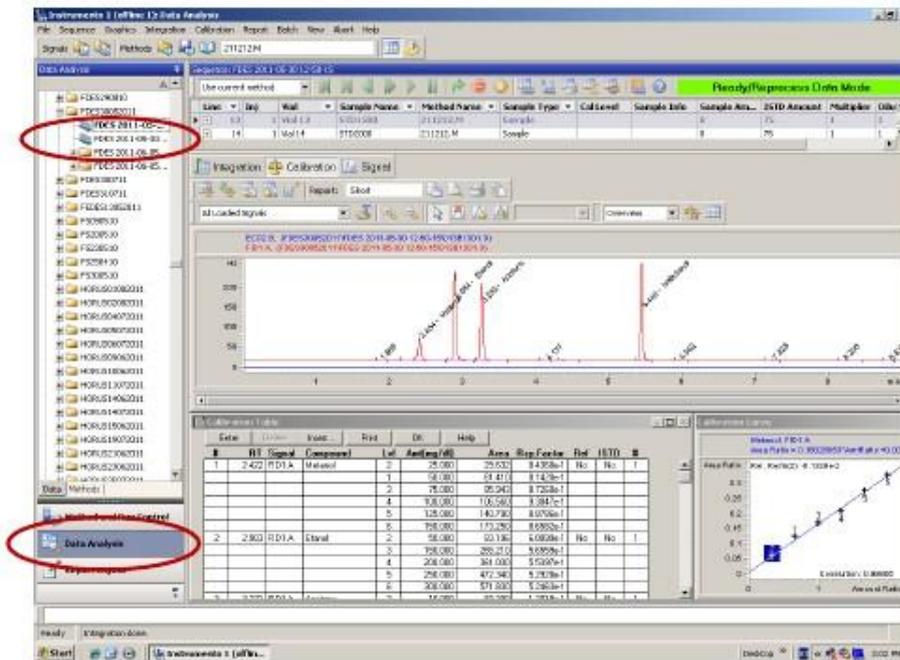
| # | RT | Signal | Compound | Lvl | Am([mg/dl]) | Area | Resp.Factor | Ref | ISTD | # |
|---|--------|---------|------------|-----|-------------|---------|-------------|-----|--------|--------|
| 1 | 2.422 | FID1 A. | Metanol | 2 | 25.000 | 29.632 | 8.4388e-1 | No | No | 1 |
| | | | | 1 | 50.000 | 61.410 | 8.1420e-1 | | | |
| | | | | 3 | 75.000 | 85.943 | 8.7260e-1 | | | |
| | | | | 4 | 100.000 | 106.560 | 8.3847e-1 | | | |
| | | | | 5 | 125.000 | 140.790 | 8.8700e-1 | | | |
| | | | | 6 | 150.000 | 173.250 | 8.6562e-1 | | | |
| 2 | 2.903 | FID1 A. | Etanol | 2 | 50.000 | 83.196 | 6.0099e-1 | No | No | 1 |
| | | | | 3 | 150.000 | 265.210 | 5.6599e-1 | | | |
| | | | | 4 | 200.000 | 361.030 | 5.5397e-1 | | | |
| | | | | 5 | 250.000 | 472.340 | 5.2926e-1 | | | |
| | | | | 6 | 300.000 | 571.890 | 5.2463e-1 | | | |
| | | | | 3 | 3.271 | FID1 A. | Acetona | 2 | 10.000 | 82.200 |
| 1 | 20.000 | 162.140 | 1.2339e-1 | | | | | | | |
| 3 | 30.000 | 242.960 | 1.2348e-1 | | | | | | | |
| 4 | 40.000 | 318.430 | 1.2522e-1 | | | | | | | |
| 5 | 50.000 | 393.820 | 1.2696e-1 | | | | | | | |
| 6 | 60.000 | 473.710 | 1.2666e-1 | | | | | | | |
| 4 | 5.456 | FID1 A. | Isobutanol | 1 | 75.000 | 499.600 | 1.5012e-1 | Yes | Yes | 1 |
| | | | | 2 | 75.000 | 507.900 | 1.4767e-1 | | | |
| | | | | 3 | 75.000 | 511.820 | 1.4654e-1 | | | |
| | | | | 4 | 75.000 | 516.170 | 1.4530e-1 | | | |
| | | | | 5 | 75.000 | 513.530 | 1.4616e-1 | | | |
| | | | | 6 | 75.000 | 529.910 | 1.4153e-1 | | | |



