

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Evelynn Rocio Gonzalez Arriaga

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo de 2008

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL EN
SANGRE, POR CROMATOGRFÍA DE GASES DOBLE COLUMNA CON
DETECTOR DE IONIZACIÓN DE FLAMA

Informe de Tesis

Presentado por

Evelynn Rocio Gonzalez Arriaga

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, Mayo de 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda Beatriz Eugenia Batrez de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

DEDICATORIA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA, POR PERMITIRME DESCUBRIR ESTE MARAVILLOSO MUNDO DE LA QUÍMICA FARMACÉUTICA.

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS:** Por ser siempre mi fuente de luz y sabiduría.
- A LA VIRGEN MARÍA:** Por ser mi guía y acompañante en el camino.
- A MIS PADRES:** Ángel Francisco Gonzalez Montenegro y Blanca Ninette Arriaga de Gonzalez, por que me han enseñado con amor y dedicación que puedo lograr lo que me propongo y sin ustedes papitos esto no hubiera sido posible. Otra Misión Cumplida !!.
- A MIS HERMANOS:** Guillermo Francisco Gonzalez Arriaga, porque haz sido mi ejemplo, mi apoyo y mi consejero toda la vida y Pierina Cardona de Gonzalez, los quiero mucho.
- A MI SOBRINO:** Edgar Guillermo Gonzalez Cardona, porque es una alegría más tenerte con nosotros.
- A PEDRO GUTIÉRREZ VASQUEZ:** Por tu motivación, apoyo y ejemplo en esta etapa de mi vida, te amo mi amor.
- A MIS ABUELITOS:** Guillermo Arriaga Régil (Q.E.P.D.), Blanca Portillo de Arriaga y María Luz Montenegro por sus consejos y cariño brindados.
- A TODA MI FAMILIA:** Porque son una parte importante en mi vida.
- A LICDA. MYRIAM DE MONROY:** Por sus conocimientos y ayuda prestados en este trabajo de tesis.
- AL PERSONAL DE LA UNIDAD DE LABORATORIOS DE CRIMINALÍSTICA DEL INACIF, ESPECIALMENTE A LA SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. RESUMEN	1 - 2
II. INTRODUCCIÓN	3 - 4
III. ANTECEDENTES.....	5
a. métodos clínicos.....	6 - 7
b. métodos bioquímicos.....	8 - 11
c. validación de métodos analíticos.....	12 - 13
IV. JUSTIFICACIÓN.....	14
V. OBJETIVOS.....	15
VI. HIPÓTESIS.....	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
a. instrumentos y cristalería.....	17 - 18
b. reactivos y soluciones	19 - 32
c. equipo.....	33
d. condiciones del equipo.....	34
e. preparación de la curva de calibración.....	35 - 37
f. preparación de los controles positivos.....	38 - 39
g. preparación de la muestra.....	39 - 41
h. evaluación de parámetros de desempeño.....	42 - 45
i. cálculos.....	46 - 47
VIII. RESULTADOS.....	48 - 61
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62 - 65
X. CONCLUSIONES.....	66 - 67
XI. RECOMENDACIONES.....	68
XII. REFERENCIAS.....	69 - 73
XIII. ANEXOS.....	74

I. RESUMEN

El etanol, componente principal de las bebidas embriagante, es una de las drogas más antiguas conocidas por el hombre y la más empleada por todas las culturas. Debido a su indiscriminado uso es uno de los principales tóxicos causante de hechos delictivos.

Existen diversos métodos empleados en la detección del etanol, pero es la Cromatografía de Gases idealmente con doble columna y detector de ionización de flama, la técnica de primera elección que permite la identificación y cuantificación de alcohol etílico y otros alcoholes y cetonas líquidos altamente volátiles, en el campo forense, en donde la muestra líquida es convertida en vapor previo su ingreso al inyector del cromatógrafo.

Actualmente, el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala en su sección de toxicología utiliza la técnica mencionada anteriormente en el análisis de alcohol en sangre, es por ello que surge la necesidad de contar con un método que proporcione datos reproducibles y confiables.

Por lo tanto se establecieron parámetros de desempeño que evalúan la calidad del método, para poder determinar la validez del mismo, los cuales fueron: exactitud, que expresa la proximidad entre los resultados obtenidos en las pruebas de ensayo y el valor verdadero; especificidad, que proporciona la capacidad del método de identificar al analito en presencia de otras sustancias; linealidad, predice la relación entre los valores obtenidos y los valores calculados teóricamente de manera proporcional; límite de cuantificación, establece la menor concentración en la que el analito es identificado y cuantificado con exactitud y precisión; repetibilidad, indica el grado de concordancia de los resultados entre una serie de mediciones.

Para la cual se utilizaron muestras en perfecto estado (no putrefactas, colocadas en envase hermético, provistas de anticoagulante), previo al análisis de estas y como en todo procedimiento de cuantificación, se realizó el proceso de calibración, utilizando para ello soluciones estándares de etanol, metanol, isopropanol y acetona, a concentraciones que se esperan obtener al analizar las muestras (0.5, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 g/l) las cuales fueron tomadas de referencia y analizadas repetidas veces para determinar el porcentaje de recuperación, la media, la desviación estándar y el coeficiente de determinación.

Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran en un intervalo no menor a 95% y no mayor a 105% de la concentración del analito, se estableció como valor máximo de aceptación la media aritmética ± 2 veces la desviación estándar para cada serie de datos, en donde los valores muestran una dispersión poco significativa y un coeficiente de variación que indica poca variabilidad entre los resultados y los valores teóricos, con medias altamente representativas.

La relación entre la concentración establecida y el valor del ensayo obtenido expresa linealidad, con un coeficiente de correlación (r) de: 1 para cada uno de los analitos de estudio.

Es por ello que el método por Cromatografía de Gases con Doble columna y Detector de ionización de Flama posee las propiedades y características que indican su grado de calidad; por lo tanto es un método válido para la cuantificación y determinación de alcohol en sangre.

II. INTRODUCCIÓN

El alcohol etílico conocido popularmente como alcohol, es el componente fundamental de las bebidas embriagantes, el consumo permitido y socialmente aceptado lo convierte en una sustancia de abuso utilizada en la mayor parte de las culturas y épocas así como el tóxico universalmente más ingerido, lo cual origina una problemática que, en el caso de abuso en su consumo trasciende a lo social, sanitario, laboral y familiar. ⁽¹⁾

Las bebidas embriagantes son productos que pueden estar presentes en las consideraciones médico-legales de numerosos procedimientos judiciales culposos, por conductas imprudentes, o ser facilitadores de la comisión dolosa de ilícitos por el estado de embriaguez que causan en el consumidor, es por ello la importancia desde el punto de vista toxicológico que radica en establecer el grado de alcoholismo en individuos que han ingerido bebidas alcohólicas y que se encuentran enrolados en casos legales para esclarecer si la sustancia en cuestión pudo ser la responsable del suceso.

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas a disposición del toxicólogo que abarcan desde los clásicos métodos no instrumentales como las reacciones colorimétricas y tests microcristalinos, hasta los métodos instrumentales más sofisticados capaces de medir propiedades físicas o químicas que permiten identificación y cuantificación del alcohol etílico ⁽⁴⁾ y otros alcoholes o cetonas líquidos, altamente volátiles que se ha determinado son consumidos como bebidas embriagantes; en el área forense los métodos clínicos (pruebas de consumo reciente de alcohol, pruebas de la pérdida de control de las facultades), y algunos métodos bioquímicos que emplean reacciones de oxidación-reducción (Truhaut-Boudéne, Newman, pentóxido de yodo, Nicloux) son aceptables como métodos presuntivos o de descarte; si embargo actualmente es la cromatografía de gases el método de elección al ser altamente específico para el etanol ⁽³⁾ y por excelencia aceptado por su exactitud

y precisión, por academias y organizaciones que velan por el cumplimiento de normas científicas en laboratorios analíticos que sirven a sistemas de justicia.

Es por ello que se presenta la necesidad de contar con un método que proporcione datos reproducibles y confiables en el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala en su Sección de Toxicología por lo que se pretende validar el método de determinación de alcohol en sangre y otros fluidos por cromatografía de gases doble columna con detector de ionización de flama (FID) que se utiliza actualmente.

III. ANTECEDENTES

En La Universidad de San Carlos de Guatemala se encuentran varias tesis ad gradum, referentes a los métodos de determinación de alcohol en sangre, las cuales presentan un enfoque de acuerdo a la conveniencia de la exactitud con que se requiere obtener los resultados, entre los cuales se pueden mencionar:

“COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DOSIFICAR ALCOHOL EN SANGRE” presentado por la estudiante Edna Rubio en 1981, en donde se concluye que existen diferentes métodos que presentan resultados precisos y exactos para la cuantificación de alcoholemia, entre ellos, el método calorimétrico de Irwing Sunshine, el método nitrocromico o el método enzimático.

“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DIRECTOS DE CROMATOGRAFÍA GAS – LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN SANGRE” presentado por la estudiante Lys Morales Estrada en 1994, en donde concluye que el método colorimétrico de Irwing Sunshine es preciso, exacto, más económico, rápido, sencillo y requiere menor cantidad de muestra.

“VALIDACIÓN DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO, COMO METODOLOGIA ALTERNA, PARA LA MEDICIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE” presentado por la estudiante Bárbara Toledo en el año 2000, en donde concluye que el método no posee la linealidad necesaria para ser utilizado como método alternativo al de Cromatografía de Gases con detector de llama FID para la determinación de alcohol en sangre, ya que no es preciso, exacto ni reproducible.

Entre otros documentos también podemos mencionar:

Protocolo No. DTC 10,058 del Departamento Técnico Científico del Ministerio Público, en el cual se determina que el empleo del Cromatógrafo de Gases con Detector FID es determinante para un pronunciamiento pericial confiable.

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:

MÉTODOS CLÍNICOS ^(3,4)

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:

- **PRUEBAS DE CONSUMO RECIENTE DE ALCOHOL:**

La única prueba práctica es el olor a líquidos alcohólicos en el aliento y en las materias vomitadas en su caso. Presenta las siguientes salvedades:

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, 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.

- **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 PATOLOGICOS CAPACES DE SIMULAR UNA INTOXICACIÓN ALCOHOLICA:**

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.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS ^(2, 4)

Consiste en la dosificación de alcohol en la sangre o en los fluidos orgánicos, de donde deducir la impregnación alcohólica del organismo. Estos métodos pueden dividirse en incruentos y cruentos:

MÉTODOS INCRUENTOS: tienen por objeto eliminar las objeciones que se han planteado a la extracción de la muestra de sangre la imposibilidad de obtenerla si no se cuenta con el consentimiento del sujeto. Estos métodos recaen en la orina, la saliva y el aire exhalado. La determinación de alcohol en el aire exhalado se basa en que a partir de 15 minutos después de haber ingerido una

bebida alcohólica, la concentración de alcohol en el aire exhalado refleja la concentración alcohólica de la sangre circulante a través de los pulmones.⁽⁴⁾

MÉTODOS CRUENTOS: El análisis recae sobre la sangre. Según la cantidad necesaria de ésta se distinguen macrométodos (10 ml), semi-micrométodos (2ml) y micrométodos (décimas de mililitro).

