



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Validación de un método para determinar Alcoholemia por
Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas y su
aplicación forense en Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Elder Miler REYES AVALOS

ASESOR

Mg. Luis Alberto INOSTROZA RUIZ

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Reyes E. Validación de un método para determinar Alcoholemia por Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Elder Miler Reyes Avalos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45793769
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7260-2404
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	18089817
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8038-0730
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	José Alfonso Apestequía Infantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09359857
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Alberto Inostroza Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	18089817
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Edgar Robert Tapia Manrique
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	09440524
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.3.5. Toxicología forense
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	No aplica
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Complejo Policial “Walter Rosales León” Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Surquillo Calle: Av. Aramburú N° 550 Latitud: -12.102667487083233 Longitud: -77.02501713057322
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2022 - diciembre 2022 Enero 2023
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07 Química analítica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.07 Ciencia forense https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.05.01



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **12:00 hrs. del 16 de mayo del 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (asesor), Dr. José Alfonso Apesteagua Infantes y el Dr. Edgar Robert Tapia Manrique; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATOGRFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN FORENSE EN PERÚ"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Elder Miler Reyes Avalos**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

A - EXCELENTE - 20 - VEINTE

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Elder Miler Reyes Avalos**, el Grado Académico de Magíster en **Toxicología**.

Siendo las **13:20** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **13:30** hrs. del 16 de mayo de 2023.

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E.)
Presidente

Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Asoc., T.P.)
Miembro - Asesor

Dr. José Alfonso Apesteagua Infantes (P. P., T.C.)
Miembro

Dr. Edgar Robert Tapia Manrique (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



LA DIRECTORA DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00005-FFB-UPG-2023

Que, mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada: **VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN FORENSE EN PERÚ**, presentado por **Elder Miler Reyes Avalos**, con fecha de recepción 30/01/2023, con fecha de aplicación al programa de similitud el 02/02/2023 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **9%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 02 de febrero del 2023



UNMSM

Firmado digitalmente por RAMOS
CEVALLOS Norma Julia FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.02.2023 06:15:54 -05:00

DRA. NORMA JULIA RAMOS CEVALLOS
DIRECTORA

NJRC/ecj

DEDICATORIA

A Dios por la salud y la bendición de vivir, por darme fortaleza, llenarme de oportunidades y misericordia cada mañana para no decaer en el camino elegido.

A mis padres Américo e Irma por haberme forjado como la persona que soy; muchos de mis logros se los debo a ellos que me formaron con reglas, valores y me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi amada esposa Milagros, en reconocimiento por su iniciativa y trabajo diario en pro de nuestra familia, así como por el apoyo incondicional para lograr mis objetivos.

A mis hijos Aarón y Camila, quienes son mi inspiración, fortaleza, orgullo y motivo para continuar superándome día a día.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. General PNP Luis Miguel Gamarra Chavarry, Director de Criminalística de la PNP, por permitirme la realización del presente trabajo de investigación en las instalaciones de la DIRCRI PNP, siempre en pro del fortalecimiento de la función criminalística para el apoyo a la justicia.

A mi gran amigo y colega Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz, por haber compartido sus conocimientos y dedicado su tiempo guiando la ejecución del proyecto en base a su experiencia y sabiduría en el campo toxicológico para concretar con éxito este trabajo de investigación.

A mis maestros, quienes han tomado un arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos en los campos y temas que corresponden en el desarrollo de mi profesión.

A los señores docentes, miembros de jurado de tesis, por sus aportes significativos en la mejor redacción del presente informe, y a todas las demás personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos teóricos	4
2.2.1. Etanol	4
2.2.2. Alcholemla y legislación peruana	5
2.2.3. Cuantificación de la alcholemla	6
2.2.4. Cromatografía de gases	7
2.2.5. Espacio de cabeza (headspace)	9
2.2.6. Espectrometría de masas	10
2.2.7. Métodos analíticos con espectrometría de masas	11
2.2.8. Análisis de etanol mediante CG/EM	12
2.2.9. Desarrollo y validación de métodos analíticos	13
2.2.9.1. Selectividad	13
2.2.9.2. Límite de detección (LD)	14
2.2.9.3. Límite de cuantificación (LC)	14
2.2.9.4. Linealidad	14
2.2.9.5. Intervalo de trabajo	14
2.2.9.6. Recuperación	14
2.2.9.7. Repetibilidad	14
2.2.9.8. Precisión intermedia	15
2.2.9.9. Robustez	15
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	16
3.1. Tipo de investigación	16
3.2. Diseño metodológico	16
3.3. Unidad de análisis	16

3.4. Alcance del método para determinar alcoholemia por CG/EM	16
3.5. Elementos empleados para el desarrollo y validación el método	16
3.6. Procedimiento para el desarrollo y validación del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas	17
3.7. Procesamiento de los datos	25
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	26
4.1. Desarrollo del método para determinar alcoholemia por CG/EM	26
4.2. Identificación del etanol y propan-1-ol por EM	28
4.3. Calibración del equipo CG/EM	30
4.4. Validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM	31
4.5. Aplicación forense: análisis de muestras sanguíneas para determinar alcoholemia por CG/EM	34
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	36
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO VIII. ANEXOS	52
Anexo 1. Solicitud del investigador peticionando autorización para ejecución del proyecto de investigación “validación de un método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú” en las instalaciones de la Dirección de Criminalística PNP	52
Anexo 2. Autorización del Director de Criminalística para ejecutar el proyecto de investigación “validación de un método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú” en las instalaciones de la Dirección de Criminalística PNP	53
Anexo 3. Cuantificación de etanol por cromatografía de gases/espectrometría de masas	54
Anexo 4. Parámetros de idoneidad del sistema para solución selectividad	55
Anexo 5. Análisis de la regresión lineal de patrones de referencia de etanol en diferentes concentraciones inyectado en el CG/EM para linealidad del instrumento	56
Anexo 6. Análisis de la regresión lineal de material fortificado con etanol en diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM para linealidad del método	60
Anexo 7. Análisis estadístico de precisión intermedia del método desarrollado por CG/EM	65
Anexo 8. Análisis estadístico de robustez del método desarrollado por CG/EM	66
Anexo 9. Flujiograma del método desarrollado y validado por CG/EM	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación masa/carga del etanol y sus abundancias relativas resultantes de la fragmentación por ionización electrónica en un espectrómetro de masas	13
Tabla 2. Volumen adicionado de solución stock de etanol para preparación de patrón de calibración en diferentes concentraciones	19
Tabla 3. Volumen adicionado de solución stock de etanol para preparación de material fortificado en diferentes concentraciones	20
Tabla 4. Variaciones en el método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM para análisis de robustez	23
Tabla 5. Matriz con variaciones en el método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM para evaluar robustez	24
Tabla 6. Condiciones cromatográficas optimizadas para análisis de alcoholemia por CG/EM empleando columna capilar TG [®] -ALC1	28
Tabla 7. Fragmentos de masas y sus abundancias relativas de los picos cromatográficos identificados por el espectrómetro de masas en la figura 11(A) a los 1,12 y 1,85 min	29
Tabla 8. Cálculo de la desviación estándar corregida a partir de material fortificado con etanol al 0,1 g/L	31
Tabla 9. Análisis estadístico del porcentaje de recuperación de etanol empleando material fortificado a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM	33
Tabla 10. Análisis estadístico de repetibilidad del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM	33
Tabla 11. Análisis estadístico de precisión intermedia del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM	33
Tabla 12. Tiempos de retención reportados del etanol y propan-1-ol cuando son analizados por el método desarrollado con ligeras variaciones según tablas 4 y 5 empleando material fortificado a concentraciones de 0,5 g/L y 2,0 g/L	34
Tabla 13. Alcoholemia en muestras de personas involucradas en diversos delitos que fueron conducidos a la Dirección de Criminalística PNP para extracción de muestra sanguínea en el Área de Toma de Muestra del Departamento de Química y Toxicología Forense	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de un cromatógrafo de gases con sus principales componentes	7
Figura 2. Cromatograma con sus parámetros característicos para determinar aptitud del sistema	8
Figura 3. Representación de los sucesos en un muestreador de espacio de cabeza	9
Figura 4. Diagrama de un espectrómetro de masas y sus principales componentes	10
Figura 5. Procesos básicos que tiene lugar en un espectrómetro de masas	11
Figura 6. Espectro de masas del etanol con sus fragmentos iónicos resultantes de la ionización electrónica en un espectrómetro de masas	12
Figura 7. Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total en el empleando columna capilar TG [®] -5MS	26
Figura 8. Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total empleando columna capilar TG [®] -ALC1	26
Figura 9. Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 1 mL de material fortificado con etanol al 0,1 g/L y 1 mL de propan-1-ol al 0,1 % empleando columna capilar TG [®] -ALC1	27
Figura 10. Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 200 µL de material fortificado con etanol al 0,1 g/L y 1 mL de propan-1-ol al 0,02 % empleando columna capilar TG [®] -ALC1	27
Figura 11. (A) Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 200 µL material fortificado con etanol al 1,0 g/L y 1 mL de propan-1-ol al 0,02 % empleando columna capilar TG [®] -ALC1 y condiciones cromatográficas optimizadas y (B) filtro de masas de su fragmento iónico 31	28
Figura 12. Espectros de masas de los componentes eluidos a los 1,12 min y 1,85 min del cromatograma de la figura 11(A)	29
Figura 13. Identificación de los picos cromatográficos y de sus espectros de masas de las figuras 11(A), 12(A), 12(B) y tabla 7 empleando bibliotecas del espectrómetro de masas correspondientes al etanol y propan-1-ol con probabilidades de 97,46 % y 95,51 % respectivamente	30
Figura 14. Curva de calibración del método para determinar alcoholemia por CG/EM	30
Figura 15. Cromatograma en <i>full scan</i> (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución selectividad con metanol, etanal, etanol, propan-2-ol, propanona y propan-1-ol en sangre total	31
Figura 16. Dispersión de las concentraciones de etanol inyectado (g/L) en el equipo CG/EM vs. relación de áreas etanol/propan-1-ol para evaluación de linealidad del instrumento	32
Figura 17. Dispersión de la concentración de etanol en material fortificado vs. concentración de etanol medido por el método desarrollado	32
Figura 18. Curva de calibración generada en un análisis de alcoholemia por CG/EM	34

RESUMEN

La alcoholemia es una de las pruebas químicas más frecuentes de los laboratorios forenses por lo que es imprescindible disponer de métodos analíticos exactos, precisos y adecuados para el propósito. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar un nuevo método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú. Se desarrolló un método por inyección de espacio de cabeza empleando propan-1-ol como estándar interno, el cromatógrafo de gases se configuró a 40 °C, la adquisición de datos en el espectrómetro de masas fue de *full scan* (28 - 65 uma), los analitos se identificaron por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas del espectrómetro de masas, el etanol se cuantificó filtrando el fragmento iónico 31. El método desarrollado resultó selectivo (separó eficientemente el etanol del metanol, etanal, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol con resolución superior a 3), sensible (los límites de detección y cuantificación fueron de 0,00213 g/L y 0,00710 g/L), lineal ($R^2 = 0,9994$, en el rango de 0,1 g/L hasta 4,0 g/L), exacto (la recuperación obtenida fue del 98,39 % al 101,67 %), preciso (los coeficientes de variación fueron inferiores a 1,36 % y 1,97 % en la repetibilidad y precisión intermedia) y robusto (estadísticamente se obtuvo los mismos resultados al hacer variaciones mínimas en el método). Se concluye en desarrollo y validación de un nuevo método para la determinar de alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas en muestras de sangre total de personas participantes en hechos punibles demostrando su aplicabilidad forense en Perú.

Palabras clave: alcoholemia; cromatografía de gases; espectrometría de masas; etanol; método analítico; validación.

ABSTRACT

Blood alcohol concentration is one of the most common chemical tests in forensic laboratories, so it is essential to have accurate, precise and fit-for-purpose analytical methods. The objective of this study was to develop and validate a new method to determine blood alcohol levels by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and its forensic application in Perú. A headspace injection method was developed using propan-1-ol as internal standard, the gas chromatograph was set at 40 °C, the data acquisition in the mass spectrometer was full scan (28 - 65 uma), the analytes were identified by comparison of the mass spectra with the mass spectrometer libraries, ethanol was quantified by filtering the ionic fragment 31. The developed method was selective (it efficiently separated ethanol from methanol, ethanal, propanone, propan-1-ol and propan-2-ol with a resolution greater than 3), sensitive (the limits of detection and quantification were 0.00213 g/L and 0.00710 g/L), linear ($R^2 = 0.9994$, in the range of 0.1 g/L to 4.0 g/L), exact (the recovery obtained was from 98.39 % and 101.67 %), precise (the coefficients of variation were less than 1.36 % and 1.97 % in repeatability and intermediate precision) and robust (statistically the same results were obtained by making minimal variations in the method). It concludes in the development and validation of a new method to determine blood alcohol levels by GC/MS in whole blood samples of people participating in punishable acts, demonstrating its forensic applicability in Perú

Key words: analytical method, blood alcohol concentration, ethanol, gas chromatography, mass spectrometry, validation.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El consumo de etanol se encuentra ampliamente extendido en la sociedad peruana, se ingiere en bebidas alcohólicas de diversas concentraciones, desde las bebidas alcohólicas fermentadas como la cerveza que tiene un grado alcohólico de 5 % hasta las bebidas alcohólicas destiladas que llegan a sobrepasar el 40 %. Esta droga social es legalmente permitida y tiene efectos característicos en aquel que lo consume, cambiando el comportamiento, ralentizando los reflejos e intensificando las emociones. Las consecuencias del excesivo consumo de etanol podrían generar hechos punibles, cuando estos individuos alcoholizados agreden, invaden propiedad privada, conducen maquinas o usan armas causando daños personales y materiales.

Existen diversos métodos para determinar alcoholemia, desde los indirectos, como la fotolorimetría y espectrofotometría UV-visible basados en reacciones de oxidación-reducción, hasta los métodos directos como la cromatografía de gases con detector de ionización por llama, que identifica y cuantifica el alcohol etílico basado en el tiempo de retención. Sin embargo, los métodos previamente mencionados no identifican al etanol estructuralmente, por lo que podrían ser cuestionados en un juzgado.

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que identifica los componentes de una muestra en su forma química estructural, basada en espectros de masas únicos y característicos que provienen de la ionización de cada sustancia cuando son separados por otras técnicas instrumentales como la cromatografía de gases dando un elevado grado de certeza a los resultados emitidos.

Es fundamental que los laboratorios forenses encargados del realizar análisis de alcoholemia en personas involucradas en hechos delictivos cuenten con métodos selectivos y sensibles validados que garanticen los resultados para una correcta aplicación de justicia. Sería de gran aporte a los juzgados, que laboratorios peruanos dispongan de la espectrometría de masas para los análisis de alcoholemia para encontrarse al nivel de los estándares internacionales con el objetivo de evitar algún posible cuestionamiento en los resultados emitidos.

Por todo lo antes mencionado, es preciso desarrollar y validar un método para la cuantificación de etanol en sangre por cromatografía de gases/espectrometría de masas

para su aplicación forense en Perú a fin de brindar un análisis de alcoholemia con un alto grado de confiabilidad como prueba para la administración de justicia.

La presente investigación persigue los siguientes objetivos:

Objetivo general

Desarrollar y validar un nuevo método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú.

Objetivos específicos

- (1) Desarrollar un nuevo método por cromatografía de gases/espectrometría de masas para determinar alcoholemia en muestras de sangre de personas.
- (2) Validar el método desarrollado por cromatografía de gases/espectrometría de masas evaluando selectividad, sensibilidad, linealidad, precisión, exactitud y robustez.
- (3) Demostrar la aplicabilidad forense en Perú del nuevo método desarrollado y validado para determinar alcoholemia en muestras de sangre de personas involucradas en diversos delitos.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Preosti et al.¹ estimaron la incertidumbre de medición para alcoholemia cuando es aplicada en procesos legales, por lo que validaron un método analítico por cromatografía de gases acoplado a muestreador de espacio de cabeza, con detector de espectrometría de masas, evaluando las características de desempeño clásicos. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,00058 g/L y 0,0018 g/L, respectivamente. Los valores de precisión intraensayo a 0,5 g/L y 0,8 g/L fueron de 1,7 % y 2,2 % respectivamente; los de precisión intermedia fueron de 6,7 % y de 5,6 %, concluyendo que el método proporciona resultados imparciales.

Iwai et al.² desarrollaron y validaron un método de cuantificación de etanol en sangre total, por cromatografía de gases con espectrometría de masas, tomando 0,1 mL de muestra, resultando en un método que cumple los requisitos para ser empleado en la cuantificación de etanol, validando de acuerdo a la guía de validación de métodos bioanalíticos de la *Food and Drug Administration*, con una regresión lineal superior de 0,998 en concentraciones de 0,1 g/L a 5,0 g/L de etanol en sangre. Este método fue empleado con éxito en muestras reales de autopsias.