13. Seleccionar los parámetros marcados y presionar OK

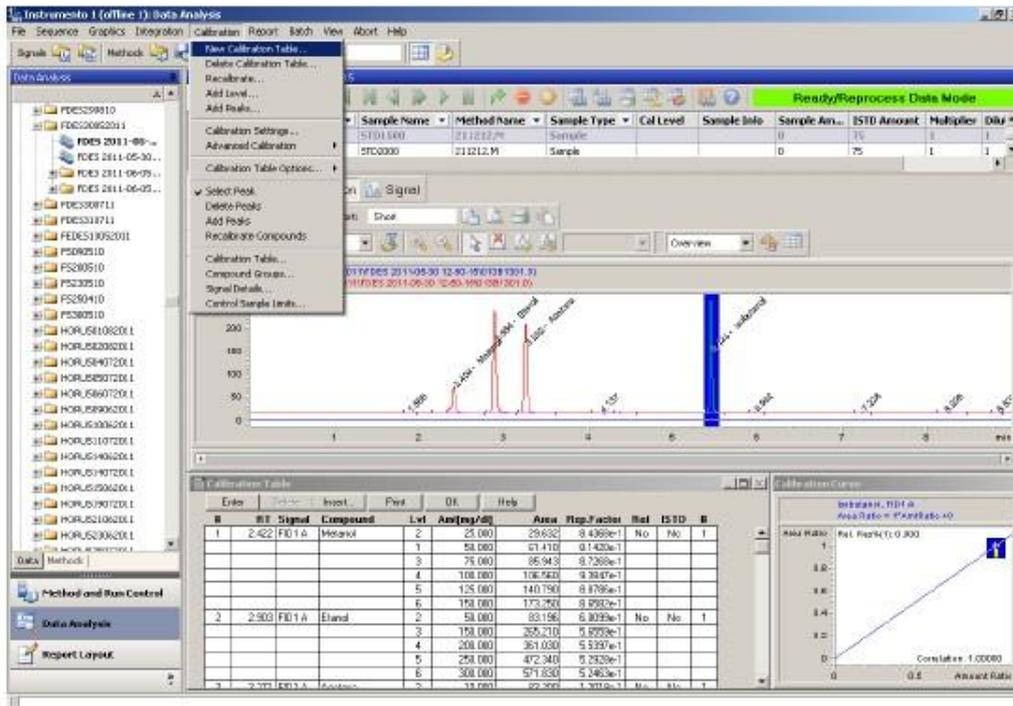


- Una vez que se sean llenados los parámetros salva el método ingresando a la barra de menú en file save as → nombrar el método.
- Para llamar el método seleccionar en la barra de menú → file → load method → seleccionar el nombre de método creado → dar click en abrir.
- Programar los estándares de la curva da calibración como si fueran muestras para poder calibrar el método.
- Obtenidos los cromatogramas de los estándares se calibra seleccionando data analysis y abrir la carpeta donde se grabó la corrida de los estándares.





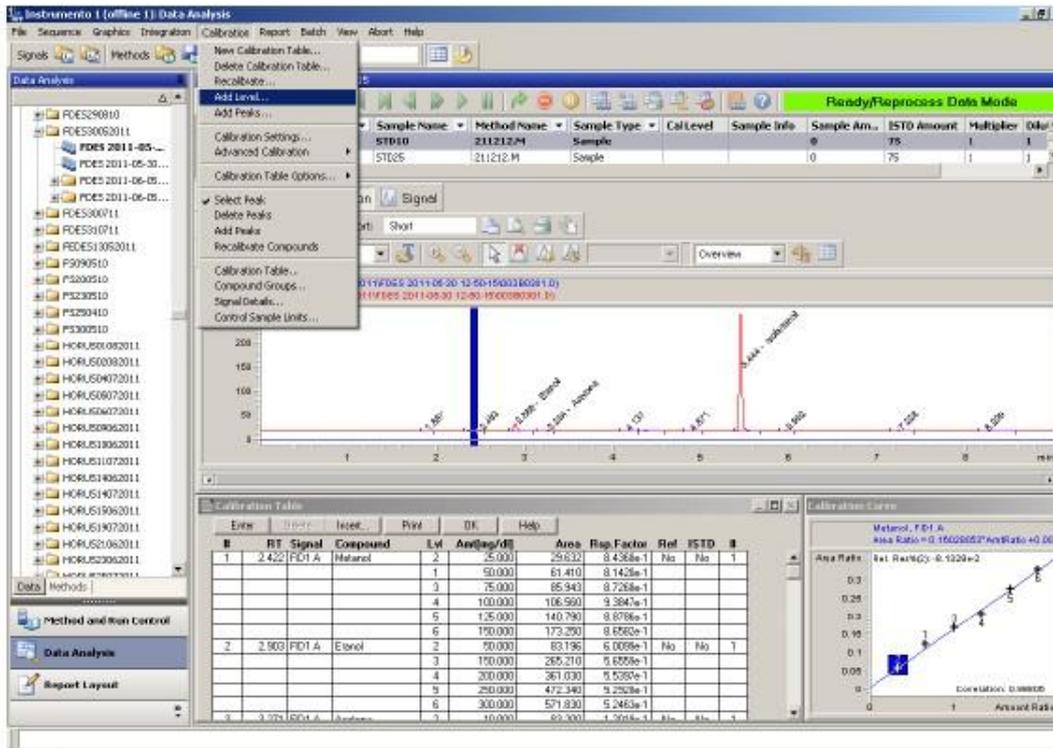
Seleccionar el primer estándar e ir a la barra de menú → calibration→ New calibration table



Aparecerá inmediatamente la siguiente pantalla, seleccionar Automatic Setup level 1 y dar



Se adicionará el primer nivel de la curva de calibración de cada estándar, seleccionar el Estándar número 2 e ir a la barra de menú → calibration→ Add level