En cualquier caso, para la extracción de sangre, la desinfección se hará siempre con líquidos no alcohólicos, ya que de lo contrario se contaminará gravemente la muestra hasta invalidar el resultado del análisis. ^(4, 8, 10)

Dentro de los antiguos métodos bioquímicos se encuentran los de oxidoreducción tales como:

- **MÉTODO DE WIDMARK:** ⁽³²⁾

Este micrométodo desarrolla una técnica de destilación y oxidación simultánea con volatilización del analito (etanol) por efecto de temperatura, con una mezcla sulfocrómica (dicromato de potasio con ácido sulfúrico). Posteriormente se procede a la titulación yodométrica del dicromato de potasio en exceso.

- **MÉTODO DE TRUHAUT –BOUDÉNE:** ⁽⁴⁾

Es un semi-micrométodo basado en la reducción de un reactivo nitrocromico por el alcohol destilado de la sangre; la reducción tiene lugar en frío, lo que permite que se desarrolle de manera uniforme.

- **MÉTODO DE NEWMAN:** ⁽⁹⁾

Es un micrométodo rápido, no precisa de ningún aparato especial y se practica en 1 ml del líquido, el alcohol es destilado en un erlenmeyer, una ligera corriente

de aire lleva los vapores etílicos a una mezcla sulfocrómica, la oxidación del etanol es llevada hasta el estado de ácido acético.

- **MÉTODO DE HAGGARD Y GREENBERG (pentóxido de yodo): (18)**

El alcohol mas un poco de agua de la muestra, es vaporizado y hecho pasa pr un tubo que contiene pentóxido de yodo (I_2O_5) sólido calentado a $150^\circ C$. el alcohol es oxidado y la reacción forma una mezcla de I_2 y HI que son determinados por titulación con tiosulfato seguido de una titulación con tiosulfato con un estándar base.

Los métodos mencionados anteriormente se diferencian entre sí por la cantidad de sangre que precisan para el análisis, siendo su fundamento similar. Son métodos sometidos a amplio margen de error, en relación a los modernos métodos cromatográficos. ⁽⁵⁾

- **MÉTODO DE NICLOUX O DEL DICROMATO (2,9)**

Es un macrométodo se basa en la dosificación del alcohol sobre una alícuota del producto de la destilación por oxidación con mezcla sulfocrómica en caliente.



En un matraz de destilación de se colocan 10 ml de sangre, una pequeña cantidad de ácido pícrico y 65 ml de agua. Se destila recogiendo sobre 5 ml de ácido sulfúrico 3 N hasta un volumen de 40 ml. Se toman 5 ml del destilado, se agregan 6 ml de ácido sulfúrico concentrado y se titula con solución de

dicromato de potasio 19 por mil hasta viraje del color verde azulado a verde amarillento, manteniendo la temperatura del tubo de reacción en (90-100°C). Es importante que la titulación se realice a (90-100°C), dado que a temperaturas menores (60°C) el etanol se oxida a su correspondiente aldehído (acetaldehído).

Expresión de resultados

Alcoholemia (ml etanol/1000 ml sangre) $4 \times \text{Volumen Cr}_2\text{O}_4\text{K}_2$

- **MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES** *(2, 4, 5, 13, 18, 19)*

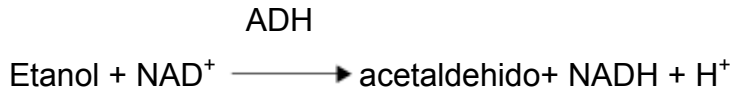
En la actualidad es el método más aceptado y se encuentra avalado por las publicaciones científicas internacionales. ⁽⁵⁾ Trabaja en la identificación y cuantificación de etanol y otros alcoholes o cetonas en muestras de sangre, utilizando la técnica del espacio cabeza “head space” para separar los analitos de la matriz, previo a la inyección en el cromatógrafo.

La rapidez, especificidad y sencillez de la técnica justifican que esté método se haya impuesto en la dosificación del alcohol etílico en la sangre. Es un método de gran especificidad que no interfieren otras sustancias reductoras. En la actualidad el método se ha simplificado considerablemente utilizando el espacio de cabeza.

A partir del cromatograma resultante se obtienen las áreas bajo la curva del etanol y del patrón interno. Se grafica concentración de etanol en sangre vs. $A_{\text{EtOH}}/A_{\text{PI}}$, en donde A_{EtOH} es el área bajo la curva del pico de etanol y A_{PI} es el área bajo la curva del patrón interno.

- **MÉTODO ENZIMÁTICO (alcohol deshidrogenasa)/ UV:** ^(4,5)

La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) actúa como catalizador en una reacción de transporte de H, durante la cual el alcohol etílico se transforma por deshidrogenación en acetaldehído



El acetaldehído formado puede ser desplazado totalmente hacia la derecha en condiciones alcalinas atrapando el acetaldehído formado.

El acetaldehído es oxidado en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al DH) cuantitativamente a ácido acético



Terminada la reacción, se puede medir fotométricamente la cantidad de forma hidrogenada del aceptor específico NADH gracias a su fuerte poder absorbente de luz de 340 y 386 nm.

- **MÉTODO PROPUESTO POR IRWING SUNSHINE:** ^(8,18)

Es un método de destilación directa, y cada porción del destilado es sometido a lectura en el espectrofotómetro. Deben de tomarse en cuenta sustancias que interfieren en la lectura como el metanol, isopropanol, formaldehído y paraldehído.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico se define como un proceso de evaluación sistemático para demostrar que el método cumple con los requisitos necesarios para el uso que se le va a otorgar, estos requisitos se traducen de manera práctica en la determinación de una serie de parámetros de desempeño analítico.

La validación implica que el comportamiento del método se conoce y que se puede evaluar la incertidumbre en el valor obtenido, de modo que el usuario puede estar seguro del grado de confianza que pueda tener el resultado. Esta debería aplicarse cuando se requiere incorporar una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio, también cuando se comparan dos metodologías o bien cuando se está desarrollando un método o técnica nuevos.⁽²⁰⁾

PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO:

- **PRECISIÓN:**

Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen tres forma de determinación: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.⁽²¹⁾

- **EXACTITUD:**

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el método y el valor verdadero.⁽²¹⁾

- **ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD:**

Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.⁽²²⁾

- **LÍMITE DE DETECCIÓN:**

Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. ⁽²¹⁾

- **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:**

Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro para el análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestras y se usa particularmente para la determinación de impurezas y productos de degradación. ⁽²¹⁾

- **LINEALIDAD:**

Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestra en un intervalo dado. ⁽²¹⁾

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido al alto índice de hechos delictivos efectuados bajo efectos producidos por consumo de alcohol y la alta incidencia de consumo de bebidas alcohólicas en Guatemala, es importante que el análisis y cuantificación del alcohol en sangre, que se realice en el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala a través de su Sección Toxicológica sea efectuado empleando tecnología, actualizada, validada y fundamentada en ciencia, es por ello que la Cromatografía de Gases, idealmente con doble columna y con empleo de un detector de ionización de Flama FID y automuestreador de espacio de cabeza (Head Space), debe ser utilizada, dado que con ella se pueden obtener datos confiables y reproducibles para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

De tal manera que el trabajo de validación del método y el respaldo de este estudio por autoridades del INACIF y docentes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia es de mucha valía dentro del ámbito científico nacional.

V. OBJETIVOS

1. GENERAL:

Validar el método de determinación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases, doble columna y detector de Ionización de Flama FID

2. ESPECÍFICOS:

- Determinar el grado de repetibilidad que presenta el método de cromatografía de gases para la cuantificación de alcohol en sangre.
- Determinar la exactitud que presenta el método de cromatografía de gases para la cuantificación de alcohol en sangre.
- Determinar la Linealidad que presenta el método de cromatografía de gases para la cuantificación de alcohol en sangre.
- Determinar la especificidad que presenta el método de cromatografía de gases para la cuantificación de alcohol en sangre.
- Determinar el límite de cuantificación que presenta el método de cromatografía de gases para la cuantificación de alcohol en sangre.

IV. HIPOTESIS

La determinación cuantitativa de alcohol etílico en sangre y otros fluidos por el método de Cromatografía de gases, doble columna y detector de ionización a la flama FID proporciona datos reproducibles y reales.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. UNIVERSO

Método de Cromatografía de Gases, Doble Columna con detector de ionización de Flama.

2. MUESTRA

Se utilizan los resultados del análisis de 10 muestras de sangre escogidas al azar, que ingresan al INACIF.

3. MATERIALES

3.1 INSTRUMENTOS Y CRISTALERÍA

- A. Guantes de látex.
- B. Gradilla.
- C. Balón aforado de 500 mL con su respectivo tapón.
- D. Balones aforados de 10 mL con sus respectivos tapones.
- E. Tubo vacutainer estéril de 5 mL con K3EDTA, tapa morada.
- F. Viales para utilizar en headspace de vidrio de 10 mL.
- G. Arandelas de aluminio con septa de TFE/silicona de 20 mm.
- H. Marcador indeleble.
- I. Pipetas de émbolo de volumen variable tipo Transferpette, de 10-100 uL y de 100 -1000 uL.
- J. Tips amarillos para medición de 100 uL y tips azules para medición de 100 a 1000 uL.
- K. Encapsulador para arandelas de 20 mm.
- L. Desencapsulador para arandelas de 20 mm.
- M. Dispensador paso manual de volumen variable con capacidad de 50.00 ml.

- N. Punta de desplazamiento directo de 1.25 ml.
- O. Punta de desplazamiento directo de 50.0 ml.
- P. Beakers de 250 mL y 100 mL
- Q. Pipeta de émbolo de volumen fijo de 50 uL, tipo Transferpette,
- R. Espátulas.
- S. Pizeta.
- T. Embudo.
- U. Gasa simple esterilizada 100% algodón, Tipo VII de 7.5 x 5.0 cms.
- V. Pipetas de 1mL
- W. Canasta plástica pequeña.
- X. Cilindro de aire comprimido UN 1002 gas no inflamable
- Y. Cilindros de Nitrógeno, Grado 5.0 UHP (99.999%). UN 1066 gas no inflamable
- Z. Sangre humana libre de alcohol y sustancias volátiles (control negativo).
- AA. Trampas de nitrógeno, Modelo RMSN-4
- BB. Columna de Cromatografía de gases de alta resolución DB-ALC 1 de 30 metros de longitud, 0.53 mm de diámetro interno y recubrimiento de 3 um.
- CC. Columna de Cromatografía de gases de alta resolución DB-ALC 2 de 30 metros de longitud, 0.53 mm de diámetro interno y recubrimiento de 2 um.
- DD. Y de cuarzo desactivada.
- EE. Detector de ionización de llama FID 1A
- FF. . Detectores de ionización de llama FID 2B
- GG. Software Microsoft® Windows NT®.Workstation 4.0.
- HH. Software Microsoft® Windows® XP Professional.