Xiao et al.³ desarrollaron un método sensible y específico para la determinación cuantitativa de etanol en sangre usando n-propanol como estándar interno en un tiempo de análisis de 5 min, obteniendo un método lineal ($R^2 = 0,999$ en el rango de concentraciones de 39,5 $\mu\text{g/mL}$ - 1262,9 $\mu\text{g/mL}$) con un límite de cuantificación y límite de detección de 39,5 $\mu\text{g/mL}$ y de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Tiscinone et al.⁴ usando 100 μL de muestra validaron un método encontrando límites de detección y cuantificación de 0,005 g/dL y 0,010 g/dL respectivamente, el rango lineal de orden cero ($R^2 > 0,990$) se determinó para abarcar concentraciones de 0,010 g/dL a 1,000 g/dL. El coeficiente de variación de los análisis fue inferior a 0,010; 0,025; 0,080 y 0,030 g/dL respectivamente, concluyendo que es un método confiable para el cálculo cuantitativo de alcoholemia.

Wasfi et al.⁵ usando n-propanol como estándar interno presentan la validación de un método para la cuantificación de etanol en sangre, resultando lineal ($R^2 = 0,999$ en el

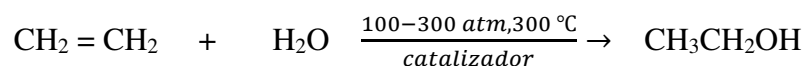
rango de concentraciones de 5 mg/dL a 200 mg/dL), específico (sin interferencias del metanol, acetaldehído, acetona o materiales endógenos), sensible (límite de cuantificación y detección de 0,2 mg/dL y 0,020 mg/dL respectivamente) y robusto (coeficiente de variación inferior al 5 % interensayo e intraensayo), concluyendo que se trata de un método confiable para la cuantificación de etanol en sangre.

2.2. Aspectos teóricos

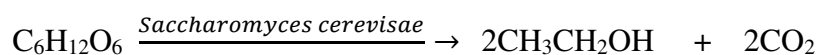
2.2.1. Etanol

El etanol, también conocido como alcohol etílico, alcohol de grano, metilcabinol, hidróxido de etilo, hidrato de etilo, espíritu de vino entre otras denominaciones; es un alcohol primario, el segundo de los alcoholes, de CAS N° 64-17-5 y peso molecular de 46,07 g/mol. Se presenta como un líquido transparente a temperatura ambiente e incoloro con un olor a vino característico y sabor acre, de punto de inflamación de 87 °C, densidad de 0,789 g/mL; los vapores son más pesados que el aire. Tiene efectos como fármaco, antiséptico, disolvente polar, neurotoxina, depresor del sistema nervioso central, agente teratogénico, antagonista del receptor NMDA, agonista de la proteína quinasa C, desinfectante y metabolito humano. Es el ácido conjugado del etóxido⁶.

De manera industrial es sintetizado mediante reacción catalítica en fase gaseosa del agua con etileno, el cual se lleva a cabo a elevada temperatura y presión. Este proceso utiliza catalizadores como el pentóxido de fosforo, óxido de tungsteno o diferentes tipos de arcilla especialmente tratada⁷.



La producción de etanol a partir de la fermentación de granos y azúcares es una de las reacciones orgánicas conocidas más antiguas, que data de por lo menos 8000 años en el Este medio y quizá 9000 años en China, que proviene de los azúcares y almidones obtenidos de distintas fuentes como granos de maíz, trigo, centeno y cebada, por lo que al etanol se le llama alcohol de grano. La fermentación requiere adición de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), la que, por un proceso metabólico normal, una molécula de azúcar de seis carbonos como la glucosa es convertida en dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono, según la fórmula⁸.



La disolución que resulta de la fermentación solo contiene de 12 a 15 % de alcohol, ya que las levaduras no pueden sobrevivir en concentraciones superiores. La destilación aumenta la concentración de etanol entre 40 y 50 % en caso de licores fuertes. El contenido de alcohol en las bebidas alcohólicas varía de 4 a 6 % (v/v) para la cerveza, de 10 a 15 % para el vino y 40 % o más para licores destilados. En comparación con otras drogas, se requiere cantidades sorprendentemente grandes de alcohol para que aparezcan efectos fisiológicos, lo cual hace que su ingestión se parezca más a un alimento que al de una droga⁹.

2.2.2. Alcoholemia y legislación peruana

El consumo de alcohol etílico es un grave problema de salud pública en el Perú, siendo la tercera causa más importante de pérdidas económicas por muerte prematura o discapacidad. Para la Organización Panamericana de la Salud el peruano adulto consume 9,9 L de alcohol etílico puro *per cápita* por año colocándose entre los países latinoamericanos de mayor consumo¹⁰, además de consecuencias patológicas que se presenta en diversos órganos, el hecho de interferir en la lucidez y razonamiento representa consecuencias graves como predisposición a eventos delictivos (como víctimas o victimarios), accidentes diversos laborales y de tránsito¹¹.

Según datos de la Policía Nacional del Perú, en el año 2021, la conducción en estado de ebriedad constituyó la tercera causa de los accidentes de tránsito con 4897 casos, significando el 6,56 % del total, y en denuncias por violencia familiar, el 17,10 % de los agresores se encontraban en estado de ebriedad¹².

En accidentes de tránsito, cuando se presume conducción en estado de ebriedad, la cuantificación del etanol sanguíneo es importante en un proceso penal. Los límites de etanol en sangre punibles para otros países son de 80 mg/dL para Estados Unidos, Reino Unido y Canadá; 0,20 mg/g en Suecia y 0,50 mg/g en la mayoría de los países de la Unión Europea¹³.

En la legislación nacional vigente, el Texto Único Ordenado del Reglamento Nacional de Tránsito, menciona que el conductor y/o peatón debe someterse a la prueba de alcoholemia cuando el efectivo de la Policía Nacional del Perú asignado al control de tránsito lo considere¹⁴. Además, el Código Penal peruano establece sanciones a los

conductores encontrados en estado de ebriedad de acuerdo con la gravedad de los daños causados y los niveles de alcoholemia encontrados, teniendo como valores críticos para la toma de decisiones las concentraciones de etanol en sangre de 0,25 g/L y 0,5 g/L¹⁵. El Código Procesal Penal, en su artículo 213 menciona al “examen corporal para prueba de alcoholemia” facultando a la Policía Nacional del Perú en el ámbito de sus funciones para la prevención de delitos o en el curso de una inmediata intervención como consecuencia de la posible comisión de un delito a conducir a los investigados al centro de control para realizar la prueba de alcoholemia¹⁶.

2.2.3. Cuantificación de la alcoholemia

La sangre es la principal matriz para determinar consumo o intoxicación de etanol, existiendo otras muestras como el aire expirado, orina, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo, etc¹⁷. Las concentraciones de etanol en sangre se utilizan como indicadores de intoxicación en pruebas de rendimiento humano, como conducir bajo la influencia del etanol¹⁸.

Los métodos para la cuantificación de etanol en sangre aparecieron hace más de 100 años, los primeros buscaron la separación del alcohol de la matriz biológica por difusión, destilación o aireación previa a la oxidación química¹⁹, los agentes oxidantes más frecuentemente empleados fueron el dicromato de potasio mezclado en varias proporciones con el ácido sulfúrico, el contenido del agente oxidante restante después de la reacción con el etanol fue determinado con el tiosulfato de sodio, titulación iodométrica o por fotolorimetría. El principal inconveniente de estos primeros métodos de química húmeda era la falta de especificidad porque otros compuestos orgánicos volátiles que podrían estar presentes en muestras de sangre (acetona, metanol, isopropanol, etc.), también se oxidaban, dando como resultados valores irreales para la concentración de etanol en sangre²⁰.

También se han utilizado con éxito otros métodos analíticos para determinar cantidad de alcohol en muestras biológicas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectroscopía infrarroja, los que requieren condiciones especiales para su desarrollo²¹.

El método de elección empleado en los laboratorios toxicológicos acreditados para la detección cualitativa y cuantitativa de etanol en fluidos corporales es la cromatografía de gases con un detector de ionización por llama inyectando mediante la técnica de espacio de cabeza; esta técnica tiene la ventaja de ser semiautomática, reproducible y compatible con múltiples tipos de muestras²². La cromatografía de gases acoplado con muestreador de espacio de cabeza es normalmente aplicada porque el etanol es volátil y por lo tanto no es requerido un procedimiento de limpieza de la muestra²².

2.2.4. Cromatografía de gases

La cromatografía agrupa un conjunto importante y variado de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas; muchas de estas separaciones son imposibles de ser realizados por otros medios²³.

En la cromatografía de gases, la muestra se disuelve en un gas inerte (fase móvil), el cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible y fija en la columna. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud. En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez²³, logrando la separación cromatográfica. Estos componentes son analizados en un detector que genera señales físicas que son traducidas por un software generando un cromatograma para su análisis cualitativo y cuantitativo, como se observa en la figura 1.

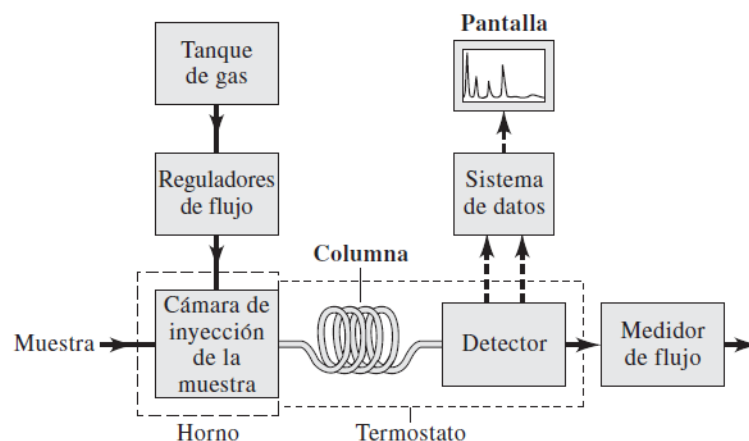


Figura 1. Diagrama de un cromatógrafo de gases con sus principales componentes²⁸.

El cromatograma es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución. La línea base corresponde a la respuesta del detector en ausencia de compuestos, y la aparición del pico representa la elución de un componente de la muestra. La posición del pico aporta la información cualitativa y las áreas o alturas del pico información cuantitativa²⁴, como se puede observar en la figura 2.

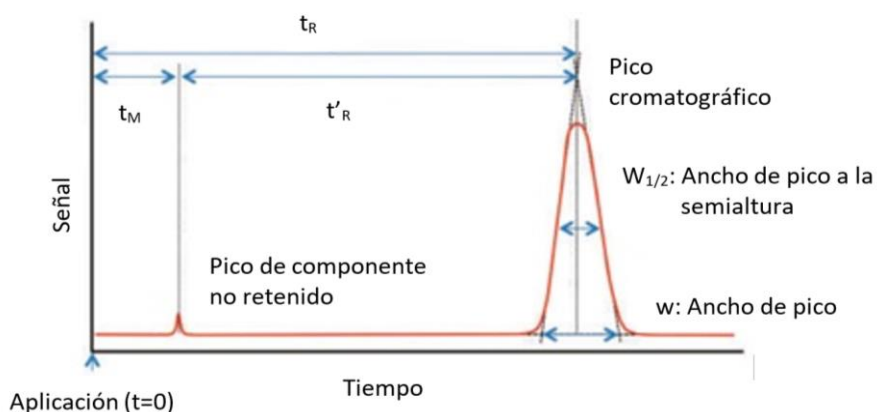


Figura 2. Cromatograma con sus parámetros característicos para determinar aptitud del sistema²⁴.

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de gases. Estas pruebas se utilizan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar²³.

El tiempo de retención (t_R) es la base para identificar los analitos, corresponde al tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la máxima respuesta. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de su sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial para la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad²⁴.

La resolución (R_s) expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados, se puede observar directamente en el cromatograma; se tendrá una buena resolución si los picos no se solapan y están perfectamente delimitados²⁴.

El número de platos teóricos (H) mide los equilibrios del paso de la fase móvil a la fase estacionaria, su valor es una medida indirecta del ancho del pico, para un pico a un tiempo de retención específico, su determinación sirve para verificar que un método sigue siendo

idóneo, controla el estado de la columna a lo largo de su vida útil, para comparar materiales o para optimizar un método analítico²⁴.

2.2.5. Espacio de cabeza (headspace)

El espacio de cabeza es una técnica útil ampliamente utilizada en el análisis de analitos volátiles en muestras con diferentes matrices. El término de espacio de cabeza se refiere a la fase gaseosa (en equilibrio o no con la matriz) sobre una muestra sólida o líquida, cuando ésta se coloca en un recipiente cerrado (normalmente un vial sellado con una septa)²⁵.

En el muestreo de espacio de cabeza, el sistema se calienta durante un periodo de tiempo determinado a una temperatura controlada y los volátiles se distribuyen entre la fase de muestra y la fase gaseosa hasta alcanzar el equilibrio. El equilibrio se caracteriza por el coeficiente de partición, que representa la relación de concentraciones de analito en la muestra condensada y la fase gaseosa, el muestreo se utiliza directamente utilizando jeringas herméticas a los gases como se detalla en la figura 3. La instrumentación es bastante simple, generalmente implica el uso de un recipiente sellado y un sistema de calefacción para controlar la temperatura del vial de la muestra²⁶.

Tiene diversas aplicaciones, la industria farmacéutica la emplea para el control de solventes residuales, la industria de los alimentos lo usa para el análisis de compuestos aromáticos volátiles y en los disolventes residuales, se utiliza también en los análisis de los compuestos orgánicos volátiles emitidos en los procesos industriales, en la industria de los combustibles, productos polímeros, muestras biológicas y el análisis de otros compuestos volátiles²⁶.

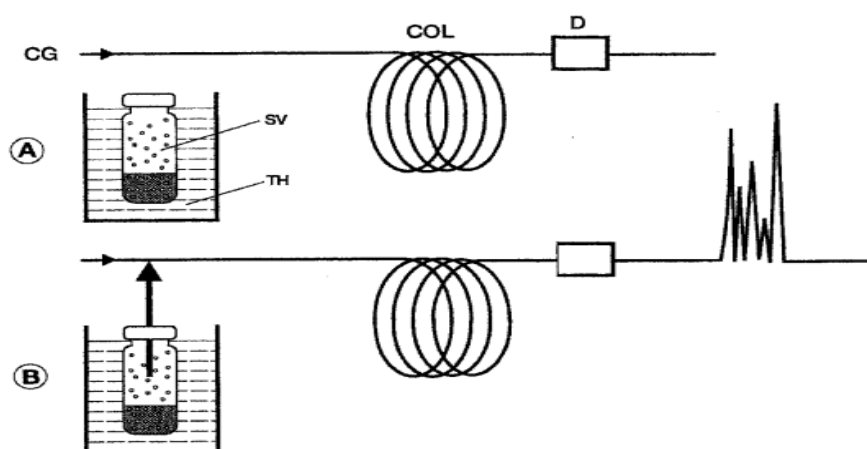


Figura 3. Representación de los sucesos en un muestreador de espacio de cabeza (A) equilibrio y (B) transferencia de muestra. CG: gas Carrier, SV: vial muestra, TH: temperatura, COL: columna CG: gas de arrastre, D: detector²⁵.

Debido a que el análisis basado en el espacio de cabeza puede prevenir eficazmente que especies no volátiles entren en el sistema cromatógrafo de gases, esta técnica elimina muchos problemas causados por la contaminación y, por lo tanto, puede reducir los procesos de preparación de muestras, es decir, separación en columnas, filtración y extracción por solventes²⁷.

2.2.6. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta multifacética, muy utilizada para identificar compuestos orgánicos presentes en diversas muestras y determinar sus concentraciones. Como se observa en la figura 4, un espectrómetro de masas es un instrumento que opera bajo un sistema de alto vacío, que luego de haber introducido una pequeña cantidad de muestra, los fracciona en iones en estado gaseoso por acción del bombardeo de electrones en la fuente de ionización para posteriormente separarlos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) en un analizador de iones, los que luego son medidos en un detector amplificador de señal que finalmente son traducidos en un software que exhibe espectros característicos y únicos para cada molécula. Tiene la aptitud de proporcionar la composición elemental de la materia; la estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y las relaciones isotópicas de átomos en muestras²⁸.

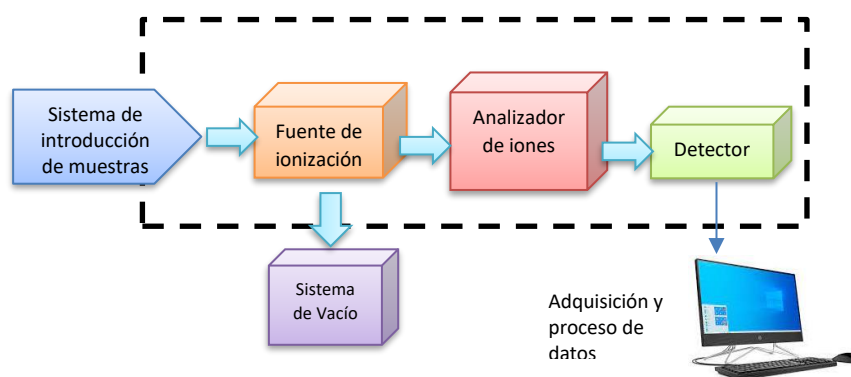


Figura 4. Diagrama de un espectrómetro de masas y sus principales componentes, modificado de Bermejo R²⁴.