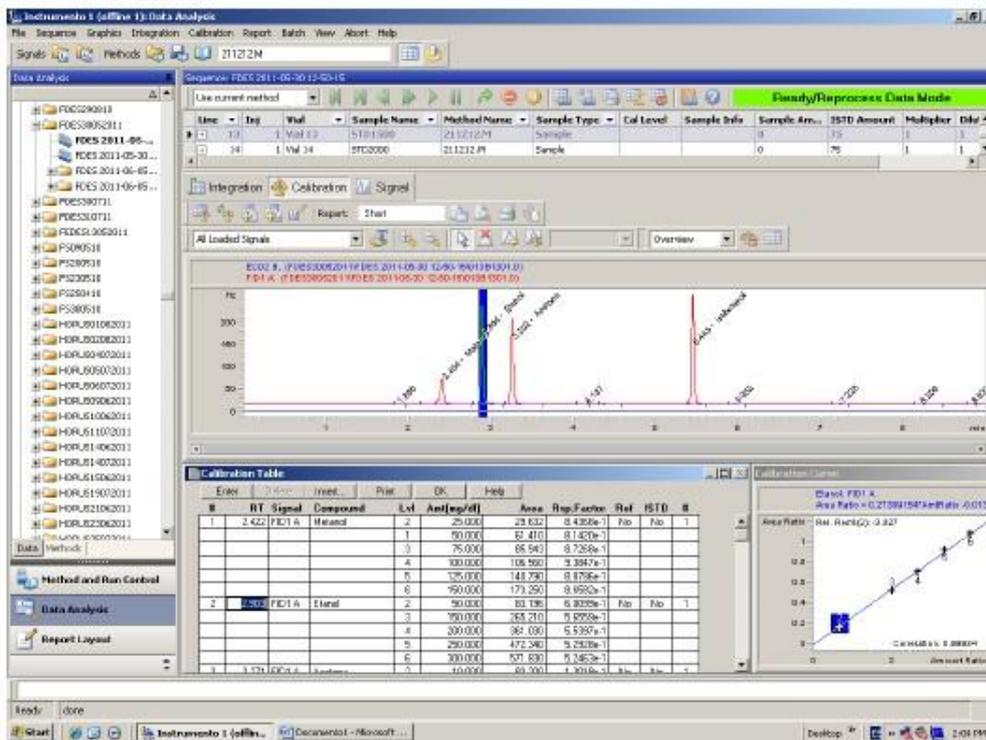
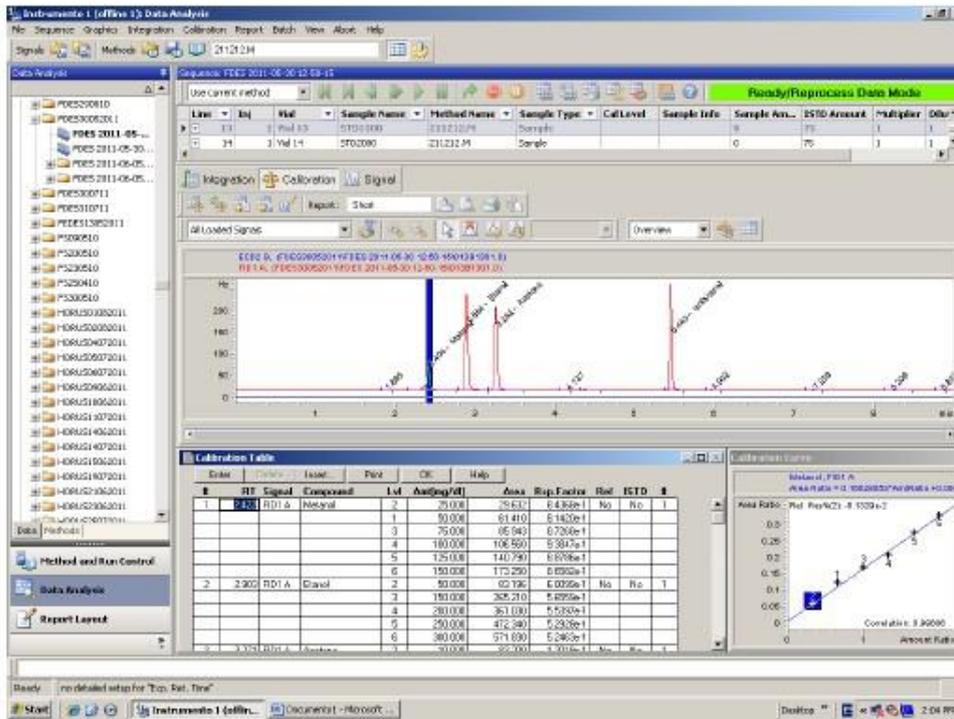
Inmediatamente aparecerá la siguiente pantalla seleccionar que es el segundo nivel porque corresponde al segundo juego de concentraciones de los estándares, y dar