3.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES ⁽²³⁾

1. 1-propanol para cromatografía de gases
2. Metanol para cromatografía de gases

3. Etanol para cromatografía de gases
4. Isopropanol para cromatografía de gases
5. Acetona para cromatografía de gases
6. Sulfato de amonio ACS, grado reactivo, pureza $\geq 99.5\%$
7. Ditionito de sodio, $\geq 87\%$
8. Agua desmineralizada

Todos los reactivos deben cumplir especificaciones de conformidad con la Sociedad Americana de Química (American Chemical Society, ACS) y/o las especificaciones de reactivos según la USP.

- **SOLUCIONES**

1. Solución de estándar interno de 1-propanol al 0.02%
2. Soluciones stock al 1g/10ml de metanol, etanol, acetona e isopropanol para la curva de calibración
3. Soluciones de trabajo (workings) de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 g/L de metanol, etanol, acetona e isopropanol para la curva de calibración
4. Soluciones stock al 1g/10ml de etanol, metanol, isopropanol y acetona para los controles positivos
5. Solución de trabajo para “control positivo bajo” (QC1) de 0.2g/L de acetona, metanol, etanol e isopropanol
6. Solución de trabajo para “control positivo medio” (QC2) de 2.5 g/L de metanol y etanol.
7. Solución de trabajo para “control positivo alto” (QC3) de 4.5 g/L de etanol

- **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

1. *Estándar interno de 1-propanol al 0.02%*

- a. Sacar del refrigerador el 1-propanol. Esperar por lo menos 30 minutos.

- b.** Medir aproximadamente 250 mililitros de agua desmineralizada y servirlos en un balón aforado de 500 mL.
- c.** Pesar en la balanza analítica 66.0 gramos de sulfato de amonio en beaker de 250 mL previamente tarado.
- d.** Pesar en la balanza analítica 8.7 gramos de ditionito de sodio en beaker de 100 mL previamente tarado.
- e.** Registrar los pesos de las sustancias en la bitácora correspondiente.
- f.** Trasvasar cuidadosamente agregando agua y agitando, el sulfato de amonio y ditionito de sodio previamente pesados, al balón con agua destilada.
- g.** Agitar hasta que se disuelvan completamente las sales.
- h.** Medir 125 μ L de 1-propanol con punta de desplazamiento directo de 1.25 mL, colocando el dispensador manual en la posición 5 y agregarlo al balón que contiene las sales.
- i.** Aforar con agua desmineralizada a un volumen de 500 mL.
- j.** Agitar uniformemente.
- k.** Trasvasar a un frasco ámbar rotulado con la siguiente información: estándar interno de 1- propanol, concentración, fecha de preparación, fecha de vencimiento (máximo 30 días después de la preparación) e iniciales del perito que lo preparó.

- l.* Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

- m.* Almacenar en refrigeración entre 4 a 8 grados centígrados. La solución de estándar interno de 1-propanol debe prepararse mínimo cada 30 días. Cada vez que se prepare una solución de estándar interno se analizará para verificar que la respuesta cromatográfica se encuentre dentro de los parámetros de área establecidos. (ver protocolos DTC -10047 y DTC-10048)

- n.* Observaciones: en caso de alta demanda para análisis de alcohol y volátiles puede prepararse 1 litro de solución siguiendo el procedimiento anterior y duplicando las cantidades en balón de 1000 mL.

Los criterios que enfatiza la selección de un estándar interno, en este caso n-propanol, son:

- No debe encontrarse en la matriz (muestra) de análisis. ⁽³³⁾
- Las propiedades químicas del estándar interno deben ser similares a las propiedades químicas del componente a ser cuantificado o separado. ⁽³³⁾
- El tiempo de retención del estándar interno debería estar en un rango medio de el tiempo de retención de los componentes que serán separados. ⁽³³⁾
- El estándar interno debe tener una línea base de separación de todos los componentes de la mezcla. ⁽³³⁾

Al mismo tiempo la correcta selección del estándar interno garantiza la detección efectiva del equipo, ya que debe ser agregado en la misma proporción (concentración conocida) a las soluciones y muestras a analizar por el mismo método. ⁽³⁵⁾

2. Preparación de las soluciones Stock de 1g/10ml para la curva de calibración

Solución stock de acetona al 1g/10ml .

- i. Sacar del refrigerador la acetona. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.004 gramos de acetona (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

Solución stock de etanol de 1g/10ml:

- i. Sacar del refrigerador el etanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.

- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.001 gramos de etanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

Solución stock de isopropanol de 1g/10ml:

- i. Sacar del refrigerador el isopropanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.005 gramos de isopropanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.

- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

Solución stock de metanol de 1g/10ml:

- i. Sacar del refrigerador el metanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.002 gramos de metanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

3.Preparación de las soluciones de trabajo (workings) para la curva de calibración

- a.** Sacar del refrigerador las soluciones stock de acetona, metanol, etanol e isopropanol de 1g/10ml. Esperar por lo menos 30 minutos.
- b.** Disponer de seis (06) balones aforados de 10mL con tapón, rotular cada uno de la siguiente manera: 0.5g/L, 1.0g/L, 2.0g/L, 3.0g/L, 4.0g/L y 5.0g/L, fecha de preparación y analista que preparó.
- c.** Servir aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada en cada balón.
- d.** Preparación del Working 0.5g/L: en el balón aforado identificado como 0.5g/L, agregar con pipeta de volumen fijo de 50 μ L en el siguiente orden:
 - i. 50 μ L de la solución stock de isopropanol
 - ii. 50 μ L de la solución stock de etanol
 - iii. 50 μ L de la solución stock de metanol
 - iv. 50 μ L de la solución stock de acetona
 - v. Aforar a 10mL con agua desmineralizada
 - vi. Mezclar por inversión
 - vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
 - viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

e. Preparación del Working 1.0g/L: en el balón aforado identificado como 1.0g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 100 μ L, en el siguiente orden:

- i. 100 μ L de la solución stock de isopropanol
- ii. 100 μ L de la solución stock de etanol
- iii. 100 μ L de la solución stock de metanol
- iv. 100 μ L de la solución stock de acetona
- v. Aforar a 10mL con agua desmineralizada
- vi. Mezclar por inversión
- vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
- viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

f. Preparación del Working 2.0 g/L: en el balón aforado identificado como 2.0g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 100 μ L, en el siguiente orden:

- i. 200 μ L de la solución stock de isopropanol
- ii. 200 μ L de la solución stock de etanol
- iii. 200 μ L de la solución stock de metanol
- iv. 200 μ L de la solución stock de acetona
- v. Aforar a 10 mL con agua desmineralizada
- vi. Mezclar por inversión
- vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
- viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

g. Preparación del Working 3.0g/L: en el balón aforado identificado como 3.0g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 100 μ L, en el siguiente orden:

- i. 300 μ L de la solución stock de isopropanol
- ii. 300 μ L de la solución stock de etanol
- iii. 300 μ L de la solución stock metanol
- iv. 300 μ L de la solución stock acetona
- v. Aforar a 10 mL con agua desmineralizada
- vi. Mezclar por inversión
- vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
- viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

h. Preparación del Working 4.0g/L: en el balón aforado identificado como 4.0g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 100 μ L, en el siguiente orden:

- i. 400 μ L de la solución stock de isopropanol
- ii. 400 μ L de la solución stock de etanol
- iii. 400 μ L de la solución stock de metanol
- iv. 400 μ L de la solución stock de acetona
- v. Aforar a 10 mL con agua desmineralizada
- vi. Mezclar por inversión
- vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
- viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

- i. Preparación del Working 5.0g/L: en el balón aforado identificado como 5.0g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 100 μ L, en el siguiente orden:
 - i. 500 μ L de la solución stock de isopropanol
 - ii. 500 μ L de la solución stock de etanol
 - iii. 500 μ L de la solución stock de metanol
 - iv. 500 μ L de la solución stock de acetona
 - v. Aforar a 10 mL con agua desmineralizada
 - vi. Mezclar por inversión
 - vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
 - viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

4. Preparación de las soluciones stock al 1g/10ml para los controles positivos

- a. Solución stock de acetona al 1g/10ml para control positivo.
 - i. Sacar del refrigerador la acetona. Esperar por lo menos 30 minutos.
 - ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
 - iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
 - iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
 - v. Pesar en la balanza analítica 1.004 gramos de acetona (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
 - vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
 - vii. Mezclar por inversión

- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

b. Solución stock de isopropanol al 1g/10ml para control positivo.

- i. Sacar del refrigerador el isopropanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.005 gramos de isopropanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.

- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

c. Solución stock de etanol al 1g/10ml para control positivo

- i. Sacar del refrigerador el etanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.001 gramos de etanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

d. Solución stock de metanol al 1g/10ml para control positivo

- i. Sacar del refrigerador el metanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- ii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración
- iii. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- iv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- v. Pesar en la balanza analítica 1.002 gramos de metanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- vi. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- vii. Mezclar por inversión
- viii. Trasvasar a un tubo con tapadera de rosca limpio con capacidad de 10 mL.
- ix. Rotular con nombre de la solución, analista y fecha de preparación.
- x. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de quince días.
- xi. Registrar el peso de las sustancia en la bitácora correspondiente.
- xii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

5. Preparación de las soluciones de trabajo (workings) para los controles positivos

- a.** Sacar del refrigerador las soluciones stock de acetona, metanol, etanol e isopropanol al 10% para controles positivos. Esperar por lo menos 30 minutos.
- b.** Disponer de tres balones aforados de 10mL con tapón, rotular cada uno de la siguiente manera: control positivo de 0.2g/L, 2.5g/L y 4.5g/L, fecha de preparación y analista que preparó.

- c.** Servir aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada en cada balón.
- d.** Preparación del Working de “control positivo bajo” 0.2g/L (QC1): en el balón aforado identificado como 0.2g/L, agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μ L), verificando que la misma se encuentre en 20 μ L, en el siguiente orden:
- i. 20 μ L de la solución stock de etanol
 - ii. 20 μ L de la solución stock de metanol
 - iii. 20 μ L de la solución stock de acetona
 - iv. 20 μ L de la solución stock de isopropanol
 - v. Aforar a 10mL con agua desmineralizada
 - vi. Mezclar por inversión
 - vii. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
 - viii. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.
- e.** Preparación del Working de “control positivo medio” 2.5g/L (QC2): en el balón aforado identificado como 2.5g/L, agregar con pipeta de volumen variable (100-1000 μ L), verificando que la misma se encuentre en 250 μ L, en el siguiente orden:
- i. 250 μ L de la solución stock de etanol
 - ii. 250 μ L de la solución stock de metanol
 - iii. Aforar a 10mL con agua desmineralizada
 - iv. Mezclar por inversión
 - v. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.