En función del sistema de ionización que se emplee, las moléculas pueden sufrir una fragmentación más o menos intensa como se observa en la figura 5, por lo que los iones analizados pueden estar constituidos por fragmentos de la molécula original. Un detector

específico cuantifica separadamente cada uno de los iones producidos a partir de una muestra, dando lugar así a un espectro de masas en el que se representa la abundancia relativa de cada ion, en función de su relación masa/carga. Es habitual que la carga de los iones sea la unidad, con lo que cada ion o fragmento iónico se caracteriza básicamente por sus masas²⁸.

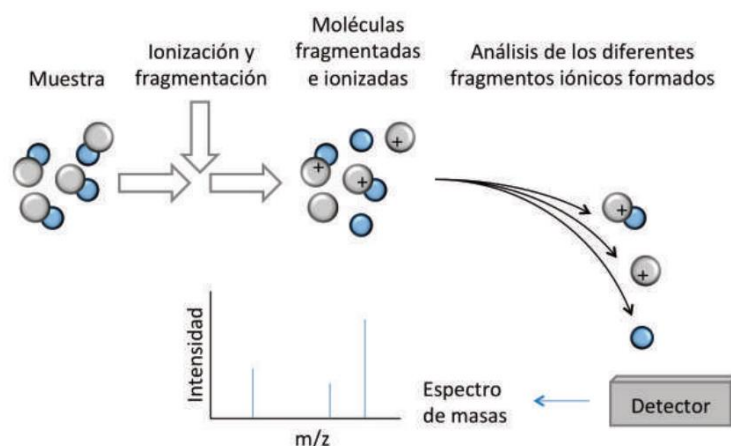


Figura 5. Procesos básicos que tiene lugar en un espectrómetro de masas²⁸.

2.2.7. Métodos analíticos con espectrometría de masas

Durante las últimas décadas, la espectrometría de masas ha reemplazado a las tradicionales y menos específicas técnicas de detección como la ionización por llama, nitrógeno-fosforo, captura de electrones, ultravioleta y detección por fluorescencia como la tecnología preferente para la confirmación de drogas y sus metabolitos en toxicología forense²⁹.

Para la identificación de una molécula en una matriz, usando la espectrometría de masas según la *Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science* (OSAC), es necesario la aparición de todos los iones encontrados en el estándar de referencia y para la cuantificación es suficiente el monitoreo de un solo ion³⁰. La *World Antidoping Agency* (WADA) sugiere que para la cuantificación de un analito es necesario el uso de un estándar interno³¹.

El grupo de trabajo científico para análisis de drogas comisadas (SWGDRUG por sus siglas en inglés), clasifica a los métodos de análisis en atención a su nivel de selectividad,

en tres categorías (A, B y C), siendo los métodos de categoría A los de mayor selectividad por su información estructural, encontrándose en este nivel la espectrometría de masas; además recomienda que el análisis de las muestras debería realizarse por un método de categoría A o en su defecto el uso de más de un método de análisis cuando se usan métodos de otras categorías³².

2.2.8. Análisis de etanol mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas

El etanol por ser un compuesto orgánico volátil es analizado por cromatografía de gases, muestreado por espacio de cabeza pudiendo emplear como detector un espectrómetro de masas, que luego de la separación cromatográfica y fragmentación emite espectro de masas, que otorga arbitrariamente al fragmento iónico más abundante un porcentaje del 100 % y los demás fragmentos les corresponde fracciones en función de su abundancia²⁹ en la figura 6 se observa el espectro de masas del etanol, que asigna el fragmento iónico 31 el máximo porcentaje y la tabla 1 detalla los fragmentos iónicos con sus respectivas abundancias.

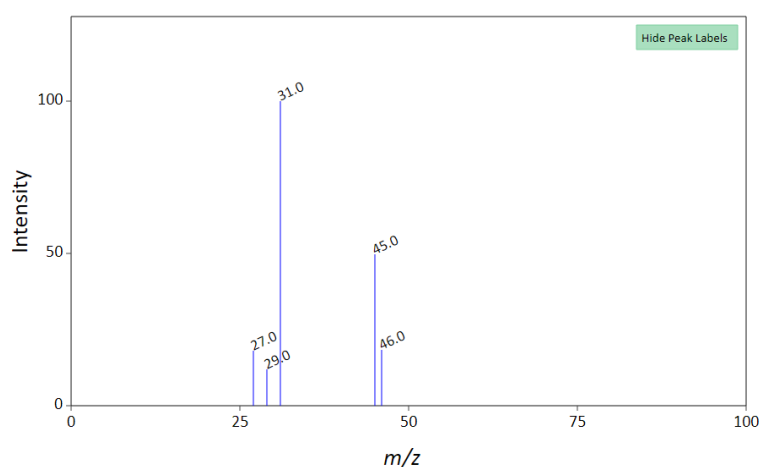


Figura 6. Espectro de masas del etanol con sus fragmentos iónicos resultantes de la ionización electrónica en un espectrómetro de masas⁶.

Existe variedad de librerías comerciales para los espectrómetros de masas con múltiples espectros de masas de moléculas donde se presenta los fragmentos iónicos con sus respectivas abundancias, los que pueden ser comparados con los espectros obtenidos en un análisis rutinario resultando un índice de similitud y probabilidad de coincidencia que es empleado en la identificación de compuestos²⁹.

Tabla 1. Relación masa/carga del etanol y sus abundancias resultantes de la fragmentación por ionización electrónica en un espectrómetro de masas⁶.

Etanol	
Fragmento iónico (m/z)	Abundancia (%)
31	99,99
45	49,58
46	18,24
27	18,02
29	11,90

2.2.9. Desarrollo y validación de métodos analíticos

El desarrollo de métodos analíticos para analizar componentes de una matriz se da cuando no existen técnicas definitivas o por la adaptación de un método ya existente cuando no se cuenta con el equipamiento o materiales necesarios definidos por el método para su aplicación³³.

La validación de un método analítico es la confirmación, a través del examen y aportación de evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso previsto y para identificar las limitaciones del método en condiciones normales de operación³⁴. La Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC) sugiere validar métodos no normalizados, métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación y ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados³⁵. Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto³⁶.

La EURACHEM en su documento de la adecuación al uso de métodos analíticos, refiere que “validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico y la confirmación de que cuenta con las aplicaciones requeridas”³⁷. Por su lado la ISO 17025 menciona que la validación consiste en la “confirmación a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”³⁸. Las características de desempeño clásicas son las siguientes:

2.1.9.1. Selectividad

Hace referencia al “grado en que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de

comportamiento similar”, del análisis de este parámetro resulta la habilidad de un método para medir el analito de interés en muestras a las cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas³⁵.

2.1.9.2. Límite de detección (LD)

Este parámetro corresponde con la “concentración más baja de analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado”³⁷.

2.1.9.3. Límite de cuantificación (LC)

Este parámetro evalúa “el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica”³⁷.

2.1.9.4. Linealidad

Es la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo de trabajo dado³⁹.

2.1.9.5. Intervalo de trabajo

Es “el rango en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable”. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación y el extremo superior está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica³⁹.

2.1.9.6. Recuperación

Es la respuesta del detector ante una adición o extracción del analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero⁴⁰.

2.1.9.7. Repetibilidad

Es una medida de variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo⁴⁰.

2.1.9.8. Precisión intermedia

Este parámetro ofrece una estimación de la variación de los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad³⁵.

2.1.9.9. Robustez

Este parámetro hace alusión a “una medida de la capacidad del método para no ser afectado por pequeñas variaciones premeditadas de sus parámetros”³⁵.

Para la evaluación de las características de desempeño se emplean las siguientes herramientas:

A. Blanco reactivo

Son los reactivos utilizados durante el proceso analítico, se analizan para determinar si contribuyen a la señal medida³⁷.

B. Blanco muestra

Son muestras matriz sin presencia de analito analizado³⁷.

C. Patrón de referencia

Cualquier material empleado como valor de referencia, ya sea de reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. El analito debe ser estable y homogéneo³⁹.

D. Material fortificado

Corresponde a materiales o soluciones de matriz en los que el analito ha sido adicionado en valores conocidos³⁹.

E. Muestras de rutina

Son muestras que van a ser objeto de análisis del método desarrollado⁴⁰.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Aplicada⁴¹.

3.2. Diseño metodológico

Experimental⁴².

3.3. Unidad de análisis

selectividad, sensibilidad, linealidad, precisión, exactitud y robustez.

3.4. Alcance del método para determinar alcoholemia por CG/EM

El método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas fue desarrollado para ser aplicado en la cuantificación de etanol en muestras de sangre total de personas en concentraciones desde 0,1 g/L hasta 4,0 g/L⁴³.

3.5. Elementos empleados para el desarrollo y validación del método

Los ensayos para el desarrollo y validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM se realizaron en el Laboratorio de Instrumentación del Departamento de Química y Toxicología Forense de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, durante los meses junio a diciembre del año 2022 y enero 2023, empleando los siguientes materiales y equipos:

3.5.1. Material de laboratorio

Micropipeta de volumen variable 100 - 1000 μ L, puntas para micropipeta de 1000 μ L, matraces volumétricos de 5 mL y 1000 mL, viales de vidrio para automuestreador de espacio de cabeza de 20 mL, tapas colapsibles para viales de 20 mL, columna capilar TG[®] - ALC1 30 m x 0,32 mm x 1,80 μ m y columna capilar TG[®] - 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.

3.5.2. Instrumentación

Cromatógrafo de gases marca Thermo Scientific® modelo Trace 1300 acoplado a espectrómetro de masas marca Thermo Scientific® modelo ISQ7000 con automuestreador de espacio de cabeza marca Thermo Scientific® modelo RSH, balanza analítica marca Boeco® 220 g max, ultra purificador de agua marca Thermo Scientific® modelo GenPure Pro, vórtex marca FOUR E'S SCIENTIFIC® y jeringa analítica automática marca Thermo Scientific® modelo eVol®.

3.5.3. Productos químicos y material biológico

Etanol absoluto grado HPLC 99,9 %, metanol HPLC, propanona HPLC, propan-1-ol HPLC, Propan-2-ol HPLC, etanal HPLC y cloruro de sodio ACS marca Merk®. Agua ultrapura, gas helio UHP 5.0 y sangre total humana.

3.6. Procedimiento para el desarrollo y validación del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas

3.6.1. Desarrollo de método para determinar alcoholemia por CG/EM^{1,3,44,45}

3.6.1.1. Selección de columna

Se experimentó en el CG/EM la capacidad de resolución de las columnas TG®-5MS y TG®-ALC1 para análisis de alcoholemia, inyectando 1 mL de solución a concentración de 1,0 g/L de metanol, etanol, etanal, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol en sangre. Posteriormente se comparó visualmente, así como por sus parámetros de aptitud ambas columnas, seleccionando la que ofrezca mejor resolución.

3.6.1.2. Selección de volúmenes añadidos

Se verificó la respuesta cromatográfica en áreas y alturas de soluciones para inyección en el CG/EM empleando como muestra sangre fortificada con etanol a concentración de 1,0 g/L de la siguiente manera:

- a) En un vial de vidrio de 20 mL para automuestreador de espacio de cabeza se agregó 1 mL de muestra, 1 mL de propan-1-ol al 0,1 % y 100 mg de cloruro de sodio, y

b) En un vial de vidrio de 20 mL para automuestreador de espacio de cabeza se agregó 200 µL de muestra, 1 ml de propan-1-ol al 0,02 % y 100 mg de cloruro de sodio.

Seleccionando la combinación que ofreció mejor señal sin saturar el equipo y logró optimizar recursos en muestra y materiales, sin interferir con la sensibilidad ni selectividad del método.

3.6.1.3. Ajuste de los parámetros del método instrumental

Al CG/EM se inyectó muestras de sangre con metanol, etanol, etanal, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol a concentración de 1,0 g/L se procedió a realizar pruebas para optimizar los parámetros instrumentales, ajustando el volumen de inyección, flujo del gas de arrastre, temperatura del horno del CG (modo isotérmico o rampa), temperatura del horno del muestreador de espacio de cabeza y split, tomando como referencia notas de aplicación de fabricantes de equipos y trabajos previos hasta lograr la mejor resolución y análisis en el menor tiempo sin interferir en la selectividad ni sensibilidad.

3.6.2. Preparación de soluciones para inyección en el CG/EM

En un vial de vidrio de 20 mL para automuestreador de espacio de cabeza, según prueba a realizar, se agregó 100 mg de cloruro de sodio, 1 mL de estándar interno (propan-1-ol 0,02 %) y 200 µL de patrón de calibración, material fortificado o muestra sanguínea según corresponda posteriormente se cerró herméticamente con tapa colapsible, se agitó en vórtex y se inyectó en el equipo CG/EM.

3.6.3. Identificación y cuantificación del etanol por espectrometría de masas

El etanol y propan-1-ol de las soluciones para inyección en el CG/EM fueron identificados por comparación de los espectrómetros de masas obtenidos en *full scan* (28 - 65 uma) del espectrómetro de masas con las bibliotecas del mismo y para la cuantificación del etanol se generó un cromatograma filtrando el fragmento iónico 31 del cromatograma *full scan* del que se obtuvieron numéricamente la relación de áreas (etanol/propan-1-ol) para los cálculos cuantitativos, empleando al propan-1-ol como estándar interno⁴⁵.

3.6.4. Modelo de calibración del CG/EM⁴⁶

3.6.4.1. Preparación del estándar interno propan-1-ol al 0,02 %

En un matraz volumétrico de 1000 mL se adicionó 100 mL de agua ultrapura y 200 μ L de propan-1-ol, se aforó con agua ultrapura hasta enrasar y se agitó.

3.6.4.2. Preparación de patrones de calibración

A) Preparación de solución stock de etanol a 10,0 g/L

Se pesó en balanza analítica 1,0 g de etanol en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con agua ultrapura y agitó hasta homogenización total.

B) Preparación de patrones de calibración

Se preparó los patrones de calibración de etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L; 4,0 g/L y 5,0 g/L de la siguiente manera: en matraces volumétricos de 5 mL, previamente rotulados se agregó 500 μ L de agua ultrapura, solución stock según tabla 2, agua ultrapura hasta enrasar y se homogenizó por agitación.

Tabla 2. Volumen adicionado de solución stock de etanol para preparación de patrón de calibración en diferentes concentraciones.

Patrón de calibración (g/L)	Volumen de solución stock adicionado (μ L)
0,1	50
0,5	250
1,0	500
2,0	1000
3,0	1500
4,0	2000
5,0	2500

Fuente: elaboración propia, setiembre 2022.

3.6.4.3. Calibración del equipo

Se analizó soluciones para inyección en el CG/EM de patrones de calibración con etanol a concentración de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por duplicado y se procedió a realizar la calibración utilizando como estándar interno al propan-1-ol al 0,02 % y graficando como respuesta del equipo la relación de áreas etanol/propan-1-ol.

3.6.5. Validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM

3.6.5.1. Preparación de soluciones para validación

3.6.5.1.1. Preparación de material fortificado con etanol

A) Preparación de la solución stock de etanol a 10 g/L

Se pesó 1,0 g de etanol en un matraz volumétrico de 100 mL en balanza analítica, se aforó con sangre total y agitó vigorosamente hasta la homogenización total.

B) Preparación de los materiales fortificados con etanol

Se preparó material fortificado con etanol a las concentraciones de: 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L de la siguiente manera: en matraces volumétricos de 5 mL previamente rotulados se agregó 500 µL de sangre total, solución stock según la tabla 3, luego se adicionó sangre total hasta enrazar y se homogenizó por agitación.

Tabla 3. Volumen adicionado de solución stock de etanol para preparación de material fortificado en diferentes concentraciones.

Material fortificado (g/L)	Volumen de solución stock adicionado (µL)
0,1	50
0,5	250
1,0	500
2,0	1000
3,0	1500
4,0	2000

Fuente: elaboración propia, setiembre 2022.

3.6.5.1.2. Preparación de solución selectividad

Se preparó una solución de 1 g/L de metanol, etanal, etanol, propan-2-ol, propanona y propan-1-ol de la siguiente manera: en un matraz volumétrico de 1000 mL se agregó aproximadamente 100 mL de agua ultrapura luego se adicionó 1,0 g de cada componente descrito, se aforó con agua ultrapura y agitó hasta homogenización total⁴⁶.

3.6.5.2. Evaluación de las características de desempeño de método analítico^{37,38,39,40,48}

Para la validación del método desarrollado para determinar de alcoholemia por CG/EM se evaluó las características de desempeño recomendadas por la EURACHEM.

3.6.5.2.1. Selectividad

Se inyectó en el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas solución selectividad por duplicado. Se evaluó la capacidad del método para diferenciar los componentes de la solución, así como la aptitud del sistema cromatográfico.