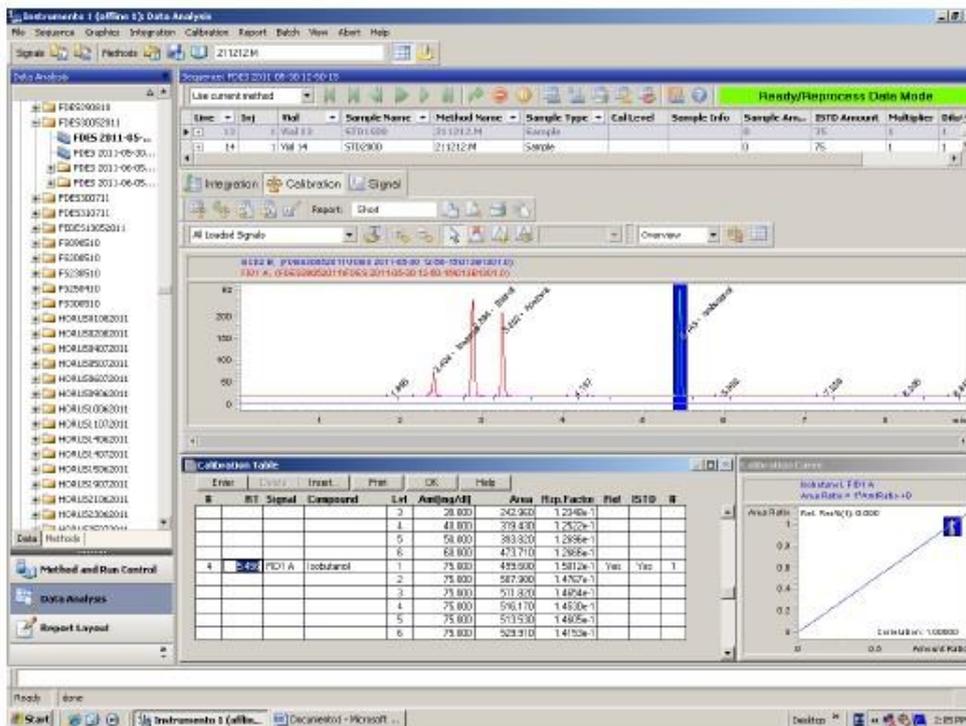
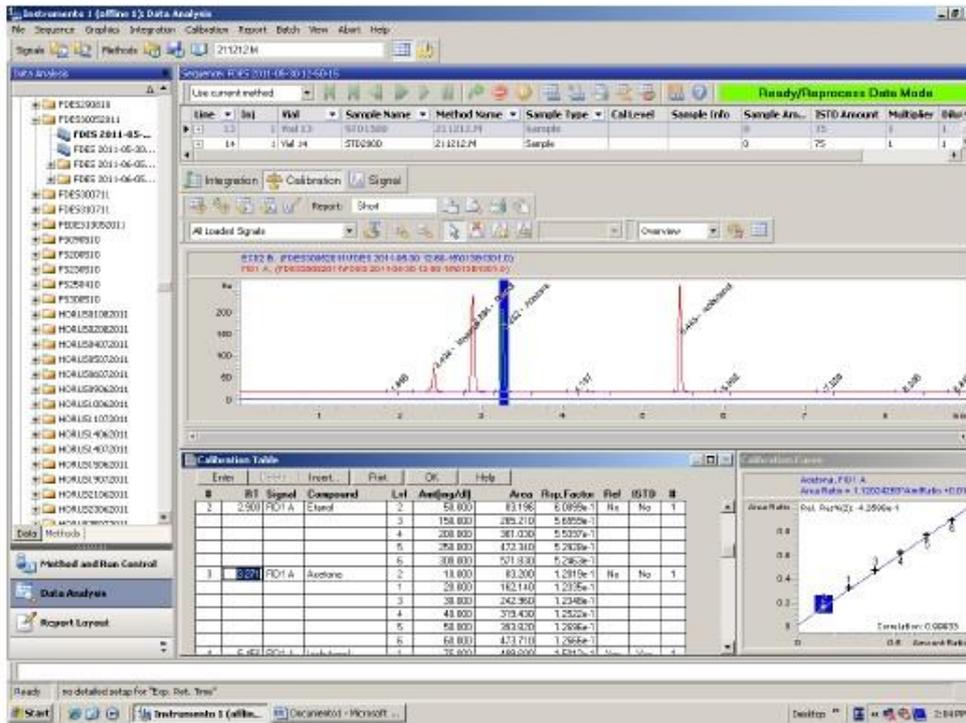


Para el resto de los estándares seguir estos últimos dos pasos y una vez integrando todos los niveles de la tabla con los estándares, seleccionar el tiempo de retención de cada compuesto e ir identificando con el nombre los compuestos, (Metanol, Etanol y Acetona), colocar la concentración correspondiente de cada estándar y en la columna de ref e ISTD seleccionar en todos NO excepto en el isobutanol que es el estándar interno hay seleccionar Yes en ambas columnas



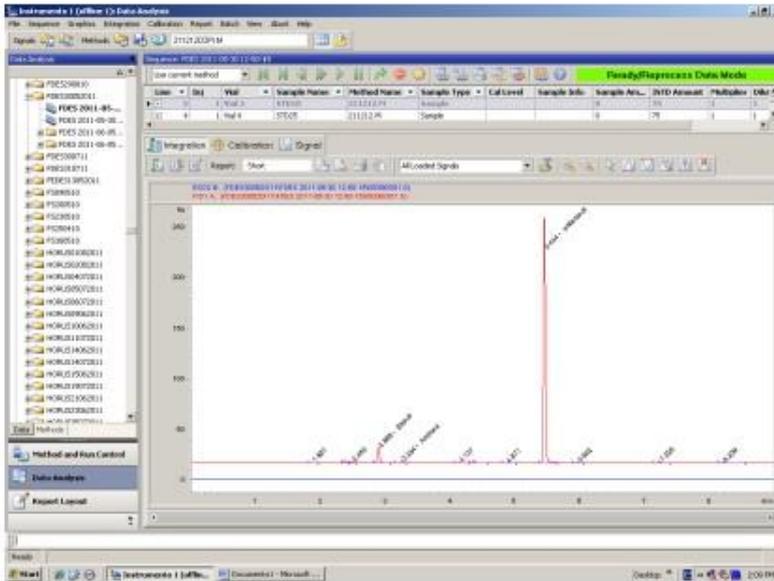
VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE ETANOL, METANOL Y ACETONA EN SANGRE DE MUESTRAS FORENSES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES



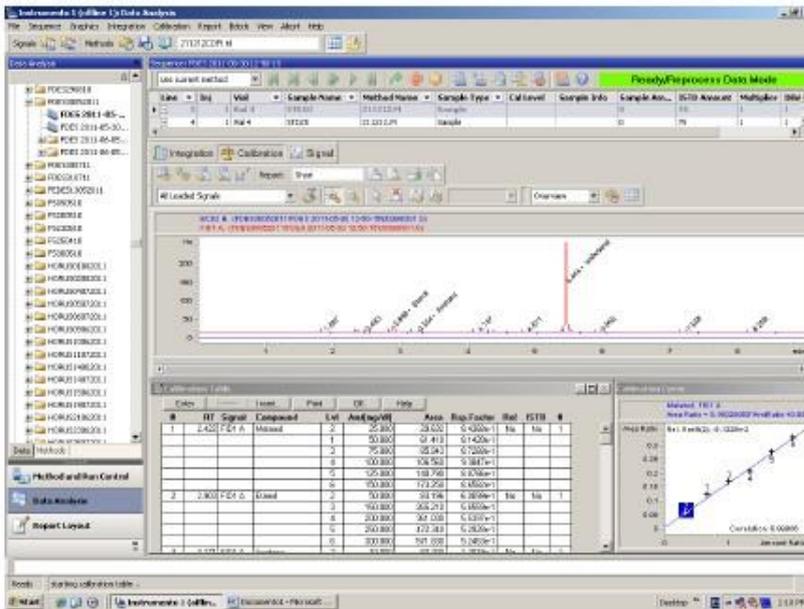




Terminando de llenar la tabla de estándares seleccionar integración y ubicar las líneas base de cada pico



Terminando de ubicar las línea base de los picos para la integración del área bajo la curva se selecciona calibración y elaborara la curva de calibración para cada componente considerando el método de estándar interno.





ANEXO 3.- TÉRMINOS CROMATOGRÁFICOS

| Concepto | Definición |
|--|--|
| Tiempo de retención(t_i): | Es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene el máximo del pico. Este tiempo es característico del soluto, de la fase líquida y de la temperatura de la columna. Los tiempos de retención pueden usarse para identificar picos, ya que en condiciones controladas son reproducibles. |
| Tiempo muerto (t_0) | El tiempo cero (t_0) o tiempo muerto (t_m), es el tiempo de retención del componente inerte o gas portador. |
| Tiempo de retención ajustado ($t'i$) | Es le tiempo que transcurre entre la aparición de la señal que corresponde a un componente inerte y a la del componente considerado: $t'i = t_i - t_0$ |
| Volumen de retención | Es el volumen necesario de fase móvil para transportar el soluto de un extremo a otro del sistema cromatográfico. Se define como: $VR = tR \cdot Fm$ Donde VR es el volumen de retención expresado como el producto del tiempo de retención de un componente (tR) y el flujo de la fase móvil (Fm). |
| Volumen de retención muerto | Es el volumen de eluyente que se consume sin que se detecte ningún componente. Se define igual que el volumen de retención pero el tiempo utilizado es el tiempo muerto: $Vm = tm \cdot Fm$ |
| Volumen de retención verdadero. | El volumen de retención verdadero de un componente es la diferencia entre el volumen de retención del componente y el volumen muerto. $V'R = VR - Vm$ O lo que es lo mismo: $V'R = (tR - t_0) \cdot Fm$ |
| Coefficiente de reparto (K) | Se define como el cociente entre la concentración de componente presente en la fase estacionaria y la concentración de componente presente en la fase móvil: Donde Cs y Cm son las concentraciones de componente presente en las fases estacionaria y móvil respectivamente. El valor de K representa el valor de la pendiente de la recta que se obtiene al representar Cs frente a Cm . |



| Concepto | Definición |
|----------------------------------|--|
| Razón de reparto | <p>Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles de la fase móvil.</p> $k' = \frac{C_s V_s V_s}{C_M C_M V_M} = K$ |
| Número efectivo de platos | <p>Mide la capacidad de la columna para separar los componentes, no la retención de los mismos. La eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del cromatograma, observando la agudeza de los picos. Donde N es el número de platos teóricos, L es la longitud de la columna, H es la altura de cada plato, $t'R$ es el tiempo corregido de retención de un componente y ai es la anchura del pico cromatográfico.</p> |
| Resolución | <p>Es el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados. Se define como: Donde R_s es la resolución, $t'RA$ y $t'RB$ son los tiempos de retención de los componentes A y B, y aA y aB son las anchuras de los picos del cromatograma de los anteriores componentes.</p> <p>Si el valor de la resolución está próximo a 0,7 se obtendrá una mala resolución quedando los picos solapados, de forma que se distinguen las crestas, pero no la base, y si el valor de la resolución está próximo a 1,5 se obtendrán unos picos bien delimitados por lo que se obtendrá una buena resolución.</p> <p>Una pobre resolución es debida principalmente a:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hay demasiada muestra en la columna. • La columna o placa es corta. • La fase móvil no discrimina entre los componentes. • La columna es demasiado gruesa. |
| Línea base | <p>Es la parte del registro que corresponde a la fase móvil o gas portador.</p> |
| Altura de pico | <p>Es la distancia entre la cima del pico y la línea base. En el caso de que el vértice sea redondeado se trazan rectas tangentes a los dos puntos de inflexión de las laderas; el punto de corte de las dos rectas determina la altura del pico.</p> |
| Ancho del pico | <p>Es la longitud del tramo de la prolongación de la línea de base, comprendida entre las intersecciones con la misma de las laderas del pico o, en su caso, de las líneas tangentes antes mencionadas.</p> |
| Área del pico | <p>Es el área bajo la curva del pico cromatográfico es representativo a la cantidad de soluto eluido de la columna por lo tanto es directamente proporcional a la concentración del analito.</p> |
| Eficiencia | <p>Eficiencia Para definir la eficacia se utiliza el concepto de piso teórico, y se define éste como la sección teórico-transversal en la cual se realiza el equilibrio de partición durante el flujo de fase móvil. Cuanto mayor se el número de platos teórico (N) mayor será la eficiencia de la columna.</p> |