- vi. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.
- f.** Preparación del Working de “control positivo alto” 4.5g/L: en el balón aforado identificado como 4.5g/L, agregar con pipeta de volumen variable (100-1000 μ L), verificando que la misma se encuentre en 450 μ L, en el siguiente orden:
- i. 450 μ L de la solución stock de etanol
 - ii. Aforar a 10mL con agua desmineralizada
 - iii. Mezclar por inversión
 - iv. Almacenar en refrigeración a 4-8°C. Puede almacenarse un máximo de un día.
 - v. Anotar en el libro de control de reactivos: fecha, nombre del reactivo, fecha de vencimiento, si se lavó el envase y perito que lo preparó.

3.3 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- A.** Cromatógrafo de Gases 6890 Marca Hewlett-Packard Modelo G1530A, acoplado a Headspace Marca Hewlett-Packard, Modelo HP7694.
- B.** Generador de Nitrógeno.
- C.** Generador de Hidrógeno.
- D.** Compresor de Aire.
- E.** Impresora.
- F.** Balanza Analítica.

4. PROCEDIMIENTO

4.1 CONDICIONES DEL EQUIPO ⁽²³⁾

Se determinan siguiendo el Método Blood.M y Bloodual.M

HEADSPACE	
ZONE TEMPS	°C
Sample oven	70
Sample valve	80
Transfer line	90
EVENT TIMES	Minutos
GC cycle time	5.1
Sample equilibration	10.0
Vial pressurization	0.20
Loop fill	0.20
Loop equilibration	0.05
Sample inject	0.20
Oven stabilization	1.0
SHAKING	
Agitation	None
MODE	
Extractions	1
Puncture mode	Single

CROMATOGRAFO DE GASES	
PROGRAMA	
Oven	
Initial temp	40°C
Initial time	4.50 min
Equilibration time	0.30 min
Rate	0.0 (Off)
Post temp	40°C
Post time	0.00 min
Run time	4.50 min
FRONT INLET	
Mode	Split
Initial temp	250°C
Pressure	4.59 psi
Split ratio	4.2:1
Split flow	59.2 mL/min
Total flow	76.1 mL/min
Gas type	Nitrogen

COLUMN 1	COLUMN 2
DB-ALC1	DB-ALC2
Max. Temp: 260°C	Max. Temp: 260°C
Mode: constant pressure	Mode: constant pressure
Pressure: 4.59 psi	Pressure: 4.59 psi
Nominal initial flow: 7.0 mL/min	Nominal initial flow: 7.1 mL/min
Average velocity: 49 cm/seg	Average velocity: 49 cm/seg
Inlet: Front inlet	Inlet: Front inlet
Outlet: Front Detector	Outlet: Back Detector
FRONT DETECTOR (FID)	BACK DETECTOR (FID)
Temperature: 300°C	Temperature: 300°C
Hydrogen flow: 35.0 mL/min	Hydrogen flow: 35.0 mL/min
Air flow: 400.0 mL/min	Air flow: 400.0 mL/min
Mode: constant makeup flow	Mode: constant makeup flow
Makeup flow: 15.0 mL/min	Makeup flow: 15.0 mL/min
Makeup gas type: Nitrogen	Makeup gas type: Nitrogen
Flame: On	Flame: On
Electrometer: On	Electrometer: On
Lit offset: 2.0	Lit offset: 2.0
SIGNAL 1	SIGNAL 2
Data rate: 10 Hz	Data rate: 10 Hz
Type: front detector	Type: back detector
Save data: On	Save data: On
Zero: 0.0	Zero: 0.0
Range: 0	Range: 0
Fast peaks: Off	Fast peaks: Off
Attenuation: 0	Attenuation: 0

4.2 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN⁽²³⁾

Previo a iniciar la medición de los diferentes calibradores, se deben sacar del refrigerador los workings de 0.5g/L, 1.0g/L, 2.0g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L y 5.0 g/L, así como la solución de estándar interno de 1-propanol. Esperar por lo menos 30 minutos. La solución de estándar interno se mide con el dispensador de paso manual en la posición 1 y con el tip de 50 mL; el blanco sangre, el agua desmineralizada y los diferentes calibradores se miden con las pipetas de

volumen variable de 10-100 μL . La curva de calibración debe prepararse todos los días previo a la realización de los análisis en las muestras y controles de calidad.

1. Blanco (Estándar interno y agua desmineralizada)

Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como Blanco:

- a. 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
- b. 100 μL de agua desmineralizada.
- c. Colocar septa y cerrar.

2. Control Negativo (Blanco Sangre)

Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como Blanco Sangre:

- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
- b) 100 μL de sangre libre de alcoholes y sustancias volátiles
- c) Colocar septa y cerrar.

3. Calibrador 0.5g/L

Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 0.5g/L:

- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
- b) 100 μL del Working de 0.5g/L.
- c) Colocar septa y cerrar.

4. Calibrador 1.0g/L

Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 1.0 g/L:

- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
- b) 100 μL del Working de 1.0 g/L.
- c) Colocar septa y cerrar.

5. Calibrador 2.0g/L

Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 2.0 g/L:

- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol

- b) 100 μ L del Working de 2.0 g/L.
 - c) Colocar septa y cerrar.
6. Calibrador 3.0g/L
- Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 3.0 g/L:
- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - b) 100 μ L del Working de 3.0 g/L.
 - c) Colocar septa y cerrar.
7. Calibrador 4.0g/L
- Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 4.0 g/L:
- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - b) 100 μ L del Working de 4.0 g/L.
 - c) Colocar septa y cerrar.
8. Calibrador 5.0g/L
- Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como 5.0 g/L:
- d) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - e) 100 μ L del Working de 5.0 g/L.
 - f) Colocar septa y cerrar.
9. Aire
- Rotular un vial de 10mL como aire, no colocar nada en su interior, sellar con cerrar.
10. Colocar los viales preparados del numeral del 1 al 9 en una canasta plástica y llevarlos al área de equipos.
11. Entregar los viales a la persona encargada de equipos quien deberá colocarlos en el automuestreador del headspace para ser analizados.

12. La persona que preparó la curva de calibración deberá verificar que el encargado de equipos coloque en el orden correcto los viales en el automuestreador del headspace.
13. Inyectar en el equipo de acuerdo a los parámetros establecidos en el método Blood.M o Bloodual.M (condiciones del equipo)
14. El encargado de equipos debe verificar los resultados obtenidos, siguiendo lo establecido en los protocolos de trabajo DTC-10047 y DTC-10048.

4.3 PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES POSITIVOS: ⁽²³⁾

Previo a iniciar la medición de los diferentes controles positivos, se deben sacar del refrigerador los workings de los controles positivos de 0.2g/L, 2.5g/L y 4.5g/L, así como la solución de estándar interno de 1-propanol. Esperar por lo menos 30 minutos. La solución de estándar interno se mide con el dispensador e paso manual en la posición 1 y con el tip de 50 mL; los controles positivos se miden con las pipetas de volumen variable de 10-100 µL.

1. “Control positivo bajo” (0.2 g/L de acetona, isopropanol, metanol y etanol)
Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como control positivo bajo 0.2 g/L:
 - a)1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - b)100µL del Working del control positivo de acetona, metanol y etanol de 0.2 g/L
 - c)Colocar septa y cerrar.
2. “Control positivo medio” (2.5 g/L de metanol y etanol)
Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como control positivo medio 2.5 g/L:

- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - b) 100µL del Working del control positivo de metanol y etanol de 2.5 g/L
 - c) Colocar septa y cerrar.
3. “Control positivo alto” (4.5 g/L de etanol)
Agregar a un vial de vidrio de 10mL rotulado como control positivo alto 4. g/L:
- a) 1.0mL de estándar interno de 1-propanol
 - b) 100µL del Working del control positivo de etanol de 4.5 g/L
 - c) Colocar septa y cerrar.
4. Debe medirse cada control positivo por duplicado, los tres primeros controles positivos (bajo, medio y alto) irán al inicio de la secuencia, posteriormente las muestras a analizar y los restantes controles positivos al final de la secuencia.

4.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA ⁽²³⁾

Se debe tomar en cuenta para realizar o no el análisis los siguientes parámetros:

1. Tipo de muestra (matrices):

- a. **Sangre:** *(en caso sea de cadáveres)* La muestra de sangre no debe ser tomada del corazón, aorta u otra gran arteria o vena del pecho o abdomen. En caso que la única muestra disponible provenga de estas fuentes, es necesario dejar constancia de esto en la hoja de resultados. La sangre adecuada para estos casos es la proveniente de la vena femoral o la vena iliaca externa, la cual debe ser obtenida por el médico forense al inicio de la autopsia y antes de realizar la evisceración. De lo

contrario si la sangre proviene de una persona viva debe ser tomada por venopunción.

- b.** Orina: no necesita tratamiento previo.
- c.** Humor vítreo (aplica sólo a cadáveres): no necesita tratamiento previo, verificar que no se encuentre contaminado con sangre. En este último caso no se realizará el análisis explicando las razones.
- d.** Bilis: no necesita tratamiento previo
- e.** Alcohol de concentración desconocida: para evitar contaminación en el equipo debido a altas concentraciones y lecturas fuera del rango de la curva de calibración, deben realizarse diluciones a la muestra y correr conjuntamente un control positivo de 1g/L de etanol, los cuales se preparan como se detalla a continuación:
 - i. Rotular un balón aforado de 10 mL con el número de la muestra a analizar
 - ii. Agregar al balón aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada
 - iii. Colocar el balón con agua en la balanza analítica y tarar
 - iv. Pesar en balanza analítica 1.000g del alcohol de concentración desconocida
 - v. Aforar con agua desmineralizada a 10 mL
 - vi. Mezclar por inversión
 - vii. Rotular otro balón aforado de 10 mL con el número de la muestra
 - viii. Agregar aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada al balón

- ix. Medir con pipeta de volumen variable (10-100 μL), 100 μL de la solución anteriormente preparada
- x. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada.
- xi. Mezclar por inversión. Esta será la solución diluida de la muestra de alcohol de concentración desconocida que se inyectará en el equipo
- xii. Sacar del refrigerador el etanol. Esperar por lo menos 30 minutos.
- xiii. Rotular un balón aforado de 10 mL con nombre de la solución y concentración (1g/10ml)
- xiv. Agregar 5mL de agua desmineralizada al balón.
- xv. Colocar en la balanza analítica el balón con agua y tarar
- xvi. Pesar en la balanza analítica 1.001 gramos de etanol (el valor del peso se obtiene a partir de la pureza del reactivo)
- xvii. Aforar el balón a 10 mL con agua desmineralizada
- xviii. Mezclar por inversión
- xix. Rotular un balón aforado de 10 mL con Etanol 1.0 g/L
- xx. Agregar al balón aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada
- xxi. Agregar con pipeta de volumen variable (10-100 μL), 100 μL de la solución de etanol al 1g/10ml anteriormente preparada
- xxii. Aforar a 10mL con agua desmineralizada.
- xxiii. Mezclar por inversión. Esta será la solución de control que se inyectará inmediatamente después de la muestra de alcohol de concentración desconocida.