3.6.5.2.2. Sensibilidad

La sensibilidad se valoró cuantitativamente en términos de límite de detección y límite de cuantificación. Para su determinación se calibró el equipo por el método desarrollado y se analizó en condiciones de repetibilidad solución para inyección en el CG/EM por decuplicado empleando como muestra material fortificado con etanol a concentración de 0,1 g/L obteniendo el resultado cuantitativo del que se calculó la desviación estándar corregida (S'_0) según la fórmula:

$$S'_0 = \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

DS: desviación estándar típica, n: número de inyecciones

A. Límite de detección (LD)

El límite de detección se calculó multiplicando de la desviación estándar corregida por tres.

$$LD = S'_0 \times 3$$

B. Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se calculó multiplicando la desviación estándar corregida por diez.

$$LC = S'_0 \times 10$$

3.6.5.2.3. Linealidad

Se evaluó la linealidad del instrumento (CG/EM) y del método desarrollado para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas dentro del rango de trabajo definido en el alcance del método.

Para la linealidad del instrumento, se analizó tres grupos de soluciones para inyección en el CG/EM de patrones de calibración hasta 120 % del rango del trabajo definido, incluyendo concentraciones de etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L,

4,0 g/L y 5,0 g/L por duplicado. Posteriormente se analizó si la respuesta del equipo es proporcional a las concentraciones inyectadas mediante estadística de regresión lineal, análisis de residuales y ANOVA.

Para estimar la linealidad del método desarrollado en el intervalo de trabajo, se calibró el CG/EM por el método desarrollado, luego se analizaron tres grupos de soluciones para inyección de material fortificado con etanol a concentración de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por duplicado, midiendo sus concentraciones. Finalmente se analizó la relación entre las concentraciones fortificadas vs. concentraciones medidas evaluando el gráfico obtenido mediante estadística de regresión lineal, análisis de residuales y ANOVA.

3.6.5.2.4. Exactitud

La exactitud se valoró cuantitativamente en términos de recuperación, por lo que se analizó soluciones para inyección en el CG/EM con material fortificado con etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado, luego se midió las concentraciones, finalmente se comparó porcentualmente las concentraciones medidas con las concentraciones fortificadas.

3.6.5.2.5. Precisión

La precisión del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas se evaluó mediante repetibilidad y precisión intermedia.

A. Repetibilidad

Se examinó soluciones para inyección en el CG/EM de material fortificado con etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado, luego se calculó las concentraciones y finalmente se analizó estadísticamente la dispersión de los resultados en cada concentración.

B. Precisión intermedia

Dos analistas en días distintos procesaron independientemente los mismos materiales fortificados con etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado en el CG/EM empleando el método desarrollado, posteriormente

se realizó el análisis de la dispersión de los resultados obtenidos de los analistas y su comparación estadística.

3.6.5.2.6. Robustez

Se realizaron variaciones del método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM en los parámetros instrumentales y en la preparación de las soluciones para inyección de acuerdo la tabla 4 a fin de evaluar si cambios aleatorios afectan los resultados, analizando material fortificado con etanol a concentraciones de 0,5 g/L y 2,0 g/L con las variaciones según la tabla 5 y se comparó estadísticamente los resultados.

Tabla 4. Variaciones en el método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM para análisis de robustez.

Muestreador de espacio de cabeza	A	Temperatura del horno	Normal	70 °C
			+	72 °C
			-	68 °C
	B	Tiempo de incubación	Normal	15 min
			+	17 min
			-	13 min
	C	Temperatura de la aguja	Normal	70 °C
			+	72 °C
			-	68 °C
D	Volumen de inyección	Normal	1,0 mL	
		+	1,1 mL	
		-	0,9 mL	
Cromatógrafo de gases	E	Split	Normal	20
			+	21
			-	19
	F	Temperatura del horno	Normal	40 °C
			+	41 °C
			-	39 °C
Preparación de muestra	G	Volumen del estándar interno	Normal	1000 µL
			+	1005 µL
			-	995 µL
	H	Volumen de muestra	Normal	200 µL
			+	205 µL
-	195 µL			

Fuente: elaboración propia, octubre 2022

Tabla 5. Matriz con variaciones en el método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM para evaluar robustez.

Material fortificado inyectado (g/L)	Variaciones realizadas							
	A	B	C	D	E	F	G	H
0,5	+	+	+	+	+	+	-	-
0,5	+	-	-	+	-	+	+	+
0,5	-	+	+	-	+	-	+	+
0,5	+	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	+	-	+	+	-	-	+
2,0	+	-	+	+	-	-	+	-
2,0	-	+	-	-	+	+	+	-
2,0	-	-	+	-	-	+	-	-
2,0	+	-	-	-	-	-	+	+
2,0	-	+	-	-	+	+	+	+

Fuente: elaboración propia, octubre 2022

Finalmente se corroboró estadísticamente la variación de los resultados y los tiempos de retención.

3.6.6. Aplicación forense: análisis de muestras de sangre para determinar alcoholemia por CG/EM

3.6.6.1. Calibración del equipo CG/EM

Se preparó patrones de calibración con etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L, los que fueron inyectados en el equipo CG/EM por el método desarrollado para la calibración del equipo.

3.6.6.2. Análisis de alcoholemia en muestras de sangre por CG/EM

Se realizó el análisis de alcoholemia por duplicado⁴⁹ de veinte muestras de sangre extraídas de personas involucradas en diversos delitos y que fueron conducidos por personal policial al Área de Toma de Muestras del Departamento de Química y Toxicología Forense de la Dirección de Criminalística (DIRCRI) de la Policía Nacional del Perú, comparando con los resultados emitidos por la institución y evaluando su factibilidad para ser aplicado con fines forenses.

3.7. Procesamiento de los datos

El procesamiento de datos de las soluciones inyectadas en el equipo CG/EM se realizó mediante la aplicación del software Chromeleon® 7.2.10. El procesamiento de los resultados analíticos en el cálculo de las diferentes áreas de los picos cromatográficos reportado por el equipo, gráficos de dispersión y análisis estadístico se empleó el software de hojas de cálculo Microsoft® Excel 2019⁴².

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Desarrollo del método para determinar alcoholemia por CG/EM

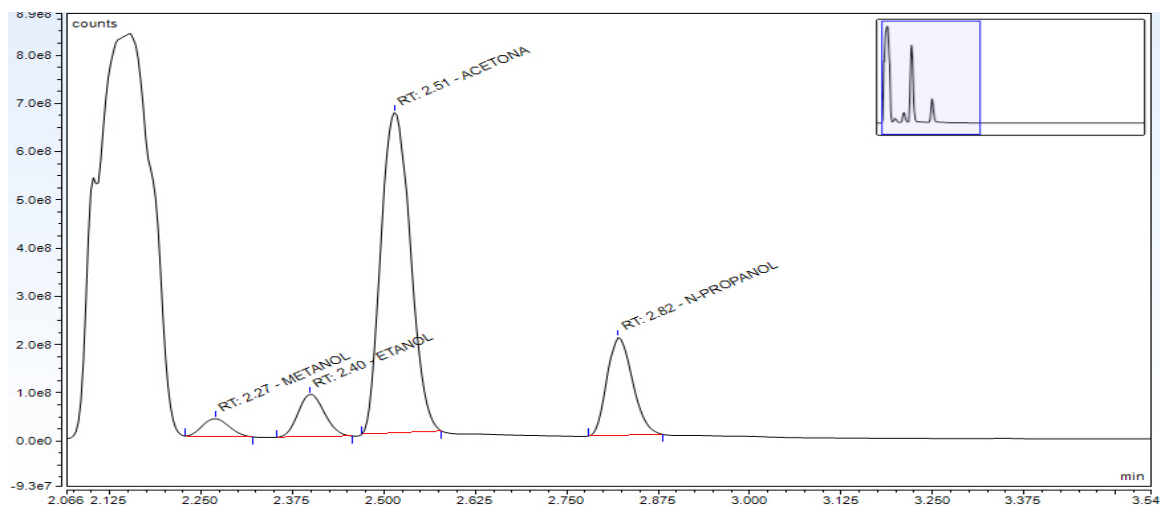


Figura 7. Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total empleando columna capilar TG[®]-5MS.

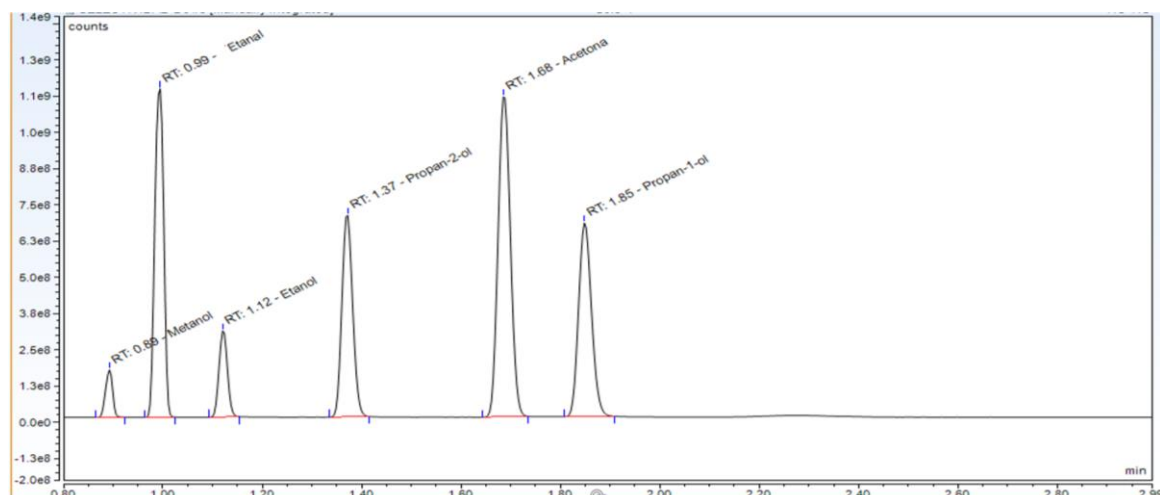


Figura 8. Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total empleando columna capilar TG[®]-ALC1.

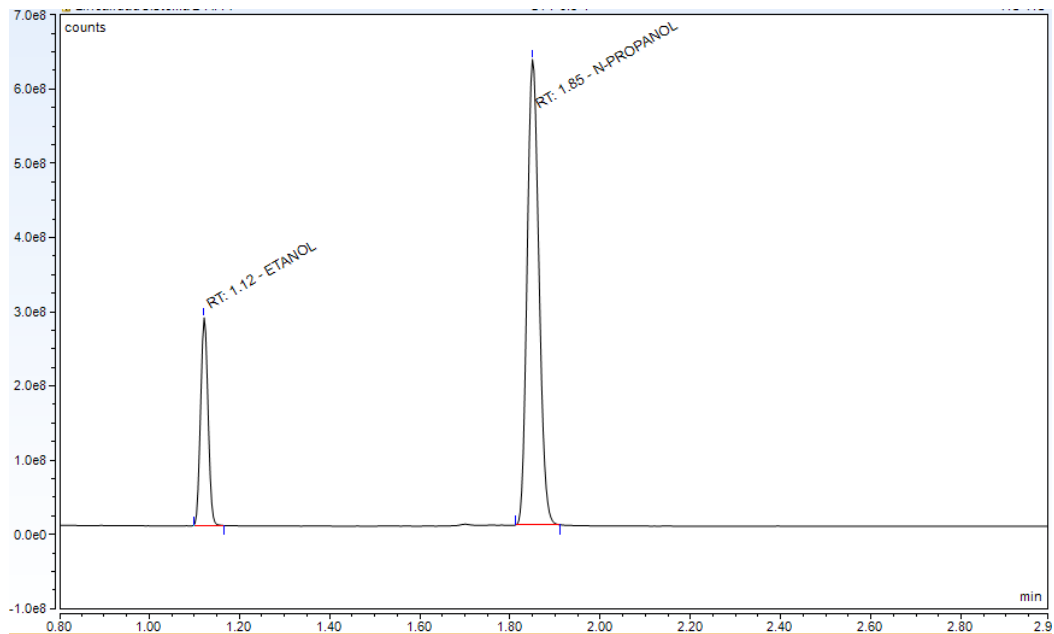


Figura 9. Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 1 mL de material fortificado con etanol a concentración de 0,1 g/L y 1,0 mL de propan-1-ol al 0,1 % empleando columna capilar TG[®]-ALC1.

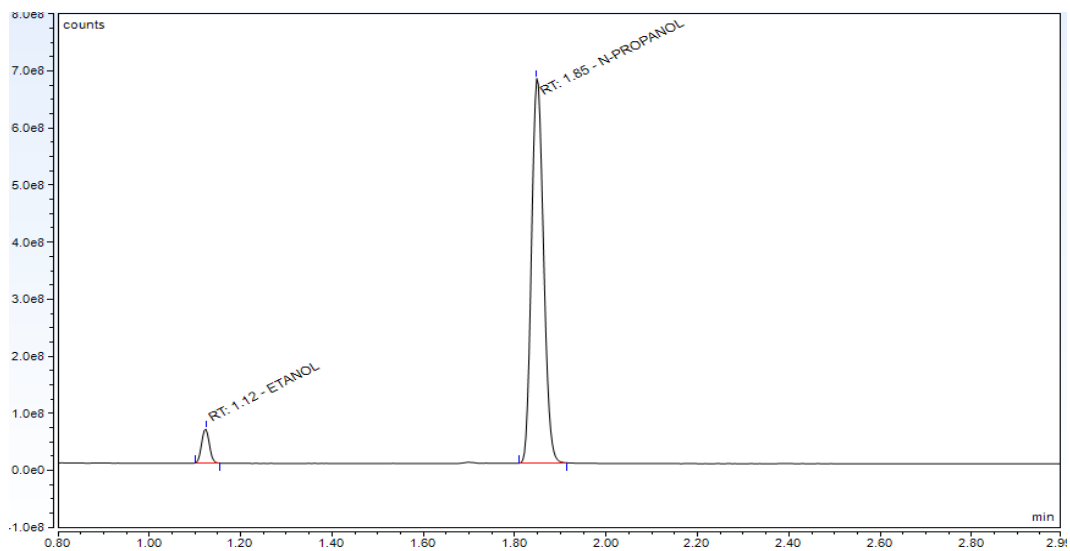


Figura 10. Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 200 μ L de material fortificado con etanol a concentración de 0,1 g/L y 1,0 mL de propan-1-ol al 0,02 % empleando columna capilar TG[®]-ALC1.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas optimizadas para análisis de alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas empleando columna capilar TG[®]-ALC1.

Parámetros instrumentales	Valores
Automuestrador de espacio de cabeza:	
Temperatura del horno	70 °C
Tiempo de incubación	15 min
Temperatura de la aguja	70 °C
Volumen de inyección	1 mL
Cromatógrafo de gases	
Temperatura del inyector	150 °C
Gas Carrier	Helio
Flujo	5 mL/min
Temperatura del horno	40 °C (isotérmico)
Tiempo de corrida	3 min
Espectrómetro de masas	
Temperatura de línea de transferencia	280 °C
Temperatura de fuente de iones	240 °C
Modo/rango de masas	Full Scan (28 - 65 uma)

Fuente: elaboración propia, noviembre 2022.

4.2. Identificación del etanol y propan-1-ol por EM

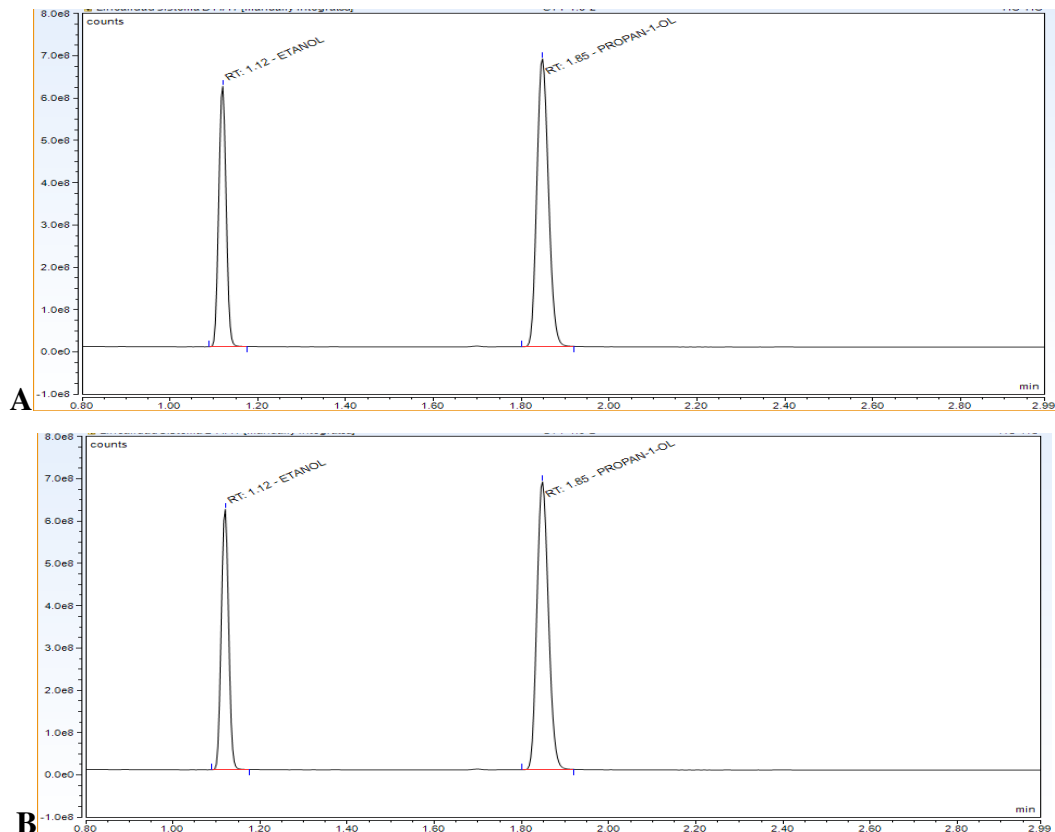


Figura 11. (A) Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 200 μ L de material fortificado con etanol a concentración de 1,0 g/L y 1,0 mL de propan-1-ol al 0,02 % empleando columna TG[®]-ALC1 y condiciones cromatográficas optimizadas, (B) Filtro de masas del fragmento iónico 31 extraído del cromatograma A, donde se observa picos cromatográficos en los 1,12 y 1,85 min.