ÍNDICE DE TABLAS

| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|-------------|---|---------|
| Tabla 2.1. | Propiedades fisicoquímicas del etanol | 13 |
| Tabla 2.2. | Propiedades fisicoquímicas del metanol | 14 |
| Tabla 2.3. | Propiedades fisicoquímicas de la acetona | 14 |
| Tabla 2.4. | Propiedades fisicoquímicas del isobutanol | 14 |
| Tabla 2.5 | Compuestos volátiles presentes en sangre | 22 |
| Tabla 3.1 | Clasificación de columnas. | 39 |
| Tabla 3.2 | Curva de Calibración | 48 |
| Tabla 5.1 | Presión de Gases | 65 |
| Tabla 5.2 | Condiciones del Headspace. | 66 |
| Tabla 5.3 | Condiciones del Puerto de Inyección | 66 |
| Tabla 5.4 | Condiciones de la Columna | 66 |
| Tabla 5.5 | Condiciones del Horno | 67 |
| Tabla 5.6 | Condiciones del Detector FID | 68 |
| Tabla 5.7 | Preparación de solución stock metanol, etanol y acetona | 68 |
| Tabla 5.8 | Preparación de la curva de calibración | 70 |
| Tabla 5.9 | Preparación de soluciones para selectividad | 71 |
| Tabla 5.10. | Soluciones estándar para repetibilidad. | 72 |
| Tabla 5.11 | Concentración final de estándares en la matriz | 73 |
| Tabla 6.1. | Tiempos de Retención | 84 |
| Tabla 6.2. | Resoluciones de cada componente. | 85 |
| Tabla 6.3. | Repetibilidad STD-R1 | 86 |
| Tabla 6.4 | Repetibilidad Estándar 2 y 3 | 88 |
| Tabla 6.5. | Curva Etanol 1 | 89 |
| Tabla 6.6. | Curva Etanol 2 | 89 |
| Tabla 6.7 | Curva Etanol 3 | 90 |
| Tabla 6.8 | Curva Etanol 4 | 90 |
| Tabla 6.9 | Curva Etanol 5 | 90 |
| Tabla 6.10 | Curva Metanol 1 | 91 |
| Tabla 6.11 | Curva Metanol 2 | 91 |
| Tabla 6.12 | Curva Metanol 3 | 92 |
| Tabla 6.13 | Curva Metanol 4 | 92 |
| Tabla 6.14 | Curva Metanol 5 | 92 |
| Tabla 6.15 | Curva Acetona 1 | 93 |
| Tabla 6.16 | curva acetona 2 | 93 |
| Tabla 6.17 | curva acetona 3 | 94 |



| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|----------|--|---------|
| | Tabla 6.18 curva acetona 4 | 94 |
| | Tabla 6.19 curva acetona 5 | 94 |
| | Tabla 6.20. Curva Metanol Analista 1. | 95 |
| | Tabla 6.21. Curva Metanol Analista 2. | 95 |
| | Tabla 6.22. Curva Metanol Analista 3. | 96 |
| | Tabla 6.23. Curva Etanol Analista 1. | 97 |
| | Tabla 6.24 Curva Etanol Analista 2. | 97 |
| | Tabla 6.25 Curva Etanol Analista 3. | 97 |
| | Tabla 6.26 Curva Acetona Analista 1. | 98 |
| | Tabla 6.27 Curva Acetona Analista 2. | 99 |
| | Tabla 6.28. Curva Acetona Analista 3. | 99 |
| | Tabla 6.29 Concentración de Etanol mg/dL. | 100 |
| | Tabla 6.30 Curvas de Calibración de Etanol | 101 |
| | Tabla 6.31 Varianza Etanol | 103 |
| | Tabla 6.32 Cálculos Etanol | 103 |
| | Tabla 6.33 Cálculos Etanol | 104 |
| | Tabla 6.34 Cálculos Etanol | 106 |
| | Tabla 6.35 Cálculos Etanol | 107 |
| | Tabla 6.36 Cálculos Etanol | 108 |
| | Tabla 6.37 Cálculos Metanol | 109 |
| | Tabla 6.38 Cálculos Metanol | 111 |
| | Tabla 6.39 Cálculos Metanol | 111 |
| | Tabla 6.40 Cálculos Metanol | 112 |
| | Tabla 6.41 Cálculos Metanol | 114 |
| | Tabla 6.42 Cálculos Metanol | 115 |
| | Tabla 6.43 Cálculos Metanol | 116 |
| | Tabla 6.44 Cálculos Acetona | 117 |
| | Tabla 6.45 Cálculos Acetona | 119 |
| | Tabla 6.46. Cálculos Acetona | 119 |
| | Tabla 6.47. Cálculos Acetona | 120 |
| | Tabla 6.48. Cálculos Acetona | 122 |
| | Tabla 6.49. Cálculos Acetona | 123 |
| | Tabla 6.50. Cálculos Acetona | 124 |
| | Tabla 6.51. Curvas de calibración en matriz de Sangre. | 126 |
| | Tabla 6.52. Curvas de calibración en matriz de Orina. | 127 |
| | Tabla 6.53 Curvas de calibración en matriz de Agua | 128 |
| | Tabla 6.54. Tiempo de Presurización del vial | 132 |
| | Tabla 6.55. Temperatura de Calentamiento del vial | 137 |
| | Tabla 6.56. Agitación del vial | 142 |
| | Tabla 6.57. Tiempo de Calentamiento del vial | 148 |



| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|----------|---|---------|
| | Tabla 6.58. Inyecciones en la misma Septum | 154 |
| | Tabla 6.59. Volumen de muestra | 156 |
| | Tabla 6.60. Densidad de la sangre con y sin estándar | 158 |
| | Tabla 6.61. Degradación de la muestra en refrigeración. | 161 |
| | Tabla 6.62. Refrigeración de un estándar | 163 |
| | Tabla 6.63. Degradación de la muestra en refrigeración. | 166 |
| | Tabla 6.64. Resultados de Recuperación | 168 |
| | Tabla 6.65. % de Recuperación | 168 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|----------|--|---------|
| | Figura 1.1 Ciencias que originaron la criminalística. | 8 |
| | Figura 1.2 Áreas de la criminalística | 8 |
| | Figura 2.1 Compuestos presentes en bebidas alcohólicas | 12 |
| | Figura 2.2 Efectos, Absorción y Eliminación del Alcohol | 15 |
| | Figura 2.3 Múltiples factores que influyen en la concentración de etanol en el cuerpo. | |
| | Figura 2.4 Metabolismo del etanol | 16 |
| | Figura 2.5. Metabolismo Etanol - Metanol | 17 |
| | Figura 2.7. Posibles efectos del consumo prolongado de Etanol | 17 |
| | Figura 2.6 Efectos adversos del alcohol | 20 |
| | Figura 2.8. Influencia Alcohólica, signos y síntomas. | 21 |
| | Figura 2.9. Influencia legal de los resultados de alcoholemias. | 21 |
| | Figura 2.10 Muestras ingresadas en el laboratorio de química para estudios de alcohol | 23 |
| | Figura 2.11. Porcentaje de muestras positivas a etanol, metanol y acetona | |
| | Figura 2.12. Porcentaje de muestras positivas en el estudio de alcohol por edades | |
| | Figura 2.13 Muestras positivas a alcohol por Delegaciones. | 24 |
| | Figura 2.14 Métodos que indican la presencia del alcohol en sangre. | 25 |
| | Figura 2.15 Métodos clínicos de identificación de presencia de alcohol en sangre | 25 |
| | Figura 2.16 Métodos Bioquímicos para identificación de presencia de alcohol en sangre | 26 |
| | | 27 |
| | | 28 |
| | | 29 |



| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|----------|--|---------|
| | Figura 3.1 Línea del Tiempo de Cromatografía | 30 |
| | Figura 3.2. Separación Cromatográfica. | 31 |
| | Figura 3.3. Clasificación de la Cromatografía. | 32 |
| | Figura 3.4. Tipos de Cromatografía de Gases | 33 |
| | Fig. 3.5 Elución de componentes dentro de la columna | 34 |
| | Figura 3.6 Partes del cromatógrafo. | 35 |
| | Figura 3.7 Características del gas acarreador. | 36 |
| | Figura 3.8. Manómetros de los gases. | 37 |
| | Figura 3.9. Sistemas de inyección | 38 |
| | Figura 3.10 Rampa de Temperatura | 40 |
| | Figura 3.11 Características de un Detector Ideal | 40 |
| | Figura 3.12 Clasificación de Detectores | 41 |
| | Figura 3.13 Detector de Ionización de Flama FID | 42 |
| | Figura 3.14. Pantalla Principal de Software | 43 |
| | Figura 3.15. Headspace. | 44 |
| | Figura 3.16. Extracción en el Headspace | 45 |
| | Figura 3.17 Características del estándar interno | 47 |
| | Figura 3.18. Estándares de curva de calibración | 47 |
| | Figura 3.19. Cromatograma de curva de calibración con estándar interno | 48 |
| | Figura 3.20 Curvas de calibración método de estándar interno | 49 |
| | Figura 4.1 Definición de validación | 51 |
| | Figura 4.2 ¿Cuándo debe validarse? | 53 |
| | Figura 4.3 Parámetros de validación | 54 |
| | Figura 4.4 Interferencia | 55 |
| | Figura 4.5 Curva de calibración | 57 |
| | Figura 4.6 Regresión de la curva de calibración | 59 |
| | Figura 4.2 Sensibilidad | 60 |
| | Figura 5.1 Rampa de Temperatura | 67 |
| | Figura 6.1. Tiempos de Retención compuestos principales | 84 |
| | Figura 6.2. Repetibilidad del etanol | 87 |
| | Figura 6.3. Repetibilidad del metanol | 87 |
| | Figura 6.4. Repetibilidad de la acetona | 88 |
| | Figura 6.5. Curvas de etanol preparadas en días diferentes. | 91 |
| | Figura 6.6. Curvas de metanol preparadas en días diferentes. | 93 |
| | Figura 6.7. Curvas de Acetona preparadas en días diferentes. | 95 |
| | Figura 6.8. Curva de metanol diferentes analistas | 96 |
| | Figura 6.9. Curva de etanol diferentes analistas | 98 |