4. 5. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ⁽²⁵⁾

4. 5.1. EXACTITUD

• Procedimiento

Preparar muestras en un rango que contenga al menos cinco concentraciones diferentes del analito, las cuales aproximadamente estén espaciadas entre 50% (concentración más baja) y 150% (concentración más alta) del rango de trabajo esperado. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Analizar muestras de acuerdo al método ya descrito, usando la matriz del producto o la matriz de la muestra ambiental.

• Documentación

Para cada muestra, reportar el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Calcular el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Llevar un registro de los resultados en una hoja de datos.

• Criterio de Aceptación

El porcentaje de recuperación puede estar entre el 95 y 105% del valor teórico para productos no regulados. Una recomendación es usar ± 2 veces la desviación estándar de una tabla. Para la industria farmacéutica de los Estados Unidos, 98 a 102% es típico para un ensayo de principio activo en un producto medicinal. El porcentaje de recuperación puede estar entre 50 y 150% del valor teórico para los métodos usados en productos EPA. Los porcentajes de recuperación menores pueden ser aceptables basados en la necesidad del método.

4. 5. 2. ESPECIFICIDAD

- **Procedimiento**

Es la habilidad que muestra un método para distinguir entre un analito e impurezas conocidas, precursores sintéticos, metabolitos, o productos de degradación. Esta se muestra en su resolución hacia estos componentes.

- **Documentación**

Imprimir cromatogramas o datos que muestren la resolución de un método.

- **Criterio de Aceptación**

Los componentes contaminantes no deben interferir con el análisis del analito en cuestión.

4. 5. 3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

- **Procedimiento**

Determinar la menor concentración en la que un analito en la matriz/muestra puede ser determinada con la exactitud y precisión requeridas para el método en particular. Este valor puede ser la menor concentración en la curva del patrón.

- **Documentación**

Imprimir el cromatograma o anotar el dato de la menor concentración cuantificable en la hoja de datos. Prover datos que demuestren exactitud y precisión requeridas en el criterio de aceptación.

- **Criterio de Aceptación**

El límite de cuantificación para métodos cromatográficos es la concentración que proporciona una razón señal a ruido, con una relación de 10 a 1 y que es menor o igual a 10% de la precisión, o una relación de 20 a 1 y es menor o igual a 5% de la precisión. En el límite de cuantificación, se deben cumplir los criterios de aceptación de exactitud y linealidad. El límite de cuantificación es

el mejor estimado de una concentración baja, que derive en una desviación estándar relativa de aproximadamente 10%, en, al menos, seis réplicas.

4. 5. 4. LINEALIDAD

• Procedimiento

Preparar soluciones patrón de por lo menos cinco diferentes concentraciones del analito, que estén distribuidas regularmente y que cubran del 50% (concentración más baja) al 150% (concentración más alta) del intervalo de trabajo esperado. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Las soluciones patrón deberían prepararse en la misma matriz utilizada con las muestras, si es posible. Analizar las soluciones patrón conforme el método ya descrito.

• Documentación

Registrar los resultados en una hoja de datos. Calcular la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa para cada concentración. Graficar la media que corresponde para cada concentración (eje de las Y) en función de la concentración (eje de las X). Calcular la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) Registrar estos cálculos en la hoja de datos. Si el resultado es una no linealidad, determinar la relación curvilínea. Graficar el resultado de cada réplica dividido dentro de su concentración (eje de las Y) en función de la concentración (eje de las X). Al resultado dividido dentro de su concentración se le conoce normalmente como “razón de respuesta”. Si el intercepto en la primera gráfica es significativamente distinto de cero, entonces restar el valor del intercepto de cada resultado y luego dividir el resultado dentro de su concentración.

• Criterio de Aceptación

La curva en la primera gráfica debería ser lineal con un coeficiente de determinación (r^2) de por lo menos 0.98. (preferible 0.99). El coeficiente de determinación debe ser menor de 0.99 según las necesidades del método.

Todos los valores de la razón de respuesta deben caer dentro de una zona horizontal angosta. Los valores de concentración que queden fuera de esa zona no son aceptables para ser incluidos en el intervalo normal de trabajo. Un sistema de detección con respuesta lineal estable debe dar una razón de respuesta que varíe menos del 1%, por ejemplo, el caso de un detector de ionización en llama en cromatografía de gases. Se establece que el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.097 para principios activos y 0.98 para impurezas.

4. 5. 5. REPETIBILIDAD

- **Procedimiento**

Hacer un mínimo de 6 determinaciones a una concentración que corresponda con la de la muestra problema. (Este proceso puede repetirse mucha más veces de ser necesario, dejando constancia del número de determinaciones realizadas).

- **Documentación**

Registrar los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media y el(los) parámetro(s) de dispersión escogido(s) (desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalo de confianza).

- **Criterio de Aceptación**

Se establece acorde a un valor máximo aceptable para el parámetro de dispersión escogido.

5. CALCULOS

- a. Preparación de la solución de estándar interno de 1-propanol al 0.02%:

$$\% = \frac{\text{Vol (mL) de 1-propanol} \times \text{densidad de 1-propanol (g/mL)}}{\text{Volumen total de la solución (mL)}} \times 100\%$$

$$\frac{0.125 \text{ mL} \times 0.8053 \text{ g/mL}}{500 \text{ mL}} \times 100 \% = 0.02\% \text{ (p/v)}$$

- b. Preparación de las soluciones stock al 1g/10ml: las soluciones stock se preparan a partir de los reactivos de metanol, etanol, isopropanol y acetona, los cuales se pesan en la balanza analítica previo a realizar correcciones debido a la pureza de los reactivos:

$$\text{Gramos a pesar} = (1 \text{ gramo/pureza del reactivo}) \times 100\%$$

$$\text{Acetona: } (1\text{g}/99.6\%) \times 100\% = 1.004 \text{ g}$$

$$\text{Metanol: } (1\text{g}/99.8\%) \times 100\% = 1.002 \text{ g}$$

$$\text{Etanol: } (1\text{g}/99.9\%) \times 100\% = 1.001 \text{ g}$$

$$\text{Isopropanol: } (1\text{g}/99.5\%) \times 100\% = 1.005 \text{ g}$$

$$[\text{sol. Stock}] = \frac{\text{gramos de muestra}}{\text{volumen de sol (mL)}}$$

$$[\text{sol. Stock}] = \frac{1 \text{ gramo}}{10 \text{ ml}}$$

- c. Preparación de los workings de 0.5 g/L, 1.0g/L, 2.0 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L y 5.0 g/L: los workings se preparan a partir de las soluciones stock al 10% de la siguiente manera

$$\text{g/L} : \frac{\text{concentración sol stock} \times \text{vol medido (mL)}}{\text{vol final de solución (mL)}} \times 1000$$

$$\text{Working 0.5 g/L} : \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.05 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.0005\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} = 0.5 \text{ g/L}$$

$$\text{Working 1.0 g/L : } \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.10 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.001 \text{ g}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1\text{L}} = 1.0 \text{ g/L}$$

$$\text{Working 2.0 g/L : } \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.20 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.002 \text{ g}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1\text{L}} = 2.0 \text{ g/L}$$

$$\text{Working 3.0 g/L : } \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.30 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.003 \text{ g}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1\text{L}} = 3.0 \text{ g/L}$$

$$\text{Working 4.0 g/L : } \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.40 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.004\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1\text{L}} = 4.0 \text{ g/L}$$

$$\text{Working 5.0 g/L : } \frac{(1\text{g}/10\text{ml}) \times 0.50 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = \frac{0.005\text{g}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1\text{L}} = 5.0 \text{ g/L}$$

- d.** Las mediciones en el cromatógrafo de gases de doble columna y doble detector, el valor obtenido debe coincidir en ambas columnas, con un margen de aceptación de +/- 0.05.

X. RESULTADOS

([Conectar](#) con Excel)

IX. DISCUSIÓN

En el desarrollo de métodos, la etapa de validación consiste en el proceso de evaluar el método para determinar su confiabilidad para el uso previsto. La validación normalmente se lleva a cabo sobre la versión final del método desarrollado, bajo parámetros de desempeño que consisten en las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad, los cuales pueden ser: exactitud, especificidad, límite de cuantificación, linealidad, repetibilidad entre otras que pueden ser requeridas por la técnica.

Es así que la determinación en sangre y otros fluidos de alcohol etílico y otros alcoholes (metanol, isopropanol) y cetonas (acetona) líquidos altamente volátiles, por cromatografía de gases con doble columna y detector de ionización de Flama, debe de proporcionar resultados veraces, los cuales han sido estudiados bajo los parámetros de desempeño antes mencionados.

Durante el análisis se utilizaron muestras con concentraciones conocidas (valor teórico), las cuales fueron comparadas con los valores que proporciona el equipo (detector de ionización de flama, FID 1 Y FID 2), se evaluó el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y coeficiente de variación (parámetros de dispersión seleccionados) teniendo un margen de aceptación de la media ± 2 veces la desviación estándar ⁽⁷⁾ en los datos obtenidos por la réplicas en cada una de las concentraciones utilizadas. Teniendo en cuenta que los valores obtenidos en cada columna deben coincidir, aceptándose un margen de ± 0.05 en cada lectura.

Los resultados presentados en las tablas de la No. 1 a la No. 20 muestran los porcentajes de recuperación obtenidos en cada lectura, los cuales

no deben ser menores de 95% y no mayores a 105% de la concentración del analito(lo que determina la exactitud del método) para lo cual el valor del ensayo dado en cada una de las concentraciones, en sus seis réplicas, corresponde perfectamente a este criterio de aceptación.

Las señales presentadas por el equipo al evaluar los distintos alcoholes y cetonas volátiles, así como el 1-propanol (estándar interno) en las muestras de sangre fueron obtenidas de manera inequívoca y propia para cada analito, como se aprecia en los cromatogramas obtenidos en cada análisis (ver anexo No. 4), lo que muestra la habilidad del método para distinguir a los analitos de las impurezas y componentes de la matriz, haciéndolo específico para cada uno de ellos.