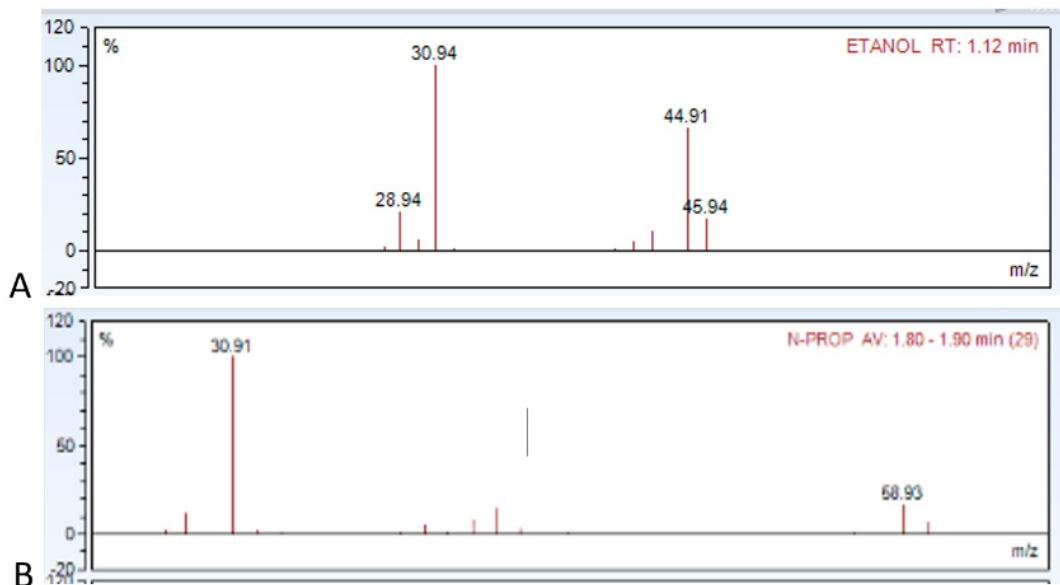


Figura 12. (A) Espectro de masas del componente eluido a los 1,12 min del cromatograma de la figura 11(A) y (B) Espectro de masas del componente eluido a los 1,85 min del del cromatograma de la figura 11(A).

Tabla 7. Fragmentos de masas y sus abundancias relativas de los picos cromatográficos identificados por el espectrómetro de masas en la figura 11(A) en los 1,12 min y 1,85 min.

Componente eluido en los 1,12 min		Componentes eluido en los 1,85 min	
Fragmento iónico (uma)	Abundancia relativa (%)	Fragmento iónico (uma)	Abundancia relativa (%)
31	99,9	31	99,9
45	66,0	59	16,2
29	21,2	42	14,9
46	17,3	26	11,6
43	10,9	41	7,9
30	6,2	60	6,4
42	5,0	39	5,1
28	2,6	43	3,4
32	1,1	28	2,2

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022.

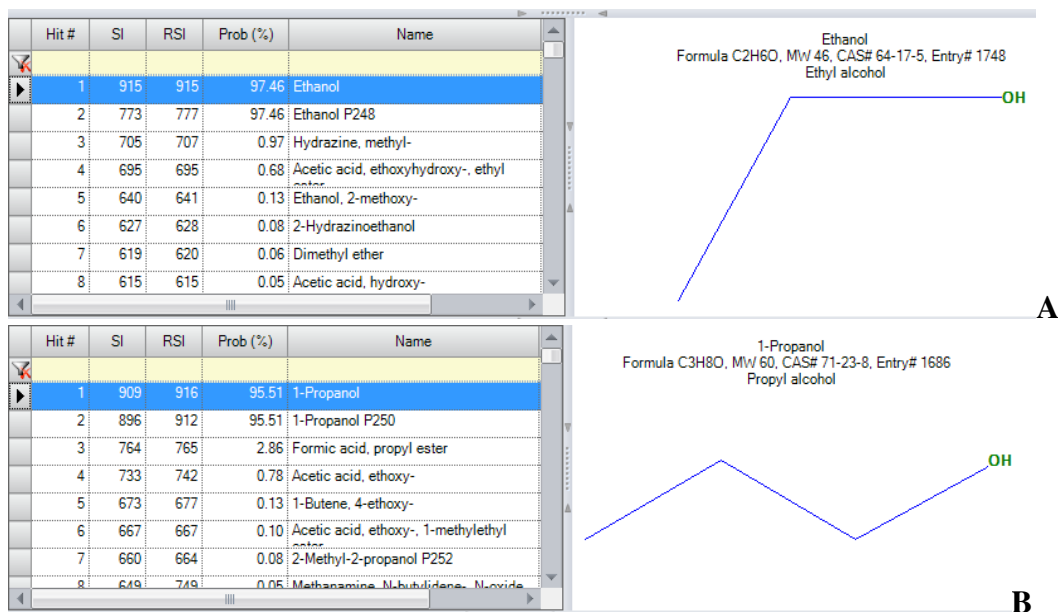


Figura 13. Identificación de los picos cromatográficos y de sus espectros de masas de las figuras 11(A), 12 (A), 12 (B) y tabla 7 empleando las bibliotecas del espectrómetro de masas (A) Identificación del pico cromatográfico en el tiempo de retención 1,12 min correspondiente al etanol al 97,46 % de probabilidad y (B) Identificación del pico cromatográfico en el tiempo de retención 1,85 min correspondiente al propan-1-ol al 95,51 % de probabilidad.

4.3. Calibración del cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas

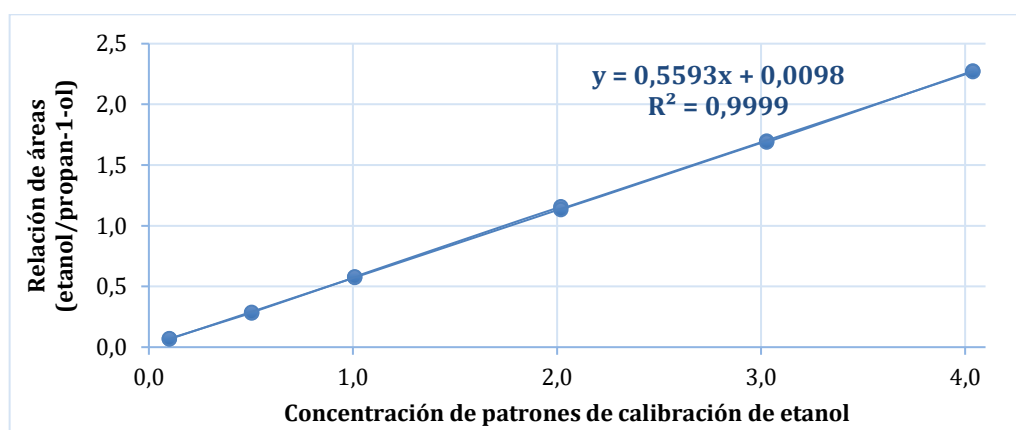


Figura 14. Curva de calibración del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas graficando los patrones de calibración de etanol a concentración de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L vs. respuesta del equipo (relación de áreas etanol/propan-1-ol).

4.4. Validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM

4.4.1. Selectividad

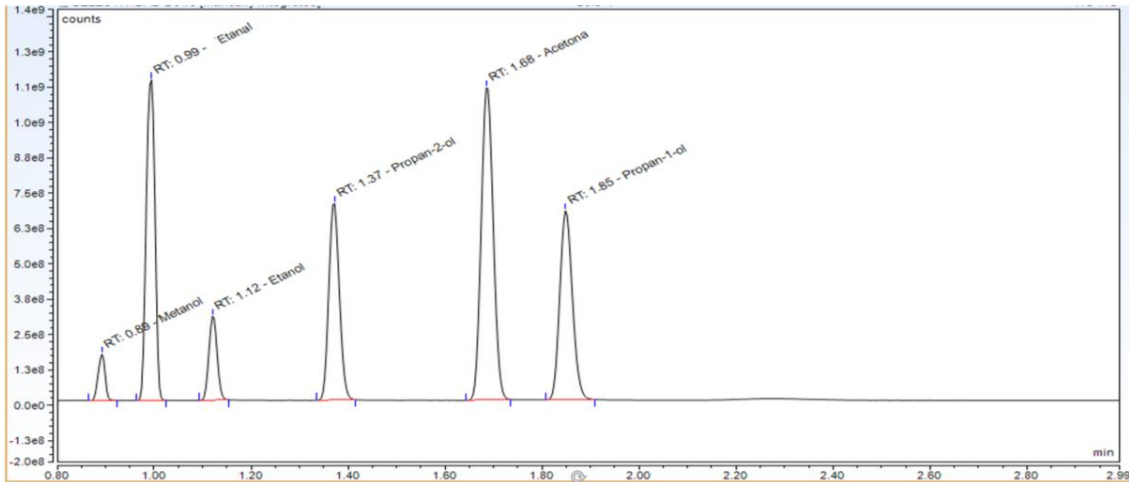


Figura 15. Cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar solución selectividad con metanol (t_R : 0,89 min), etanal (t_R : 0,99 min), etanol (t_R : 1,12 min), propan-2-ol (t_R : 1,37 min), propanona (t_R :1,68 min) y propan-1-ol (t_R : 1,85 min) en sangre total.

4.4.2. Sensibilidad

4.4.2.1. Cálculo de la desviación estándar corregida

Tabla 8. Cálculo de la desviación estándar corregida a partir del análisis de material fortificado con etanol al 0,1 g/L

Material fortificado con etanol	Concentración de etanol medido (g/L)
MFEt1	0,101
MFEt2	0,101
MFEt3	0,102
MFEt4	0,099
MFEt5	0,104
MFEt6	0,101
MFEt7	0,097
MFEt8	0,100
MFEt9	0,105
MFEt10	0,100
\bar{x}	0,101
DS	0,002

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022.

MFEt: material fortificado con etanol al 0,1 g/L, \bar{x} : promedio, DS: desviación estándar.

$$\text{Desviación estándar corregida (S`_0)} \quad S`_0 = \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

$$S`_0 = \frac{0,002}{\sqrt{10}} \quad S`_0 = \mathbf{0,00071}$$

4.4.2.2. Cálculo del límite de detección (LD)

$$LD = S`_0 \times 3 = 0,0071 \times 3 = \mathbf{0,00213 \text{ g/L}}$$

4.4.2.3. Cálculo del límite de cuantificación (LC)

$$LC = S_0 \times 10 = 0,0071 \times 10 = 0,00710 \text{ g/L}$$

4.4.3. Linealidad

4.4.3.1. Linealidad para el instrumento CG/EM

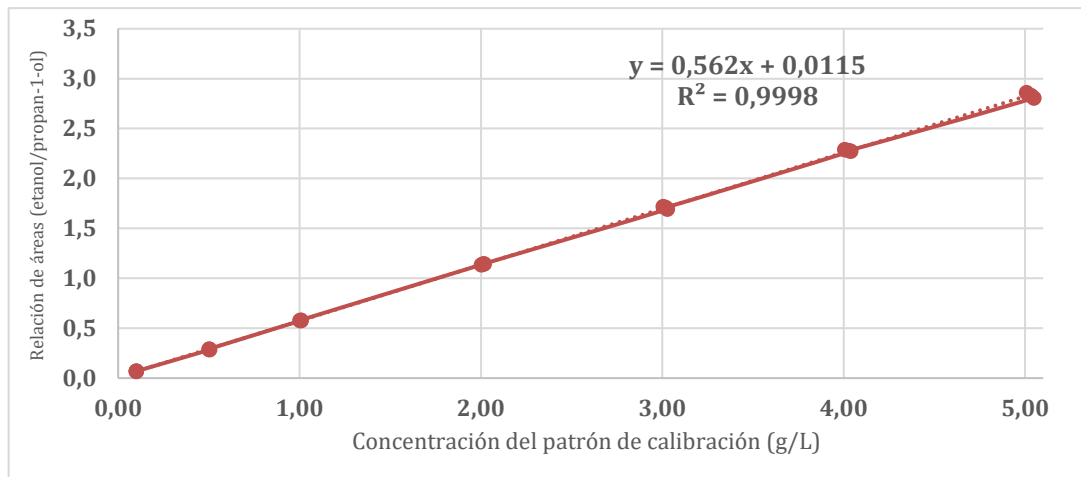


Figura 16. Dispersión de las concentraciones de etanol inyectado (g/L) en el CG/EM vs. relación de áreas etanol/propan-1-ol para evaluación de linealidad del instrumento.

4.4.3.2. Linealidad para el método de determinar alcoholemia por CG/EM en el intervalo de trabajo

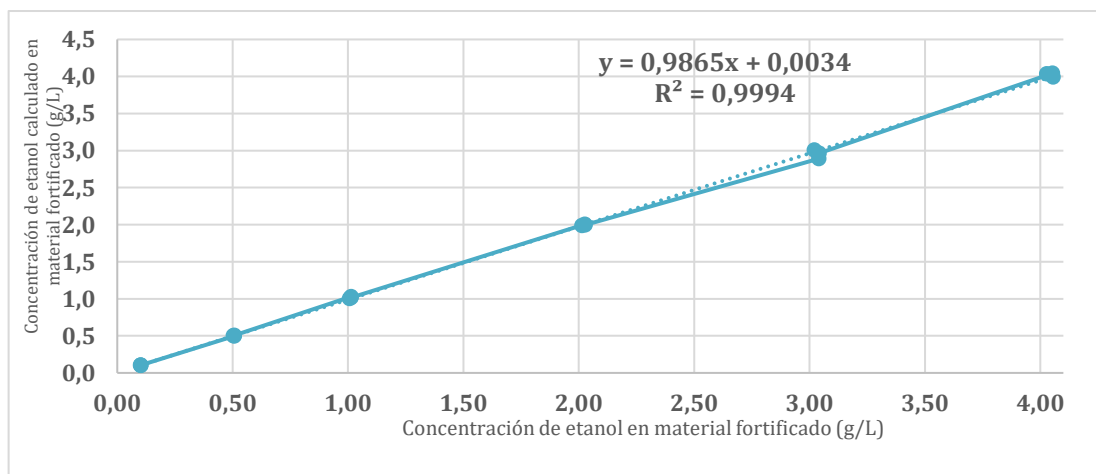


Figura 17. Dispersión de la concentración de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM vs. concentración de etanol medido por el método desarrollado.

4.4.4. Exactitud:

Tabla 9. Análisis estadístico del porcentaje de recuperación de etanol empleando material fortificado a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM.

Concentraciones de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM (g/L)	Recuperación de etanol en material fortificado g/L							\bar{x} (%)
0,101	101,44	100,91	101,32	98,84	101,67	100,94	100,69	
0,506	98,84	98,81	99,45	100,22	99,84	99,92	99,77	
1,013	101,58	100,18	100,51	98,82	98,39	101,15	100,20	
2,027	99,30	98,66	99,09	100,62	99,07	100,35	99,51	
3,040	99,41	99,83	99,42	99,94	99,77	99,84	99,71	
4,053	99,47	100,02	100,01	99,74	100,39	99,32	99,83	

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022.

4.4.5. Precisión

4.4.5.1. Repetibilidad

Tabla 10. Análisis estadístico de repetibilidad del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM.

Concentraciones de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM (g/L)	Concentraciones de etanol medidos aplicando el método desarrollado (g/L)						Análisis estadístico		
	\bar{x} (g/L)	DS (g/L)	CV (%)						
0,101	0,102	0,102	0,103	0,100	0,104	0,102	0,102	0,001	1,17
0,506	0,500	0,497	0,504	0,504	0,505	0,501	0,502	0,003	0,59
1,013	1,030	1,029	1,020	0,997	1,001	0,015	1,015	0,014	1,36
2,027	2,012	1,999	2,008	2,034	2,008	2,034	2,017	0,016	0,79
3,040	3,022	3,035	3,022	3,039	3,033	3,035	3,031	0,007	0,24
4,053	4,031	4,054	4,054	4,069	4,043	4,026	4,046	0,016	0,40

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022. \bar{x} : promedio, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

4.4.5.2. Precisión intermedia.

Tabla 11. Análisis estadístico de precisión intermedia del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en CG/EM.