| No TABLA | NOMBRE | PÁGINA. |
|----------|--|---------|
| | Figura 6.10.. Curva de acetona diferentes analistas | 99 |
| | Figura 6.11. Comparativo de muestras por varios analitas. | 100 |
| | Figura 6.12. Curva de calibración del etanol | 102 |
| | Figura 6.13. Curva de calibración del etanol. | 108 |
| | Figura 6.14. Curva de calibración metanol | 110 |
| | Figura 6.15. Rango de trabajo del Metanol | 116 |
| | Figura 6.16. Curva de calibración acetona | 118 |
| | Figura 6.17 Curva de calibración de la acetona. | 124 |
| | Figura 6.18 Sensibilidad curvas de calibración. | 125 |
| | Figura 6.19. Curva de calibración metanol en matrices diferentes | 129 |
| | Figura 6.20. Curva de calibración etanol en matrices diferentes | 130 |
| | Figura 6.21. Curva de calibración acetona en matrices diferentes | 131 |
| | Figura 6.22. Presurización Metanol | 132 |
| | Figura 6.23. Presurización Etanol | 134 |
| | Figura 6.24. Presurización Acetona. | 135 |
| | Figura 6.25 Calentamiento del vial Metanol | 138 |
| | Figura 6.26. Calentamiento del vial Etanol | 139 |
| | Figura 6.27. Calentamiento del Acetona. | 141 |
| | Figura 6.28. Agitación del vial Metanol | 143 |
| | Figura 6.29 Agitación del vial Etanol | 144 |
| | Figura 6.30 Agitación del vial Acetona | 146 |
| | Figura 6.31 Tiempo de Calentamiento del vial Metanol | 149 |
| | Figura 6.32 Tiempo de Calentamiento del vial Etanol | 150 |
| | Figura 6.33 Tiempo de Calentamiento del vial Acetona | 152 |
| | Figura 6.34. Inyecciones de septum Metanol | 155 |
| | Figura 6.35. Inyecciones de septum Etanol | 155 |
| | Figura 6.36. Inyecciones de septum Acetona | 156 |
| | Figura 6.37 Volumen de muestra Etanol. | 157 |
| | Figura 6.38. Densidad real de la sangre | 159 |
| | Figura 6.39. Densidad real de la sangre con el estándar interno. | 159 |
| | Figura 6.40. Comparación de densidades de sangre y Sangres con estándar Interno. | |
| | Figura 6.41. Degradación de la muestra en refrigeración. | |
| | Figura 6.42. Refrigeración Etanol | |
| | Figura 6.43. Refrigeración Metanol | |
| | Figura 6.44 Refrigeración Acetona | |
| | Figura 6.45. Degradación muestras Etanol | |
| | | 160 |
| | | 162 |
| | | 164 |
| | | 164 |
| | | 165 |
| | | 167 |



GLOSARIO DE TÉRMINOS.

| | |
|-------------------------------|---|
| Tóxico | La sustancia que ingerida, inhalada, absorbida, aplicada, inyectada o desarrollada en el interior del organismo es capaz, por sus propiedades químicas o físicas, de provocar alteraciones organofuncionales e incluso la muerte. |
| Toxicología | Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales Alteraciones y los medios para contrarrestarlas |
| Precursor Químico | Es una sustancia indispensable o necesaria para producir otra mediante una reacción química. Son los compuestos químicos que constituyen una primera etapa en un proceso químico y que actúan como sustrato en las etapas posteriores |
| Alcaloide | Aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados, generalmente, a partir de aminoácidos. Los alcaloides verdaderos derivan de un aminoácido, son por lo tanto nitrogenados. Todos los que presentan el grupo funcional amina o imina son básicos. |
| Veneno | Es cualquier sustancia química dañina, ya sea sólida, líquida o gaseosa, que puede producir una enfermedad, lesión, o que altera las funciones del sistema digestivo y reproductor cuando entra en contacto con un ser vivo, incluso provocando la muerte |
| Metabolito | Un metabolito es cualquier molécula utilizada, capaz o producida durante el metabolismo. Así, dada la ruta metabólica El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo. |
| Alcoholemia | Determinación del grado de alcohol en sangre |
| Alcohol Deshidrogenasa | Es una enzima descubierta a mediados de los años 1960 en la mosca <i>Drosophila melanogaster</i> y es un dímero con un peso molecular de 80 kda. Las alcohol deshidrogenasas son un grupo de siete enzimas que están frecuentemente presentes en muchos organismos y facilitan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de NAD a NADH. La reacción catalizada es: $\text{Alcohol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Aldehído o Cetona} + \text{NADH}$ |
| Citosol | Es la parte soluble del citoplasma de la célula. Está compuesto por todas las unidades que constituyen el citoplasma excepto los orgánulos (proteínas, iones, glúcidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, metabolitos diversos, etc.). Representa aproximadamente la mitad del volumen celular. |



| | |
|-------------------------------|---|
| Catalasa | <p>La catalasa es una enzima que se encuentra en organismos vivos y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en <u>oxígeno</u> y agua.</p> $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ |
| Peroxisomas | <p>Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos muy comunes en forma de vesículas que contienen oxidasas y catalasas. Estas enzimas cumplen funciones de detoxificación celular</p> |
| Citoplasmáticos | <p>Es parte del nucleo celular</p> |
| Oxidasas | <p>Una oxidasa es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H₂O) o a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las oxidasas son una subclase de las oxidorreductasas.</p> |
| Molestias epigástricas | <p>Dolor en la parte superior del estómago, que suele ser quemante o lacerante y es típico de la úlcera. En ocasiones, se trata de un dolor leve pero continuo y en muchos pacientes, no está bien definido y se puede describir como presión abdominal o sensación de hambre.</p> |
| Molestias cefaleas | <p>Es un dolor o molestia en la cabeza, el cuero cabelludo o el cuello, generalmente asociado con tensión de los músculos en estas áreas</p> |
| Métodos cruentos | <p>Tipo de métodos en el cual su análisis recae en el la matriz de sangre</p> |
| Métodos Incruentos | <p>Tipo de métodos en el cual su análisis recae en una matriz de biológicas</p> |