Las tablas de la No.1 a la No.4 exponen la menor concentración en la curva de calibración que corresponde a 0.5g/L del método de estudio, se estableció el promedio de seis (06) repeticiones a esta concentración dando resultados de 0.5g/L para cada analito en cuestión (etanol, metanol, isopropanol y acetona). Se determinó la desviación estándar para medir la variabilidad de una distribución, tomando en cuenta que mientras mayor sea una dispersión en una distribución, mayor será la desviación, para cada serie de datos, la cual corresponden a: 0.0047 en el FID 1 y 0.005 en el FID 2 para el etanol, 0.0069 en el FID 1 y 0.007 en el FID 2 para el metanol, 0.007 en el FID 1 y 0.011 en el FID 2 para el isopropanol, 0.007 en el FID 1 y 0.007 en el FID 2 para la acetona, lo que representa una variabilidad no significativa en la distribución de las lecturas. Se obtuvo el coeficiente de determinación que expresa a la desviación estándar como un porcentaje del promedio alrededor del cual se toman las desviaciones y el grado de representatividad de la media⁽³⁷⁾ (ver anexo No.3), para cada serie de datos, el cual corresponde a: 0.95 % FID 1 y 1.01% FID 2 para el etanol, 1.38% FID 1 y 1.50% FID 2 para el metanol, 1.50% FID 1 y

2.26% FID 2 para el isopropanol, 1.37% FID 1 y 1.37% FID 2 para la acetona, lo que representa que no hay una dispersión relativa que sea significativa y una media altamente representativa en cada serie de datos, lo cual demuestra ser un método eficaz para determinar la menor concentración con exactitud y precisión ya que los resultados obtenidos no presentan una variabilidad reveladora al valor real o teórico y expresan igualdad entre la serie de mediciones individuales obtenidas de la misma muestra.

Para demostrar que el resultado obtenido (valor del ensayo) coincide con el valor calculado (valor teórico) se parte de la relación entre respuesta y concentración dada por la curva de calibración. En las Tablas No. 21 a la No.24 se observa el comportamiento lineal del etanol, metanol, isopropanol y acetona respectivamente, obtenida de los promedios de seis repeticiones en cada una de sus concentraciones (0.5, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00g/L) en función de la concentración teórica. Establecida la relación entre ambos resultados se logra obtener una medida que indica la situación relativa de la concentración respecto a las dos variables antes mencionadas y que puede estar entre los límites de +1 y -1, el cual se denomina coeficiente de correlación (r) y mientras más cercano a 1 se encuentre, mayor es la fuerza de correlación; así como también estimar el valor de la concentración con respecto a la ya dada por medio de una regresión lineal la cual se representa por medio de una gráfica en donde el eje de las abscisas "X" mantiene una variable independiente (concentración teórica) y el eje de las ordenadas "Y" la variable dependiente (promedio de la concentración), de esta manera la fuerza de una correlación entre la concentración teórica y el promedio de la concentración aumenta a medida que los puntos en la gráfica se estrechan formando una línea recta. Por tanto las Graficas No.1 a la No.8 manifiestan un alto grado de asociación entre las variables (concentración y promedio) dando una relación lineal entre ambas, mostrando un $r = 1$ lo que expresa una correlación lineal positiva perfecta⁽³⁷⁾.

Se evaluó la precisión del método por medio de la repetibilidad, efectuando una serie de repeticiones de distintas concentraciones -no menos de seis-; con los datos obtenidos se efectuaron los cálculos necesarios para determinar el coeficiente de variación y la desviación estándar (véase tablas No. 1-20 que se incluyen), valores de dispersión escogidos para cada serie de datos, según analito y concentración, los resultados obtenidos de la desviación estándar representan una variabilidad no significativa en la distribución de datos, mientras que el coeficiente de variación predice una media altamente representativa en la serie de lecturas, por lo que expresan la cercanía de coincidencia en la serie de mediciones.

X. CONCLUSIONES

1. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de ionización de flama, es exacto, ya que permite obtener resultados que concuerdan entre el valor teórico conocido, y el valor encontrado.
2. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de ionización de flama, es lineal, ya que posee la capacidad de generar resultados numéricos directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro del rango establecido.
3. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de ionización de flama, es específico, ya que tiene la capacidad de separar e individualizar el analito de estudio en presencia de los otros componentes similares y previamente establecidos; que puedan estar en la muestra.
4. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de ionización de flama, posee alta sensibilidad dado que puede determinar con precisión y exactitud mínimas concentración de analitos en la muestra.
5. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de

ionización de flama, es repetible, pues los resultados obtenidos de mediciones sucesivas y en distintos aparatos presentan un alto grado de concordancia, sin observarse una variación significativa entre ellos.

6. El método de cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía de Gases con el empleo de doble columna cada una de las mismas con su detector de ionización de flama, posee las propiedades y características cuantificables que indican su grado de calidad; por lo tanto es un método válido para la cuantificación y determinación de alcohol en sangre.

XI. RECOMENDACIONES

1. Analizar muestra o patrones preparados en forma independiente donde el valor es desconocido para el analista, siguiendo el procedimiento estándar de operación para el método. De tal manera que se obtenga el valor medio resultante del análisis de réplicas (repeticiones) de estas muestras los cuales deberían ser coincidentes.
2. Comprobar la calibración del equipo utilizando periódicamente controles comerciales (negativos y positivos) y correrlos como muestras en la rutina del laboratorio, comprobar que los resultados de estos controles analizados se encuentren dentro del rango establecido para el análisis, con el objeto de verificar el buen funcionamiento del equipo.
3. Utilizar una base de datos que contenga, los parámetros de desempeño con sus correspondientes criterios de aceptación y los formatos para el registro de datos y resultados.
4. Verificar periódicamente que los parámetros de desempeño evaluados anteriormente se estén cumpliendo, y documentarlo por el personal encargado.
5. Incluir este procedimiento dentro del Sistema de Gestión de Calidad de INACIF.

XII. REFERENCIAS

1. Cuellas, Antonio. DOCUMENTOS FARMACOGÍA DEL ALCOHOL Y SUS INTERACCIONES. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Químicas Forenses, Unidad de Toxicología y Seguridad Químicas, Universidad Miguel Hernández, España.
2. Metabolismo e intoxicación del alcohol. Disponible en : www.biol.unlp.ed.ar/toxicología/etanol.html
3. Cabrera, Rafael. José Torrecilla. MANUAL DE DROGODEPENDENCIA. Comunidad de Madrid, 2002. pp 187-191.
4. Gisbert Calabuíg. MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA. 6ta. Edición Masson. Barcelona, España 2004. pp 794-801, 878, 879, 889,890.
5. Delgado, Santiago. José Torrecilla. MEDICINA LEGAL EN DROGODEPENDENCIA. Editorial Elsevier Science. Madrid, España, 2002. pp 283- 291.
6. Geoffrey, Davies. FORENSIC SCIENCE, 2da edición, American Chemical Society. Washintong D.C, USA. 1986. pp 98-100, 142
7. Asdrúbal Lárez. TOXICOLOGÍA ANALÍTICA Y EXPERIMENTAL. Ediciones de la Biblioteca. Carácas, Venezuela, 1984. pp 345
8. Stewart C.P., Stolman A. TOXICOLOGY MECHANISMS AN ANALYTICAL METHODS. Vol. II. Academic Pres, New York. USA. pp 93, 120-125

9. Simonin, C. MEDICINA LEGAL JURÍDICA. Editorial Jims, Barcelona, España 1962. pp 584
10. Navarro, Tomás. MEDICINA LEGAL. Vol. II. Editorial Universitaria Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2005. pp 55
11. Cyril, H Wecht. LEGAL MEDICINE Series editor, Canada, 1980. pp 4
12. Rubio, Edna. COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DOSIFICAR ALCOHOL EN SANGRE. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1981.
13. Pecsok, Robert y Shields Donal. MÉTODOS MODERNOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS. Editorial Limusa, México, 1977. pp 67-74
14. Sunshine, Irving. Jatlow Peter. METHODOLOGY. Vol. II. CRC Press, Inc, USA, 1982. pp 1-4
15. Chamberlain, Joseph. ANALYSIS OF DRUGS IN BIOLOGICAL FLUIDS. CRC Press. 1987. pp 33.
16. Morales Lys. EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DIRECTOS DE CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1994.
17. Stahr, H.M. ANALYTICAL METODOS IN TOXICOLOGY. Wiley-Interscience publication, John Wiluy, USA, 1991.
18. Fast Gas Chromatographic Separation and Detection of Blood Alcohol Compounds for forensic Methods. Disponible en: www.agilent.com

19. Blood Alcohol Analysis by Static Headspace with Dual FID/Megabore Capillary Columns. Disponible en: www.innovatek.com.pdf/ANALISIS/ALCOHOL
20. Validación de Métodos Analíticos. Disponible en: www.labnutricion.cl/validacion.htm
21. Reglamento Técnico Centroamericano. RTC 11.01.35:06. Disponible en: www.reglatec.go.cr
22. García, Julia. Documento de Validación de Métodos Analíticos. Garantía de la Calidad II, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2006.
23. Mata, Isabel. Protocolo No. DTC 10,058 Determinación de Alcohol etílico y otras sustancias volátiles en sangre. Departamento Técnico Científico, Ministerio Público, Guatemala, 2007.
24. Tasa de alcohol en sangre, disponible en www.ieslaasuncion.org/fisicoquimica/tasa.htm.
25. Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo OGA-GEC-016, Guatemala, 2007, disponible en: www.mineco.gob.gt/mineco/calidad/acreditacion/ogagec016.pdf
26. La Cromatografía y los software de interpretación. Disponible en : www.quiminet.com

27. Norma COGUANOR NGR-ISO 9000:2000 Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario. www.dca.gob.gt
28. Norma COGUANOR NGR-ISO 9001:2000 Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos. Disponible en: www.dca.gob.gt
29. Ley del Sistema Nacional de la Calidad, decreto No, 78-2005. Disponible en: www.mineco.gob.gt/mineco/calidad/leysnc.pdf
30. Metabolismo del etanol. Disponible en: www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/perinatal/alcoholled.html
31. Validación de métodos analíticos. Definiciones. Disponible en : www.salud.gob.mx
32. Adriazola, Ricardo Ariel. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR n-PROPANOL EN MUESTRAS DE SANGRE DE ORIGEN TANATOLÓGICO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON HEADSPACE. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Química Farmacológica y toxicological. Santiago, Chile, 2006. Pp. 17,18,19.
33. Selection of an Internal Standar for Postmortem Ethanol analysis. Disponible en: www.hf.aa.gov/docs/508/cami/9805.pdf.
34. Blood Alcohol Analysis using an automated static Headspace method. Disponible en: www.gerstel.de/p-gc-an-2005-0.1.pdf.