Concentraciones de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM (g/L)	Analista	Concentraciones de etanol medidos aplicando el método desarrollado (g/L)						Análisis estadístico		
		\bar{x} (g/L)	DS (g/L)	CV (%)						
0,101	A1	0,102	0,102	0,103	0,100	0,105	0,102	0,102	0,0017	1,59
	A2	0,101	0,103	0,100	0,101	0,099	0,105			
0,506	A1	0,500	0,497	0,504	0,497	0,497	0,501	0,504	0,0054	0,99
	A2	0,514	0,504	0,511	0,502	0,497	0,504			
1,013	A1	1,030	1,029	1,020	0,997	0,994	1,015	1,011	0,0134	1,26
	A2	0,999	1,019	1,000	0,994	1,021	1,014			
2,027	A1	2,012	1,999	2,008	2,039	2,008	2,034	2,018	0,0398	1,97
	A2	2,087	1,954	2,024	1,954	2,034	2,064			
3,040	A1	3,022	3,035	3,022	3,065	3,033	3,035	3,026	0,0210	0,69
	A2	3,025	2,981	3,026	2,997	3,065	3,034			
4,053	A1	4,031	4,054	4,054	4,069	4,043	4,026	4,033	0,0279	0,69
	A2	4,006	4,042	3,977	4,052	3,994	4,052			

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022. A1: Analista 1, A2: Analista 2.

4.4.6. Robustez

Tabla 12. Tiempos de retención reportados del etanol y propan-1-ol cuando son analizados por el método desarrollado con ligeras variaciones según tablas 4 y 5 empleando material fortificado con etanol a concentraciones de 0,5 g/L y 2,0 g/L.

Material fortificado (g/L)	t _R (min)		Material fortificado (g/L)	t _R (min)	
	Etanol	Propan-1-ol		Etanol	Propan-1-ol
0,5	1,107	1,807	2,0	1,134	1,892
0,5	1,106	1,807	2,0	1,134	1,896
0,5	1,110	1,811	2,0	1,107	1,807
0,5	1,111	1,812	2,0	1,107	1,807
0,5	1,137	1,892	2,0	1,110	1,811
0,5	1,134	1,892	2,0	1,107	1,808
0,5	1,137	1,892	2,0	1,134	1,892
0,5	1,137	1,892	2,0	1,137	1,892
0,5	1,134	1,893	2,0	1,107	1,807
0,5	1,134	1,892	2,0	1,107	1,807
\bar{x}	1,124	1,859	\bar{x}	1,118	1,841
DS	0,014	0,043	DS	0,014	0,044
CV	1,250	2,305	CV	1,263	2,389

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022. t_R: tiempo de retención.

4.5. Aplicación forense: análisis de muestras de sangre para determinar alcoholemia por CG/EM

4.5.1. Calibración del equipo CG/EM

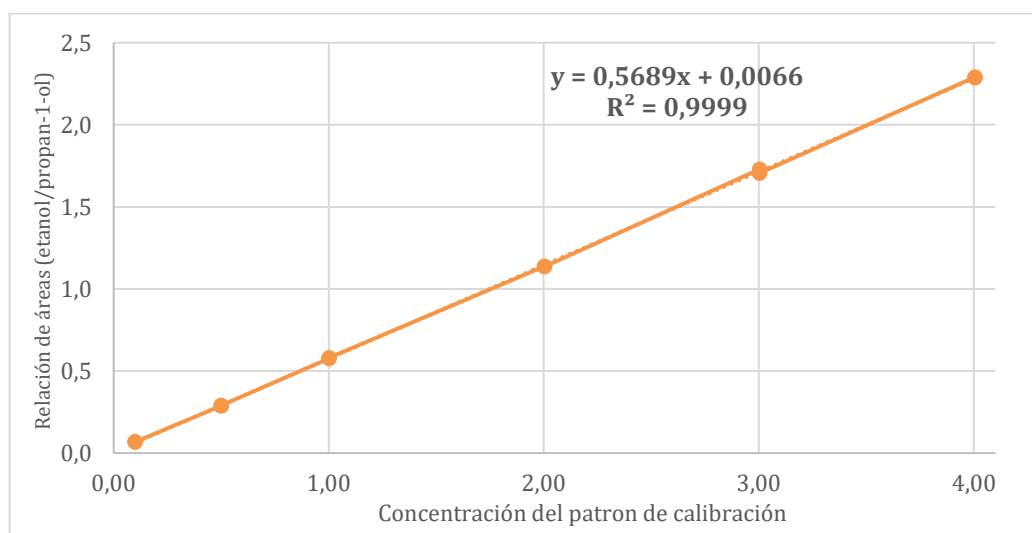


Figura 18. Curva de calibración generada en un análisis de alcoholemia por CG/EM inyectado patrones de calibración de etanol a concentraciones de 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L.

4.5.2. Análisis de alcoholemia en muestras de sangre por CG/EM

Tabla 13. Alcoholemia en muestras de personas involucradas en diversos delitos que fueron conducidos a la Dirección de Criminalística PNP para extracción de muestra sanguínea en el Área de toma de muestra del Departamento de Química y Toxicología Forense.

Código de muestra	Concentraciones de etanol medido por el método desarrollado			Resultado emitido por la DIRCRI PNP (g/L)
	Análisis 1 (g/L)	Análisis 2 (g/L)	Promedio (g/L)	
MS1	1,704	1,705	1,705	1,71
MS2	1,195	1,196	1,196	1,20
MS3	0,604	0,604	0,604	0,60
MS4	2,012	2,012	2,012	2,01
MS5	2,804	2,806	2,805	2,80
MS6	0,207	0,208	0,208	0,21
MS7	1,844	1,843	1,844	1,85
MS8	1,125	1,125	1,125	1,12
MS9	2,405	2,404	2,405	2,41
MS10	1,548	1,549	1,549	1,55
MS11	1,305	1,306	1,306	1,31
MS12	0,874	0,876	0,875	0,89
MS13	0,503	0,504	0,504	0,51
MS14	1,121	1,123	1,122	1,12
MS15	0,908	0,907	0,908	0,90
MS16	2,212	2,214	2,213	2,21
MS17	0,706	0,707	0,707	0,71
MS18	2,458	2,456	2,457	2,50
MS19	0,185	0,184	0,185	0,19
MS20	0,788	0,786	0,787	0,80

Fuente: elaboración propia, diciembre 2022. MS: muestra sanguínea.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

El etanol, es una droga social legalmente permitida y muy abusada en nuestra sociedad, es ampliamente consumido por la mayoría de la población adulta, el consumo excesivo entre otros procesos patológicos altera el sistema nervioso distorsionando la percepción y el pensamiento lentificando las reacciones, que trae como consecuencias alteraciones en el razonamiento potenciando las emociones, desinhibiendo la conducta, pudiendo generar accidentes de tránsito y otros delitos punibles⁵⁰.

En Perú la CG/EM aún no es utilizada como técnica analítica para la determinación de alcoholemia, sin embargo, en el mundo se han publicado diversos estudios mostrando la aplicación de esta tecnología para la cuantificación de etanol en sangre donde resaltan su selectividad y especificidad sobre otros métodos^{1,2}. En este estudio se presenta el desarrollo y validación de un método para determinar de alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas para su aplicación en casos forenses evaluando las características de desempeño recomendadas por la EURACHEM³⁷.

El análisis de etanol empleando automuestreador de espacio de cabeza, es un método rápido que no requiere preparación de la muestra por ser un componente volátil, la extracción de la matriz se da cuando se adiciona calor a la muestra, el etanol pasa a su fase de vapor para ser inyectado en el cromatógrafo de gases⁵¹, empleando comúnmente el detector de ionización por llama, que nos ofrece un alto nivel de sensibilidad⁵², sin embargo, el análisis podría ser mejorado por la detección con espectrometría de masas que nos proporciona mejor selectividad³.

La separación de los componentes de una muestra en el cromatógrafo de gases se da en la columna cromatográfica, existiendo variedad de ellas de diferentes características respecto longitudes, espesores, tamaños y tipos de recubrimiento interno destinadas a diferentes análisis. Para el desarrollo del método para determinar alcoholemia por CG/EM se pusieron a prueba las columnas TG[®]-5MS y TG[®]-ALC1. La columna capilar TG[®]-5MS es común para análisis toxicológicos, separa muy bien los componentes semipolares como drogas de abuso, venenos y algunos fármacos⁵³, por lo que potencialmente podría ser aplicado en alcoholemia², así que se probó su capacidad de resolución inyectado solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total, la figura 7 presenta el cromatograma en *full scan*

(28 - 65 uma) reportado por el CG/EM de la solución precedente donde se evidencia que no hay buena separación entre los componentes inyectados, incluso la propanona y el propan-2-ol se juntan en un solo pico, se observa además un pico grande en el minuto 2,15 que corresponde al aire ambiental muy cerca al metanol, también se aprecia picos demasiado anchos en su base, finalmente el etanal está coeluyendo con algún otro componente, aumentando su señal, por lo que no es recomendable su uso en análisis de alcoholemia.

la figura 8 presenta el cromatograma en *full scan* reportado por el CG/EM después de haber inyectado solución conteniendo metanol, etanal, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol y propanona a concentración de 1,0 g/L en sangre total utilizando una columna capilar TG[®]-ALC1 donde se logra apreciar muy buena separación de los componentes inyectados, eluyendo todos antes de los dos minutos mostrando buena resolución, picos bien definidos, simétricos, delgados e independientes uno del otro, lo que nos permitió realizar el análisis instrumental en tres minutos optimizando el tiempo de trabajo, por lo que se optó por seleccionar ésta columna para continuar con el desarrollo del método.

En el diseño de métodos analíticos se busca optimizar los recursos, empleando la menor cantidad de muestra, reactivos en el menor tiempo de análisis³⁷. El detector de los espectrómetros de masas tiene tiempo de vida limitado debido a que se va saturando de materia en cada inyección realizada, lo que va disminuyendo su sensibilidad, por lo que el tiempo de vida útil del detector del equipo es inversamente proporcional a la cantidad de muestra inyectada. Así que el objetivo del diseño del método es emplear la menor cantidad de muestra en el menor tiempo posible a fin de contribuir con el cuidado del equipo y lograr mayor productividad, sin interferir en la selectividad ni sensibilidad del método.

Luego de haber seleccionado la columna TG[®]-ALC1 se procede a seleccionar la cantidad de muestra y reactivos a inyectar. La figura 9 indica el cromatograma en *full scan* reportado por el CG/EM después de haber inyectado 1,0 mL de sangre fortificada con etanol al 0,1 g/L y 1,0 mL de propan-1-ol al 0,1 % en el CG/EM, apreciándose excelente señal de alrededor de 300 000 000 de cuentas, sin embargo, siguiendo la premisa de inyección de la menor cantidad de muestra se probó inyectando la quinta parte, midiendo en un vial 200 µL de muestra y 1,0 mL de propan-1-ol al 0,02 % que se observa en la

figura 10 donde se aprecia buena señal para el etanol de alrededor de 100 000 000 cuentas, valores que son considerados por el equipo para el cálculo de la relación de áreas (etanol/propan-1-ol), empleados matemáticamente para los análisis cuantitativos del etanol, seleccionando éste volumen para continuar con el desarrollo del método. El presente método utilizó como estándar interno el propan-1-ol por el parecido químico al etanol para corrección de las fluctuaciones aleatorias instrumentales y del método que puede compensar errores aleatorios como sistemáticos^{28,31}.

Luego de haber seleccionado la columna, los volúmenes añadidos de muestra y del estándar interno, se procedió a optimizar los parámetros instrumentales del método, por lo que se realizó pruebas variando la temperatura del horno del automuestreador de espacio de cabeza; temperaturas del horno del cromatógrafo de gases (isotermas y rampas), volumen de inyección, flujo del gas de arrastre y *split* tomando como referencia estudios previos y notas de aplicación del fabricantes de equipos^{1,3,43,44}, seleccionando las condiciones instrumentales que generaron la mejor resolución de los componentes inyectados en el menor tiempo sin interferir con la selectividad del método, que se detallan en la tabla 6. Con todas estas pruebas, se logró desarrollar el nuevo método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas empleando columna capilar TG[®]-ALC1, 200 µL de muestra, 1,0 mL de estándar interno propan-1-ol al 0,02 % y adicionando cloruro de sodio como agente liberador que aumenta la presión de vapor de los no electrolitos y aumenta la sensibilidad de los análisis⁵².

La figura 11 (A) exhibe el cromatograma en *full scan* (28 - 65 uma) reportado por el CG/EM al inyectar 1,0 mL de sangre fortificada con etanol a concentración de 1,0 g/L y 1,0 mL propan-1-ol al 0,02 %, donde se aprecia picos cromatográficos en los tiempos de retención de 1,12 y 1,85 min. El espectrómetro de masas puede ser configurado para que adquiera datos en un rango de masas determinado excluyendo de esta manera muchos interferentes que posean masa molecular diferente al rango programado, se seleccionó el rango de masas de 28 a 65 uma debido a que el etanol (PM: 46,07 g/mol) y el propan-1-ol (PM: 60,01 g/mol) se encuentran en ese rango y se trabajó en *full scan* para obtener todos los fragmentos iónicos para la identificación del etanol. La figura 11 (B) expone el cromatograma del filtro de masas del fragmento iónico 31 extraído del cromatograma 11 (A) donde se aprecia picos cromatográficos en los mismos tiempos de retención con las mismas intensidades que la figura 11 (A). Cuando se utiliza el filtro de masas para un

determinado fragmento iónico, el software genera un cromatograma con las señales de los componentes que poseen únicamente ese ion, haciendo de la espectrometría de masas una técnica de alta selectividad por direccionar instrumentalmente los análisis al analito o analitos objetivos²⁹. Se filtró el fragmento iónico 31 porque se empleó para graficar el cromatograma del que se obtuvieron las áreas empleadas en cálculos cuantitativos de etanol³⁰.

En las figuras 12 (A) y 12 (B) se observan los espectros de masas de los picos cromatográficos hallados en los tiempos de retención 1,12 min y 1,85 min de la figura 11 (A) y la tabla 7 detalla los fragmentos iónicos reportados con sus respectivas abundancias, observando que el fragmento iónico 31 es el más abundante y común para ambos componentes, por lo que es empleado en su cuantificación; tomando como base la recomendación del comité de asesoría federal de los Estados Unidos de utilizar un fragmento iónico común a ambos para su cuantificación³⁰.

Las figuras 13 (A) y 13 (B) demuestran la identificación espectral que realizó el software Chromeleon® 7.2.10 empleando los espectros de la figura 12 para compararlos con los espectros de las bibliotecas del espectrómetro de masas, identificando al componente retenido a los 1,12 min como etanol con una probabilidad del 97,46 % y el componente retenido a los 1,85 min como propan-1-ol con una probabilidad del 95,51 %. La CG/EM es una combinación de dos técnicas analíticas diferentes como son la cromatografía y la espectroscopía; la cromatografía de gases separa eficientemente los componentes de una muestra y el espectrómetro de masas identifica inequívocamente cada componente en su estructura molecular, esta combinación se ha convertido en el estándar de oro para los laboratorios forenses por su alto grado de selectividad y sensibilidad, lo que proporciona evidencia concluyente⁵⁴.

La técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas, además de tomar la coincidencia de los tiempos de retención con los estándares para la identificación de sustancias, utiliza los fragmentos iónicos del espectro de masas para la identificación molecular de los componentes separados por el CG³⁰. La espectrometría de masas en la identificación y cuantificación de xenobióticos para el comité de Ciencias forenses de Estados Unidos tiene la puntuación más alta en los análisis forenses³⁰ y para el grupo de trabajo científico para análisis de drogas comisadas del Departamento de

Justicia de los Estados Unidos, por su alto poder de discriminación, corresponde a un método de categoría A, por lo que se obtienen resultados concluyentes desde todo punto de vista⁵⁵.

Se observa en la figura 14 la curva de calibración del equipo cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas graficando la dispersión entre las soluciones para inyección de los patrones de calibración a concentraciones de etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L vs. la relación de áreas (etanol/propan-1-ol) de los picos del fragmento iónico 31 extraído del cromatograma en *full scan*. Se puede apreciar una dispersión lineal de orden cero con un coeficiente de determinación de 0,9999 lo que nos pronostica muy buena correlación de datos, para continuar con la validación.