35. Determination of ethanol concentration in biomass to ethanol fermentation supernatants by Gas Chromatography. Disponible en: www.nrel.gov/biomass/pdfs/4694.
36. Procedure for the analysis of automotive exhaust for methanol an ethanol standard operating procedure No. MLD 101. Disponible en: www.arb.ca.gov/testmeth/slb/sop101.pdf.
37. Rodas, Iris. ESTADÍSTICA MODERNA. Editorial Delta, 1era edición, Guatemala. 1999. pp:139-150,178-185.

XIII. ANEXOS

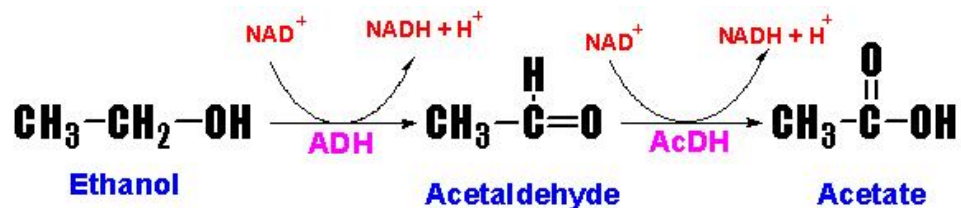
ANEXO No. 1

METABOLISMO DEL ETANOL.⁽³⁰⁾

El alcohol etílico o etanol es un líquido aromático y combustible que procede de la fermentación de sustancias azucaradas, del almidón y de la celulosa.⁽⁴⁾

Después de su ingestión, el etanol por ser liposoluble, de bajo peso molecular y no-electrolito, se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal. Una porción entre el 2-10% es eliminado directamente por la orina, aire expirado y sudor, el resto, es oxidado en el organismo.⁽³⁰⁾

El producto de la oxidación del etanol es el acetaldehído y la enzima principal que cataliza esta transformación es la ADH (Alcohol Deshidrogenasa) presente principalmente en el hígado. Esta es una enzima citosólica dependiente de NAD^+ , siendo sus productos: Acetaldehído y NADH , los cuales son responsables en gran parte de los efectos tóxicos del alcohol y de la respuesta metabólica del organismo al mismo.⁽³⁰⁾

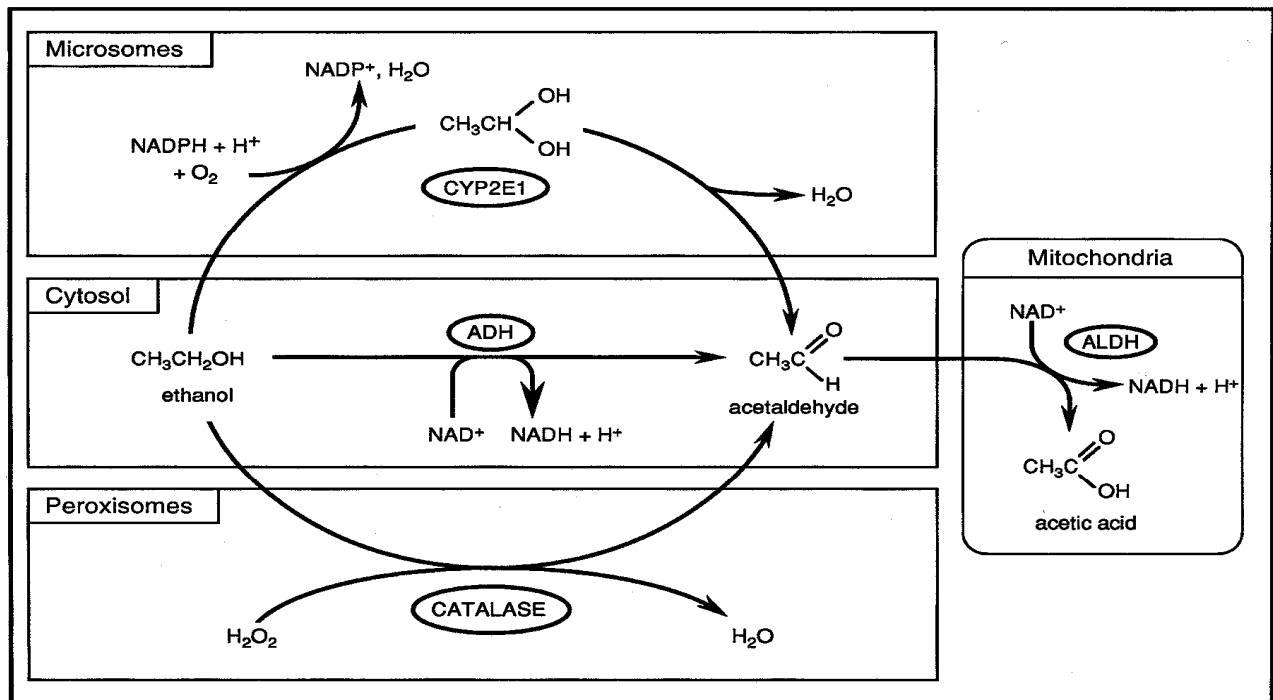


Se conocen dos vías adicionales para la oxidación del etanol, las cuales son minoritarias en relación con la ADH. Una de estas vías es la catalizada por una catalasa, que utiliza peróxido de hidrógeno como agente oxidante y la otra es un sistema enzimático microsomal (MEOS), que utiliza NADPH y oxígeno molecular.

En todas las vías, el producto inmediato de la oxidación del etanol, es el acetaldehído, el cual es oxidado a acetato por acción de la ALDH (Acetaldehído Deshidrogenasa).

Esta enzima también es dependiente de NAD^+ , pero se diferencia de la ADH en que se encuentra en todos los órganos donde se ha buscado, y en que se encuentra tanto en microsomas como en mitocondrias y citosol.

De esta forma, el acetaldehído formado en el hígado por la oxidación del etanol en el citosol, difunde al interior de las mitocondrias donde por acción de la ALDH es oxidado a acetato, que sale de nuevo al citosol.



ANEXO No. 2

ETAPAS DE LA INTOXICACIÓN ETILICA ⁽⁵⁾

Uno de los cuadros publicados en el que se establecen las distintas etapas clínicas de la intoxicación etilica aguda, en relación con niveles solapados de alcoholemia, que se ajusta mejor a las necesidades forenses por su claridad y exactitud es el elaborado por Dubowski K.M.1980:

Alcoholemia entre 0.10-0.50 g/l –sobriedad:

- No se detectan aparentes alteraciones.
- Comportamiento dentro de lo normal a la simple observación.
- Pequeños cambios comportamentales detectables por tests especiales.

Alcoholemia entre 0.30-1.20 g/l –Euforia:

Euforia Leve.

Aumento de la sociabilidad.

Locuacidad.

Incremento de la confianza en si mismo.

Disminución de las inhibiciones.

Disminución de la atención, juicio y control.

Alteración de la eficacia de la resolución de tareas delicadas.

Alcoholemia entre 0.90-2.25 g/l –Excitación:

Inestabilidad emocional.

Alteración de la capacidad de juicio.

Deterioro de la memoria y comprensión.

Disminución en la respuesta a estímulos sensoriales.

Incremento del tiempo de reacción.

Incoordinación muscular.

Alcoholemia entre 1.80 -3.00 g/l –Confusión:

Desorientación.

Confusión mental, vértigos.

Estados emocionales exagerados (temor, enfado, tristeza, etc.)

Perturbación de las sensaciones, de las percepciones: color, formas, dimensiones, movimiento.

Disminución de la sensación de dolor.

Alteraciones del equilibrio.

Incoordinación motora.

Marcha tambaleante.

Lenguaje mal articulado.

Alcoholemia entre 2.70-4.00 g/l –Estupor:

- Apatía.
- Marcada disminución de la respuesta a los estímulos.
- Incoordinación muscular con incapacidad para andar y permanecer en pie de forma estable.
- Vómitos, incontinencia de orina y heces.
- Deterioro de la conciencia, sueño y estupor.

Alcoholemia entre 3.50-5.00 g/l –Coma:

Depresión o abolición de los reflejos, inconciencia, coma, anestesia.

Temperatura por debajo de lo normal.

Trastornos de la circulación y respiración. Posible muerte.

Alcoholemia por encima de 4.50 g/l –Muerte:

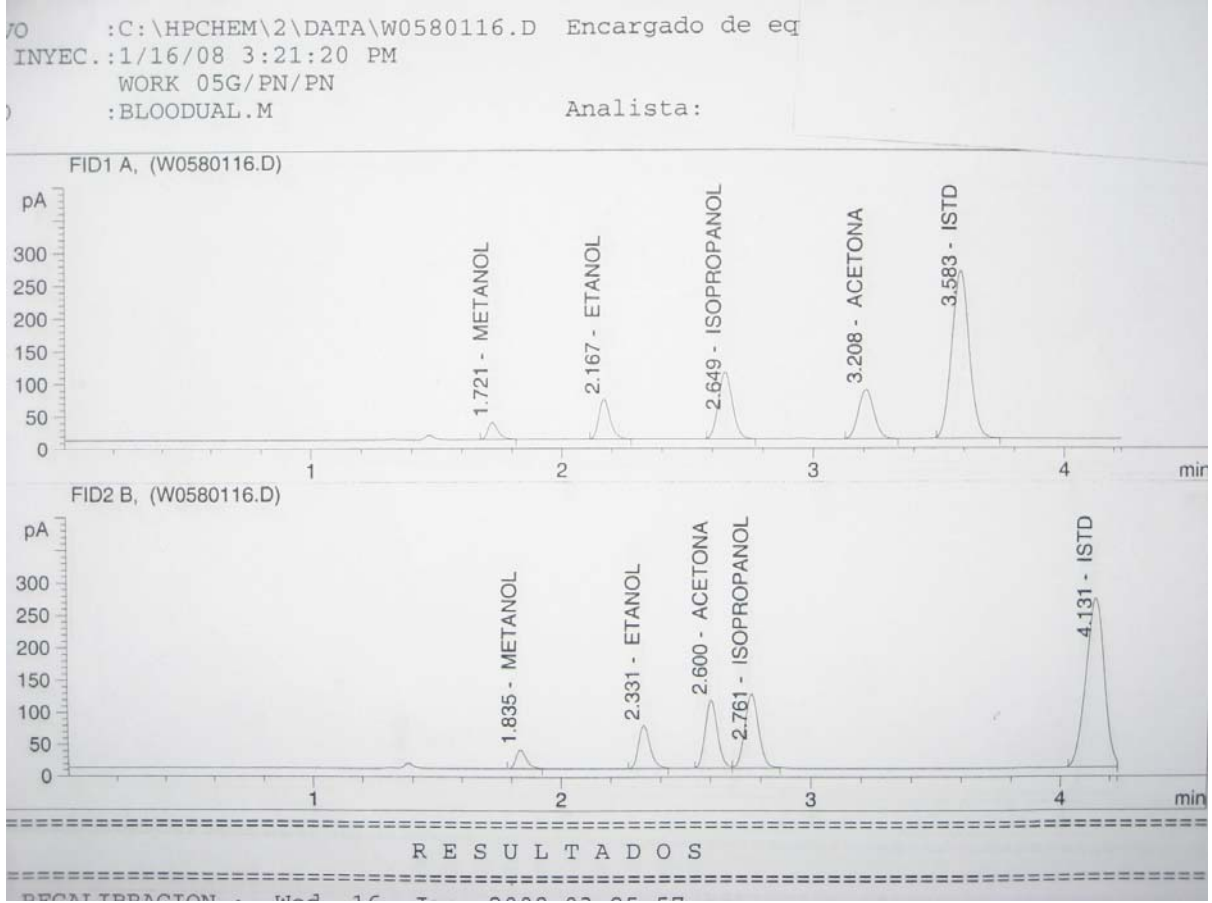
Muerte por parálisis respiratoria.

ANEXO No.3

REPRESENTATIVIDAD DE LA MEDIA ARITMETICA, SEGÚN COEFICIENTE DE VARIABILIDAD⁽³⁷⁾

Valor del coeficiente de variabilidad	Grado en que la media representa a la serie
De 0 a menos del 10%	La media es altamente representativa
De 10 a menos del 20%	La media es bastante representativa
De 20 a menos del 30%	La media tiene representatividad
De 30 a menos del 40%	La media tiene representatividad dudosa
De 40% o más	La media carece de representatividad

ANEXO No. 4
CROMATOGRAMAS



ANEXO No. 5

FORMATO HOJAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Evelynn Rocio Gonzalez Arriaga
Estudiante

Licda. Miriam Ovalle de Monrroy
Asesora

Lic. Estuardo Serrano Vives
Director de Escuela

Lic. Oscar Cobar Pinto
Decano

X. RESULTADOS

A. ANALISIS DE MUESTRAS POR CONCENTRACIÓN Y ANALITO: determinación del porcentaje de recuperación, media, desviación estándar y coeficiente de variación

Tabla No.1:
Concentración 0.5 g/L -ETANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	0,50	0,50	0,49	100	98	Etanol
2	0,50	0,49	0,49	98	98	
3	0,50	0,50	0,50	100	100	
4	0,50	0,50	0,50	100	100	
5	0,50	0,50	0,50	100	100	
6	0,50	0,49	0,49	98	98	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
0,50	0,50	0,0047	0,005	0,95	1,01

Tabla No.2:
Concentración 0.5 g/L -METANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	0,50	0,50	0,50	100	100	Metanol
2	0,50	0,50	0,49	100	98	
3	0,50	0,51	0,51	102	102	
4	0,50	0,49	0,49	98	98	
5	0,50	0,50	0,50	100	100	
6	0,50	0,49	0,49	98	98	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
0,50	0,50	0,0069	0,007	1,38	1,50

Tabla No.3:
Concentración 0.5 g/L -ISOPROPANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	0,50	0,49	0,49	98	98	Isopropanol
2	0,50	0,49	0,48	98	96	
3	0,50	0,51	0,51	102	102	
4	0,50	0,50	0,51	100	102	
5	0,50	0,50	0,49	100	98	
6	0,50	0,49	0,49	98	98	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
0,50	0,50	0,007	0,011	1,50	2,26

Tabla No.4:
Concentración 0.5 g/L -ACETONA-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	0,50	0,50	0,50	100	100	Acetona
2	0,50	0,49	0,49	98	98	
3	0,50	0,51	0,51	102	102	
4	0,50	0,51	0,51	102	102	
5	0,50	0,50	0,50	100	100	
6	0,50	0,50	0,50	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
0,50	0,50	0,007	0,007	1,37	1,37

Tabla No.5:
Concentración 1.00 g/L -ETANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	1,00	1,01	1,01	101	101	Etanol
2	1,00	0,99	0,99	99	99	
3	1,00	1,00	1,01	100	101	
4	1,00	1,00	1,00	100	100	
5	1,00	1,01	1,01	101	101	
6	1,00	1,01	1,01	101	101	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
1,00	1,01	0,0075	0,008	0,74	0,76

Tabla No.6:
Concentración 1.00 g/L -METANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	1,00	1,00	1,00	100	100	Metanol
2	1,00	0,99	0,99	99	99	
3	1,00	1,00	1,00	100	100	
4	1,00	1,00	1,00	100	100	
5	1,00	1,01	1,01	101	101	
6	1,00	0,99	0,99	99	99	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
1,00	1,00	0,0069	0,007	0,69	0,69

Tabla No.7:
Concentración 1.00 g/L -ISOPROPANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	1,00	1,02	1,02	102	102	Isopropanol
2	1,00	1,00	1,00	100	100	
3	1,00	1,00	1,01	100	101	
4	1,00	1,01	1,00	101	100	
5	1,00	1,01	1,02	101	102	
6	1,00	1,01	1,01	101	101	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
1,01	1,01	0,007	0,008	0,68	0,81

Tabla No.8:
Concentración 1.00 g/L -ACETONA-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	1,00	1,02	1,02	102	102	Acetona
2	1,00	0,99	0,99	99	99	
3	1,00	1,00	1,00	100	100	
4	1,00	0,99	0,99	99	99	
5	1,00	1,00	1,00	100	100	
6	1,00	1,00	1,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
1,00	1,00	0,010	0,010	1,00	1,00

Tabla No.9:
Concentración 2.00 g/L -ETANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	2,00	1,99	1,99	99,5	99,5	Etanol
2	2,00	1,97	1,98	98,5	99	
3	2,00	1,99	1,99	99,5	99,5	
4	2,00	2,01	2,02	100,5	101	
5	2,00	2,02	2,02	101	101	
6	2,00	2,01	2,01	100,5	100,5	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
2,00	2,00	0,0167	0,016	0,84	0,79

Tabla No.10:
Concentración 2.00 g/L -METANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	2,00	2,00	2,00	100	100	Metanol
2	2,00	1,97	1,98	98,5	99	
3	2,00	1,99	1,99	99,5	99,5	
4	2,00	2,01	2,02	100,5	101	
5	2,00	2,02	2,03	101	101,5	
6	2,00	2,01	1,99	100,5	99,5	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
2,00	2,00	0,0163	0,018	0,82	0,89

Tabla No.11:
Concentración 2.00 g/L -ISOPROPANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	2,00	1,98	1,98	99	99	Isopropanol
2	2,00	1,98	2,00	99	100	
3	2,00	1,99	1,97	99,5	98,5	
4	2,00	2,01	2,02	100,5	101	
5	2,00	2,01	2,02	100,5	101	
6	2,00	2,00	2,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
2,00	2,00	0,013	0,019	0,63	0,93

Tabla No.12:
Concentración 2.00 g/L -ACETONA-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	2,00	1,97	1,97	98,5	98,5	Acetona
2	2,00	1,96	1,97	98	98,5	
3	2,00	1,97	1,97	98,5	98,5	
4	2,00	2,02	2,02	101	101	
5	2,00	2,01	2,01	100,5	100,5	
6	2,00	1,98	1,98	99	99	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
1,99	1,99	0,022	0,021	1,12	1,03

Tabla No.13:
Concentración 3.00 g/L -ETANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	3,00	3,00	3,00	100	100	Etanol
2	3,00	2,97	2,97	99	99	
3	3,00	2,99	3,00	100	100	
4	3,00	3,01	3,01	100	100	
5	3,00	3,00	3,00	100	100	
6	3,00	3,00	3,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
3,00	3,00	0,0126	0,012	0,42	0,42

Tabla No.14:
Concentración 3.00 g/L -METANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	3,00	2,99	2,98	99,7	99	Metanol
2	3,00	2,96	2,96	99	99	
3	3,00	2,97	2,98	99	99	
4	3,00	3,00	2,99	100	100	
5	3,00	2,98	2,98	99	99	
6	3,00	3,00	2,97	100	99	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
2,98	2,98	0,0149	0,009	0,50	0,32

Tabla No.15:
Concentración 3.00 g/L -ISOPROPANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	3,00	2,99	2,99	100	100	Isopropanol
2	3,00	2,96	2,96	99	99	
3	3,00	2,99	3,01	100	100	
4	3,00	3,00	3,01	100	100	
5	3,00	3,00	3,00	100	100	
6	3,00	3,00	3,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
2,99	3,00	0,014	0,017	0,47	0,57

Tabla No.16:
Concentración 3.00 g/L -ACETONA-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	3,00	3,00	3,00	100	100	Acetona
2	3,00	2,96	2,96	99	99	
3	3,00	2,98	2,99	99	100	
4	3,00	3,01	3,01	100	100	
5	3,00	3,02	3,02	101	101	
6	3,00	3,00	3,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
3,00	3,00	0,020	0,019	0,66	0,63

Tabla No.17:
Concentración 4.00 g/L -ETANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	4,00	3,99	3,98	99,75	99,5	Etanol
2	4,00	4,00	3,99	100	99,75	
3	4,00	4,00	4,00	100	100	
4	4,00	3,98	3,98	100	100	
5	4,00	3,98	3,98	100	100	
6	4,00	3,99	3,99	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
3,99	3,99	0,0082	0,007	0,20	0,19

Tabla No.18:
Concentración 4.00 g/L -METANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	4,00	3,99	3,99	99,8	100	Metanol
2	4,00	4,02	4,01	101	100	
3	4,00	4,01	4,01	100	100	
4	4,00	3,98	3,97	100	99	
5	4,00	3,99	3,98	100	100	
6	4,00	4,00	4,04	100	101	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2

4,00	4,00	0,0134	0,023	0,34	0,58
------	------	--------	-------	------	------

Tabla No.19:
Concentración 4.00 g/L -ISOPROPANOL-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	4,00	4,00	4,00	100	100	Isopropanol
2	4,00	3,99	3,98	100	99,5	
3	4,00	4,01	3,99	100	100	
4	4,00	4,01	4,01	100,3	100,3	
5	4,00	4,00	4,00	100	100	
6	4,00	4,00	4,00	100	100	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	
FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
4,00	4,00	0,007	0,009	0,17	0,24

Tabla No.20:
Concentración 4.00 g/L -ACETONA-

No.	Valor Teórico g/L	Valor del Ensayo g/L		% de recuperación		Analito
		FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	
1	4,00	4,02	4,01	100,5	100,25	Acetona
2	4,00	3,97	3,96	99	99	
3	4,00	4,03	4,02	101	101	
4	4,00	4,03	4,02	101	101	
5	4,00	4,01	4,01	100	100	
6	4,00	4,02	4,02	100,5	100,5	

promedio valor de ensayo g/L		desviación estándar valor de ensayo g/L		coeficiente de variación	

FID 1	FID 2	FID 1	FID 2	FID 1	FID 2
4,01	4,01	0,021	0,021	0,51	0,53