La validación y regulación de métodos son aspectos cruciales de la química analítica en el clima actual de acreditación de laboratorios, inspecciones y garantía de calidad de los resultados utilizados con fines legales, consta de una serie de parámetros conocidos como características de desempeño³⁷. La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de comportamiento similar³⁵. La figura 15 exhibe el cromatograma en *full scan* obtenido después de haber inyectado en el CG/EM metanol, etanal, etanol, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol a concentración de 1,0 g/L, obteniéndose buena resolución de todos los componentes evidenciando buena selectividad del método desarrollado corroborado por los parámetros de idoneidad del sistema muestran una resolución superior a 3 con unos platos teóricos superiores a 12750 como se detalla en el anexo 4, estos resultados son coherentes con los hallados por Tiscinone et al.⁴ Se evaluó los componentes mencionados debido a que son comúnmente encontrados en laboratorios forenses porque son marcadores en severas enfermedades e intoxicaciones agudas y podría ser encontrados en un examen forense de alcoholemia rutinario⁵⁶.

La tabla 8 indica el cálculo de la desviación estándar corregida cuando se analizó soluciones para inyección en el CG/EM de material fortificado con etanol a concentración de 0,1 g/L para evaluación de sensibilidad. Con los valores calculados se demostró que el método desarrollado para determinación de alcoholemia es muy sensible, evidenciado por el límite de detección (0,00213 g/L) y límite de cuantificación (0,00710 g/L). Xiao et al.³

reportaron valores de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ y 39,5 $\mu\text{g/mL}$ como límite de detección y cuantificación respectivamente, asimismo otros autores establecieron muy buena sensibilidad para métodos de alcoholemia empleando espectrometría de masas^{2,4}, esto destaca la potencialidad del método en los análisis de etanol en sangre con otros objetivos como en clínica o en investigación, además de los forenses, considerando que los valores críticos para la toma de decisiones en la legislación peruana son de 0,25 g/L y 0,5 g/L.

En la figura 16 se presenta el gráfico de dispersión entre las concentraciones del etanol de soluciones para inyección de patrones de calibración (g/L) vs. su respuesta instrumental (relación de áreas etanol/propan-1-ol) para evaluación la linealidad del instrumento cromatógrafo de gases/ espectrómetro de masas en el rango de concentraciones de etanol al 1,0 g/L hasta 5,0 g/L, obteniéndose un coeficiente de determinación de 0,9998 por lo que se considera lineal debido a que supera el valor de 0,99³⁵. Se probó hasta 5 g/L, porque las guías sugieren realizar el ensayo hasta 120 % del valor superior del rango de trabajo³⁷. Los cálculos matemáticos para el análisis de linealidad del instrumento y el análisis estadístico de la regresión lineal obtenida se detalla en el anexo 5, que justifica la linealidad del método mediante la prueba F para el ajuste de los datos, que concluye que el modelo si proporciona un buen ajuste de los datos, además la prueba estadística t demuestra que estadísticamente la pendiente es diferente de cero y el intercepto es estadísticamente igual a cero, y el análisis de los residuales generan una distribución aleatoria en torno a cero lo que confirma su linealidad³⁷.

La figura 17 expone el gráfico de la dispersión entre las soluciones para inyección en el CG/EM con material fortificado con etanol a diferentes concentraciones vs. concentraciones calculadas empleando el método en proceso de validación, resultado una muy buena regresión lineal en el rango de concentraciones para el etanol desde 1,0 g/L hasta 4,0 g/L, obteniendo un coeficiente de determinación de 0,9994, por lo que se considera lineal. El límite superior del intervalo de trabajo del método se proyectó hasta 4,0 g/L, basado en que según diversos autores alcoholemia superior a la concentración mencionada son tóxicos e incompatibles con la vida⁵⁷. Además, el anexo 6 reporta los cálculos matemáticos y demuestra estadísticamente la linealidad del método con la prueba F que concluye que el modelo si proporciona un buen ajuste de los datos, la prueba t demuestra que la pendiente es significativamente diferente de cero y el intercepto es significativamente igual a cero y en el análisis de los residuales se observa una

distribución aleatoria en torno a cero lo que confirma su linealidad. Con estas pruebas se confirma linealidad del método desarrollado por CG/EM en el rango de 0,00710 g/L y 4,0 g/L, similar a lo hallado por Iwai et al.² para la linealidad en el rango de trabajo de 0,1 g/L a 5,0 g/L con un coeficiente de determinación superior a 0,998.

La tabla 9 señala el resumen de los porcentajes de recuperación de etanol en material fortificado en diferentes concentraciones en el rango de trabajo analizados por sextuplicado en el CG/EM de soluciones preparadas para evaluación de exactitud donde se observa que el método recuperó entre 98,39 % y 101,67 % en todas las concentraciones, calificándose como un método con alto nivel de exactitud³⁷, resaltando el etanol al 0,5 g/L que tuvo el mejor porcentaje de recuperación de 99,8 %, lo que deja un despreciable margen de error tomando estadísticamente el resultado obtenido como real.

La precisión del método fue evaluando en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La tabla 10 reporta un resumen estadístico para la repetibilidad del método para etanol analizado en diferentes concentraciones en material fortificado dentro del rango de trabajo cuando es analizado por sextuplicado, se observa una dispersión mínima en los resultados de todas las concentraciones con un coeficiente de variación inferior al 1,36 %, lo que resulta muy conveniente, considerando que para determinación de alcoholemia las guías sugieren un coeficiente de variación menor o igual a 10 %⁵⁸, destacando el material fortificado con etanol al 0,5 g/L que tuvo un coeficiente de variación de 0,59 %, por lo que al analizar muestras de concentraciones similares se obtienen resultados precisos con una variación de ($\pm 0,003$ g/L) que resulta imponderable en el redondeo al décimo obteniendo el mismo resultado al repetir inyecciones.

En la tabla 11 exhibe el análisis estadístico de la precisión intermedia del método desarrollado empleando material fortificado a diferentes concentraciones de etanol, analizando los resultados obtenidos por dos analistas cuando procesan las mismas muestras de material fortificado en días distintos. El análisis arrojó un coeficiente de variación inferior a 1,97 % en todas las concentraciones de material fortificado con etanol dentro del rango de trabajo, mientras que Wasfi et al.⁵ reportaron coeficientes de variación inferiores al 5 %, lo que demuestra una baja dispersión de los resultados contribuyendo a la precisión del método desarrollado, además el análisis de varianza de un factor detallado

en el anexo 7 con la prueba estadística F demuestra que los resultados obtenidos entre el analista 1 y analista 2 son estadísticamente iguales resultado un método preciso para los fines cuantitativos en casos forenses como prueba en los tribunales en delitos relacionado al etanol, otorgando los resultados un máximo grado de confiabilidad por su precisión y exactitud demostrados.

En la tabla 12 se encuentran los datos sobre el tiempo de retención del etanol y del propan-1-ol cuando se realiza variaciones deliberadas en el método según las tablas 4 y 5 cuando se inyectó el material fortificado con etanol al 0,5 g/L y 2,0 g/L, así como su análisis estadístico, hallando un coeficiente de variación máximo para el tiempo de retención de 1,26 % para el etanol y de 2,39 % para el propan-1-ol, los que aún se encuentran dentro de la ventana de reconocimiento de los componentes por el equipo. Además, el anexo 8 presenta el análisis estadístico para los resultados cuantitativos medidos empleando el método desarrollado en proceso de validación aplicando la prueba estadística F que concluye que los resultados son estadísticamente iguales, demostrando ser un método robusto ante ligeras variaciones del método.

Se probó el método desarrollado y posteriormente validado para determinar alcoholemia por CG/EM para análisis de muestra reales⁵⁸, en la figura 18 está la curva de calibración con coeficiente de determinación de 0,9999 que se elaboró para la cuantificación de alcoholemia en muestras reales de personas indicando buena correlación y en la tabla 13 están plasmados los resultados de alcoholemia de veinte muestras de sangre de personas involucradas en hechos delictivos extraídos en el Área de Toma de Muestra del Departamento de Química y Toxicología Forense de la Dirección de Criminalística PNP realizando los análisis por duplicado, donde se evidencia que los valores obtenidos en ambas lecturas son similares, y el resultado cuantitativo coincide con el emitido en dicha institución. Lo que demuestra que el método desarrollado y validado tiene aplicabilidad en muestras reales y sería empleado con fines forenses en delitos relacionados con el etanol.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. El nuevo método desarrollado por cromatografía de gases/espectrometría de masas es rápido y de alto rendimiento que permite una identificación más inequívoca del etanol en muestras de sangre de personas aumentando la confianza en los resultados.
2. Se validó el nuevo método desarrollado por cromatografía de gases/espectrometría de masas para la cuantificación de etanol en sangre de personas comprobándose que es selectivo, sensible, lineal, preciso, exacto y robusto.
3. El método se aplicó con éxito para la cuantificación de etanol en muestras de sangre de personas involucradas en diversos delitos, siendo factible su utilización para toxicología forense y clínica en Perú.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prenesti E, Bagnati M, Berto S, Basile M, Vidali M, Bellomo G. Measurement Uncertainty of Ethanol Concentration in Venous Whole Blood Determined By a HS-GC-MS Method. JSM Analytical and Bioanalytical Techniques [Internet]. 2019 [citado 14 de julio 2022]; 4(7): 1-7. Disponible en: <https://www.jsmcentral.org/Analytical/jsmabt123906.pdf>.
2. Iwai M, Kondo F, Suzuki T, Ogawa T, Seno H. Quantification of ethanol in whole blood by extraction using NeedleEx® and gas chromatography/mass spectrometry. Medical Mass Spectrometry [Internet]. 2019 [citado 06 de agosto del 2021]; 3(1): 1-5. Disponible en: http://www.jsbms.jp/english/publish/3-1_iwai.pdf.
3. Xiao HT, He L, Tong RS, Yu JY, Chen L, Zou J, et al. Rapid and sensitive headspace gas chromatography – mass spectrometry method for the analysis of ethanol in the whole blood. J Clin Lab Anal. [Internet]. 2014 [citado 10 de febrero 2022]; 28(5): 386-90. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6807615/>.
4. Tiscione N, Alford I, Tate D, Shan X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. J Anal Toxicol [Internet]. 2011 [Citado 06 de agosto del 2022]; 35(7): 500-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21871160/>.
5. Wasfi I, Hassan A, Nazer Z, Juma F, Abdulla N. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. Journal of Chromatography B [Internet]. 2001 [Citado 06 de agosto del 2022]; 799(2): 331-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14670752/>.
6. National Library of Medicine. Pubchem. National Center for Biotechnology Information [Internet]. 2022 [Citado el 04 de octubre del 2022]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>
7. Wade L. Química Orgánica. 7º ed. México DF: Editorial Pearson Educación de México, SA; 2011. p. 430-40.
8. Mc Murry J. Química Orgánica. 7º ed. México DF: Cengage Learning; 2008. p. 636-7.
9. Hernández E, Bravo B, Mencías E. Alcoholes, cetonas y glicoles. En: Mencías E, Mayero L, editores. Manual de Toxicología Básica. Madrid: Díaz de Santos; 2000. p. 336 - 55.

10. Fiestas F. Reduciendo la carga de enfermedad generada por el consumo de alcohol en Perú: propuestas basadas en evidencia. Rev Perú Med Exp Salud Publica [Internet]. 2012 [citado 26 de julio del 2022]; 29(1): 112-8. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000100017.
11. Cabanillas W. Consumo de alcohol y género en población adolescente escolarizada del Perú: evolución y retos de la intervención. Rev Perú Med Exp Salud Publica [Internet]. 2020 [citado 26 de julio del 2022]; 37(1): 148-54. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342020000100148&script=sci_arttext.
12. Anuario Estadístico Policial 2021. Policía Nacional del Perú [Internet]. 2022 [Citado el 29 de noviembre del 2022]. Disponible en: <https://www.policia.gob.pe/estadisticopnp/documentos/anuario-2021/anuario-estadistico-policial-2021.pdf>
13. Albalate D. Lowering blood alcohol content levels to save lives: The European experience. Journal of Policy Analysis and Management. [Internet]. 2007 [citado 20 de diciembre del 2022]; 27 (1): 20-39. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pam.20305>
14. Decreto Supremo N° 016-2009-MTC y sus modificatorias. Texto Único Ordenado del Reglamento Nacional de Transito – Código de tránsito. Lima – Perú [Internet]; 2009 [Citado el 05 de junio del 2022]. Disponible en: https://www.sutran.gob.pe/wp-content/uploads/2015/08/D_-NRO_016-2009-MTC_AL_05.05.14.pdf
15. Decreto legislativo N° 957 y sus modificatorias. Código procesal penal. Lima - Perú [Internet]; 22 Julio del 2004 [citado 02 de agosto del 2022]. Disponible en: http://www.oas.org/juridico/PDFs/mesicic4_per_cod_procesal.pdf.
16. Decreto legislativo N° 635 y sus modificatorias. Código Penal. Lima-Perú. [Internet]; 03 Abril de 1991 [citado 02 de agosto del 2020]. Disponible en: https://apps.contraloria.gob.pe/unetealcontrol/pdf/07_635.pdf.
17. Villanueva E. Estudio Toxicológico y Médico Legal del Alcohol Etílico. En: Gisbert J, editor. Medicina Legal y Toxicología. 6° ed. Barcelona: Editorial Elsevier Masson. 2004. p. 875-95.
18. Chun H, Poklis J, Poklis A, Wolf C. Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. J Anal Toxicol. [Internet]. 2016 [citado el 05 de octubre del 2022]; 40(8): 653-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/jat/article/40/8/653/2450720>

19. Jones AW. Medico Legal Alcohol Determinations - Blood - or Breath Alcohol concentrations?. *Forensic Sci Rev*. [Internet]. 2020 [citado 28 de julio del 2022]; 12(1): 23-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26256024/>
20. Jones AW: Measuring alcohol in blood and breath for forensic purposes – A historical review. *Forensic Sci Rev* [Internet]. 1996 [citado el 11 de noviembre del 2022]; 8(1):13-44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26270605/>
21. Demlie L, Gebretsadik A, Nigussie K, Gebrekidan A, Hadush Y. Determination of ethanol in blood using headspace gas chromatography with flame ionization detector (HS-CS-FID): Validation of a method. *Cogent Chemistry* [Internet]. 2020 [citado el 5 de octubre del 2022]; 6(1). Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/23312009.2020.1760187?scroll=top&needAccess=true>
22. Hwang R-J, Beltran J, Rogers C, Barlow J, Razatos G, Measurement of uncertainty for blood alcohol concentration by headspace gas chromatography. *Canadian Society of Forensic Science Journal* [Internet]. 2017 [citado el 2 de noviembre del 2022]; 50(3): 114-24. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00085030.2017.1312069?journalCode=tcsf20>
23. Rubinson K, Rubinson J. *Análisis Instrumental*. Madrid: Editorial Prentice Hall; 2001. p. 522-50.
24. Bermejo R, Moreno A. *Análisis Instrumental*. Madrid. Editorial Síntesis S.A; 2014. p. 291 - 310, 369 - 80.
25. Kolb B, Ettre L. *Static Headspace - Gas Chromatography: Theory and Practice*. 2ª ed. New Jersey. Editorial Wiley – Interscience; 2006. p. 1-10
26. Soria A, Garcia-Sarrió M, Sanz M. Volatile sampling by headspace techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. [Internet]. 2015 [Citado el 01 de enero del 2023]; 71(1): 85-99. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993615001612>
27. Xie W-Q, Yu K-X, Gong Y-X. A double sealing technique for increasing the precision of headspace – gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A*. [Internet]. 2018 [Citado el 28 de diciembre del 2022]; 1533 (2018): 221-5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29276079/>

28. Skoog D, Holler F, Crouch S. Principios de Análisis instrumental. 6° Edición. México: Editorial Cengage Learning; 2008. p. 281-302 y 550-588.
29. Hübschmann H-J. Handbook of GC-MS Fundamentals and Applications. 3° ed. Editorial Wiley-VCH. 2015. Weinheim. p. 7-40.
30. Scientific Area Committees for Forensic Science, de la Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) of United States. Standard for Mass Spectral Data Acceptance in Forensic Toxicology. [Internet]. 2019 [citado 05 de mayo del 2022]. Disponible en: https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spec_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf.
31. World Antidoping Agency (WADA) Technical Document – TD2010IDCR. Identification Criteria For Qualitative Assays. [Internet]. 2010 [citado el 12 de mayo del 2022]. Disponible en: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf.
32. United States Department of Justice Drug Enforcement Administration. SWGDRUG. Recommendations for methods of analysis. [Internet]. 2019 [Citado el 18 de agosto del 2022]. Estados Unidos. Disponible en: https://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%208_FINAL_ForPosting_092919.pdf
33. Sharma S, Goyal S, Chauhan K. A Review on Analytical Method Development and Validation. International Journal of Applied Pharmaceutics. [Internet]. 2018 [Citado el 02 de enero del 2023]; 10(6): 8 - 15. Disponible en: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/28279>
34. Norma internacional ISO 9000:2015 Quality management systems -Requeriments. [Internet]. 2015 [citado 12 de mayo del 2020]. Génova. Disponible en: <http://www.umc.edu.ve/pdf/calidad/normasISO/ISO%209000-2015.pdf>
35. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito (UNODC). Directrices para la validación de métodos analíticos y calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York. [Internet]. 2010 [citado 12 de mayo del 2022]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf

36. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Journal of Analytical Toxicology. [Internet]. 2013 [citado 28 de julio del 2022]; 37(7): 452-474. Disponible en: <https://academic.oup.com/jat/article/37/7/452/765476>
37. EURACHEM. A Focus for Analytical Chemistry in Europe. La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. [Internet]. 2ª ed. 2016 [citado 12 de mayo del 2022]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>.
38. Norma Internacional – ISO /IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. [Internet]. 2017 [citado 12 de mayo del 2022] Génova. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>.
39. United States Pharmacopeia Convention, IV. (2019). USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos. P. 8388-93.
40. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(r1), ICH harmonized tripartite guideline. [Internet] 2005 [citado el 25 de noviembre del 2022]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
41. Hernández-Sampieri R. Concepción o elección del diseño de investigación. En: Hernández-Sampieri R, Fernandez C, Baptista M, editores. Metodología de la investigación. 6ª Edición. Ciudad de México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores.2014. p. 126-69
42. Ñaupas H. El diseño de la investigación. En: Ñaupas H, Valdivia M, Palacios J, Romero H, editores. Metodología de la investigación cuantitativa - cualitativa y redacción de la tesis. 5ª Edición. Bogota: Ediciones de la U, 2018. p. 347-72
43. Cooper J, Riccardino G, Cojocariu C. Rapid, automated and accurate determination of blood alcohol concentration (BAC) by headspace coupled to gas chromatography and flame ionization detection. Application note 10713. [Internet]. 2018 [citado 20 de octubre del 2022]. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-10713-gc-fid-blood-alcohol-concentration-bac-an10713-en.pdf>
44. Measurement of Ethanol in Blood Using Headspace GC-MS. Application Data Sheet No.7. Shimadzu. [Internet]. 2011 [citado el 20 de diciembre del 2021]. Disponible en:

https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/12060/jpo212062.pdf

45. Maurer H, Pflieger K, Weber A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and their Metabolites. 10 ed. Editorial Wiley-VCH. Alemania 2017. p. 106.
46. Miller J, Miller J. Estadística y Quimiometría para química analítica. Madrid: Prentice Hall; 2002. P. 111-51.
47. Schlatter J, Chiadmi F, Gandon V, Chariot P. Simultaneous determination of methanol, acetaldehyde, acetone and ethanol in human blood by gas chromatography with flame ionization detection. Human Exp Toxicol [Internet]. 2014 [citado el 30 de setiembre del 2022]; 33(1): 74-80 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23584355/>
48. Meier P, Zund R. Statistical Methods in Analytical Chemistry. Schaffhausen: A Wiley-Interscience Publication; 2000. p. 13-90.
49. Jones A. Alcohol, its analysis in blood and breath for forensic purposes, impairment effects, and acute toxicity. WIREs FORENSIC SCIENCE. [Internet]. 2019 [citado el 10 de agosto del 2022]; 1(6): 1-32. Disponible en: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wfs2.1353>
50. Repetto M. Toxicología del alcohol etílico. En: Repetto M, editor. Toxicología Avanzada. Madrid: Díaz de Santos; 1995. p. 425-75
51. Boswell H, Dorman F. Uncertainty of Blood Alcohol Concentration (BAC) Result as Related to Instrumental Conditions: Optimization and Robustness of BAC Analysis Headspace Parameters. Chromatography [Internet]. 2015 [citado el 15 de noviembre del 2022]; 2015(2):691-708. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9075/2/4/691>
52. Kugelberg F, Wayne A. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. Forensic Science International. [Internet]. 2007 [citado el 22 de julio del 2022]; 165 (1): 10-29. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782292/>
53. Xu X, Ren P, Zhu Y, Cai Z, Han J, Huang B, et al. Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation. Analítica Química Acta [Internet]. 2009 [citado el 14 de diciembre del

- 2022]; 650(1): 39-43. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267009005686>
54. Aebi B, Bernhard W. Modern Gas Chromatography – Mass Spectrometry in Human Forensic Toxicology. En: Rivere J, editor. Biological Concepts and Techniques in Toxicology An Integrated Approach. New York: Editorial Taylos & Francis; 2006. P. 365-75.
 55. Scientific Area Committees for Forensic Science, de la Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) of United States. Standards for Identification Criteria in Forensic Toxicology. [Internet]. 2019 [citado 05 de mayo 2022]. Disponible en: https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spec_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf
 56. Pontes H, Guedes P, Casal S, Carmo H, Santos A, Magalhaes T, et al. GC Determination of Acetone, Acetaldehyde, Ethanol, and Methanol in Biological Matrices and Cell Culture. Journal of Chromatographic Science. [Internet]. 2009 [citado el 21 de noviembre del 2022]; 47(4): 242-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/chromsci/article/47/4/272/396871>
 57. Fleming M, Mihic J, Harris A. Etanol. En Brunton Laurence. Goodman e Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11º ed. México DF: Mc Graw Hill; 2006. p. 591-606.
 58. American Academy of Forensic Sciences. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. [Internet]. 2019 [citado el 17 de agosto del 2022] New York. Disponible en: <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-practices-method-validation-forensic-toxicology>
 59. Wayne A. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. Forensic Science International [Internet]. 2010 [citado el 15 de octubre del 2022]; 200(1-3):1-20. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/42371529_Evidence-based_survey_of_the_elimination_rates_of_ethanol_from_blood_with_applications_in_forensic_casework
 60. Logan B, Gullbeg R, Negrusz A and Jickells. En Clarke's Analytical Forensic Toxicology. UK: Pharmaceutical Press. 2008. p. 299-320.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

Anexo 1. Solicitud del investigador peticionando autorización para ejecución del proyecto de investigación “Validación de un método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú” en las instalaciones de la Dirección de Criminalística PNP

SOLICITA: Autorización para ejecución de Proyecto de Investigación denominado "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN FORENSE EN PERÚ"

SEÑOR GENERAL PNP DIRECTOR DE CRIMINALISTICA DE LA POLICIA NACIONAL DEL PERU.

S.G.

Elder Miler REYES AVALOS, Capitán S. PNP, identificado con CIP N° 392853, DNI N° 45793769 y con número telefónico 948825168, en situación de actividad, actualmente prestando servicios en el Departamento de Química y Toxicología Forense - DIVLACRI - DIRCRI PNP, ante Ud. con el debido respeto y por conducto regular me presento y expongo:

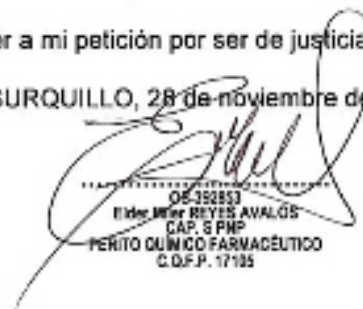
Considerando que, La Dirección de Criminalística como órgano de apoyo policial de carácter técnico científico tiene como una de sus funciones las de "promover, incentivar e impulsar la investigación criminalística, orientada a crear, actualizar y mejorar los procedimientos, técnicas, guías o protocolos de actuación", es que solicito a usted con el debido respeto y por conducto regular se me autorice la ejecución del proyecto de investigación denominado: "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN FORENSE EN PERÚ", dentro de las instalaciones del Departamento de Química y Toxicología Forense de la DIVLACRI – DIRCRI PNP, así como el uso de los equipos a cargo del mismo Departamento, con la finalidad de POTENCIAR Y ACTUALIZAR los métodos de análisis para el fortalecimiento de la función criminalística en nuestro Departamento.

Es preciso mencionar que el proyecto indicado líneas arriba forma parte de la tesis que me permite obtener el Grado Académico de Magíster en Toxicología, de mis estudios realizados en la Unidad de Postgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

POR LO EXPUESTO:

Solicito a Ud. Mi General acceder a mi petición por ser de justicia

SURQUILLO, 28 de noviembre del 2022.



OF-392853
Elder Miler REYES AVALOS
CAP. S PNP
PERITO QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.D.F.P. 17195

Adjunto a la presente:

- Proyecto de Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología aprobado por Director de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- DICTAMEN N° 085-FFB-UPG-2020, autorizando la ejecución de la tesis

Anexo 2. Autorización del Director de Criminalística para ejecutar proyecto de investigación “Validación de un método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas y su aplicación forense en Perú” en las instalaciones de la Dirección de Criminalística PNP



PERÚ	MINISTERIO DEL INTERIOR	POLICIA NACIONAL DEL PERÚ	COMANDANCIA GENERAL	DIRCRI	SECRETARIA
------	-------------------------	---------------------------	---------------------	--------	------------

"DECENIO DE LA IGUALDAD DE LAS OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRRES"
 "AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA NACIONAL"
 "AÑO DEL BICENTENARIO DEL CONGRESO DE LA REPÚBLICA DEL PERÚ"

Surquillo, 08 de diciembre del 2022.

OFICIO N° 110-2022-COMASGEN- DIRCRI-PNP/SECRETARIA

SEÑOR : CORONEL PNP
 Oscar Freddy VILLAR VELASQUEZ
 JEFE DIVLACRI – DIRCRI PNP

ASUNTO : Solicitud de autorización para la ejecución de Proyecto de Investigación, por motivo que se indica. **SE DEVUELVE.**

REF. : Oficio Nro. 3842-2022-DIRCRI-PNP/DIVLACRI-SEC.

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., a mérito del documento de la referencia, mediante el cual remiten la solicitud del CAP S PNP Elder Miler REYES AVALOS, perteneciente al Dpto. de Química y Toxicología Forense DIVLACRI DIRCRI PNP peticionando autorización para ejecución de Proyecto de Investigación denominado "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATIGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SU APLICACIÓN FORENSE EN EL PERÚ".

En ese sentido, por especial encargo del Señor General PNP, Director de Criminalística PNP, se hace de conocimiento que fue aprobado para que realice las coordinaciones respectivas dentro del ámbito de su competencia, para que se lleve a cabo con éxito el Proyecto de Investigación en referencia.

Es propicia la ocasión para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y deferente estima personal.

Dios guarde a Ud.

ECPM/lvgt



CA 21834
 EDUARDO CAHYVA MELUÁN
 CORONEL PNP
 JEFE DE SECRETARIA DE LA
 DIRECCIÓN DE CRIMINALÍSTICA DE LA
 PNP



Anexo 3. Cuantificación de etanol en sangre de personas por cromatografía de gases/espectrometría de masas



(A) Tesista interpretando la curva de calibración del nuevo método desarrollado para determinación de alcoholemia por CG/EM y (B) Tesista analizando resultados de selectividad del método en el laboratorio de Instrumentación del Departamento de Química y Toxicología Forense de la DIRCRI PNP, diciembre de 2022.

Anexo 4. Parámetros de idoneidad del sistema para solución selectividad.

	t_R (min)	R_s	N
Metanol	0,892	3,222	16734,5
Etanal	0,993	3,808	12752
Etanol	1,121	6,922	19639,7
Propan-2-ol	1,371	7,243	18391,5
Propanona	1,686	3,428	20872,8
Propan-1-ol	1,850		23292,83

t_R: tiempo de retención, R_s: resolución, N: número de platos teóricos

Anexo 5: Análisis de la regresión lineal de patrones de referencia de etanol en diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM para linealidad del instrumento

Preparación de patrones de referencia de etanol

Estándar : Etanol Stock_exp_1 = 1,0106 g en 100 mL
 Pureza : 99,9 % Stock_exp_2 = 1,0026 g en 100 mL
 Stock_exp_3 = 1,0076 g en 100 mL

Exp	Concentraciones de patrones de referencia de etanol para inyección en CG/EM (g/L)						
1	0,1010	0,5048	1,0096	2,0192	3,0288	4,0384	5,0479
2	0,1002	0,5008	1,0016	2,0032	3,0048	4,0064	5,0080
3	0,1007	0,5033	1,0066	2,0132	3,0198	4,0264	5,0330

Fuente: elaboración propia, enero 2023. Exp: experimento.

Exp	A	Relación de áreas (etanol/propan-1-ol) de los patrones de referencia inyectados por duplicado en el CG/EM (g/L)						
1	A ₁	0,06882	0,28285	0,57474	1,15711	1,69833	2,27541	2,80782
	A ₂	0,07054	0,28620	0,58066	1,13404	1,68873	2,26986	2,80655
2	A ₁	0,06879	0,28883	0,57611	1,13771	1,73016	2,29107	2,88352
	A ₂	0,06793	0,29015	0,57983	1,13574	1,70657	2,28616	2,84024
3	A ₁	0,07014	0,29362	0,57520	1,14677	1,71053	2,27421	2,83635
	A ₂	0,06953	0,29373	0,58849	1,14147	1,70771	2,28308	2,82547

Fuente: elaboración propia, enero 2023. A: análisis, A₁: análisis 1, A₂: análisis 2.

Matriz de concentración de patrón de referencia (g/L) vs. respuesta del CG/EM (relación de áreas etanol/propan-1-ol)

Concentración en estudio (g/L)	Exp	x		y
		(g/L)		
0,1	1	0,1010		0,06968
	2	0,1002		0,06836
	3	0,1007		0,06984
0,5	1	0,5048		0,28452
	2	0,5008		0,28949
	3	0,5033		0,29367
1,0	1	1,0096		0,57770
	2	1,0016		0,57797
	3	1,0066		0,58185
2,0	1	2,0192		1,14558
	2	2,0032		1,13672
	3	2,0132		1,14412
3,0	1	3,0288		1,69353
	2	3,0048		1,71836
	3	3,0198		1,70912
4,0	1	4,0384		2,27264
	2	4,0064		2,28862
	3	4,0264		2,27864
5,0	1	5,0479		2,80719
	2	5,0080		2,86188
	3	5,0330		2,83091

Fuente: elaboración propia, enero 2023. x: concentración patrón de referencia (g/L), y: relación de áreas (etanol/propan-1-ol), Exp: experimento.

Estadística para linealidad del instrumento CG/EM

A. Coeficiente de correlación (R) y coeficiente de determinación (R²)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9998799
Coeficiente de determinación R ²	0,9997599
R ² ajustado	0,9997473
Error típico	0,0157614
Observaciones	21

Fuente: elaboración propia, enero 2023.

B. Varianza residual constante (Homocedasticidad)

Residuales respecto la relación de áreas (etanol/propan-1-ol) y la concentración de etanol inyectado en patrones de referencia

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
1	0,0682005	0,00147776
2	0,0677513	0,00060737
3	0,0680321	0,00180542
4	0,2951761	-0,01065210
5	0,2929302	-0,00343979
6	0,2943339	-0,00066217
7	0,5788956	-0,00119565
8	0,5744037	0,00356643
9	0,5772112	0,00463573
10	1,1463347	-0,00075786
11	1,1373509	-0,00062871
12	1,1429657	0,00115804
13	1,7137737	-0,02024218
14	1,7002980	0,01806695
15	1,7087203	0,00039692
16	2,2812127	-0,00857749
17	2,2632451	0,02537084
18	2,2744749	0,00416746
19	2,8486518	-0,04146511
20	2,8261923	0,03568462
21	2,8402295	-0,00931649

Fuente: elaboración propia, enero 2023.

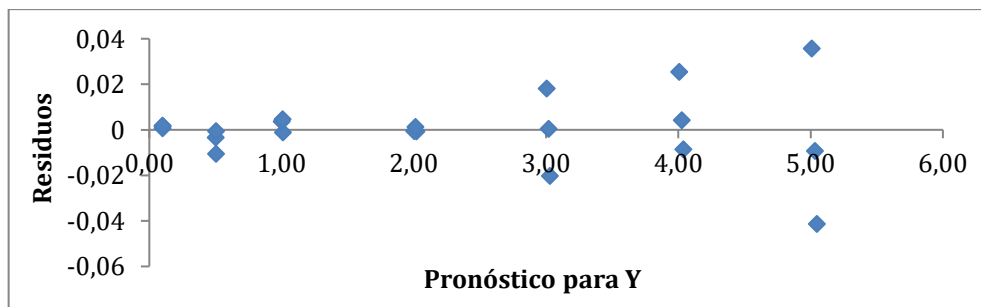


Gráfico de residuales respecto la relación de áreas (etanol/propan-1-ol) y concentración de etanol inyectado en patrones de referencia.

C. ANOVA

a. Ajuste de datos

Planteamiento de la hipótesis

H_0 : $b=0$, El modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos.

H_1 : $b \neq 0$, El modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación

Si $F_{exp} > F_{tabla}$, para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal SI proporciona buen ajuste de los datos.

Prueba estadística F para análisis del ajuste de los datos						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	F tabla
Regresión	1	19,6538611	19,654	79115,4	7,4231E-36	4,381
Residuos	19	0,00471998	0,0002			
Total	20	19,658581				

Resultado

Como $F_{exp} > F_{tabla}$, se rechaza H_0 ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos

b. Significación estadística de la pendiente

Test de hipótesis de la pendiente

H_0 = "b" es estadísticamente igual a cero.

H_1 = "b" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp} > t_{tabla}$ para una probabilidad 95% ($p=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula (H_0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.

Prueba estadística t para evaluación de la pendiente de la regresión lineal								
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Pendiente	0,562049	0,001998	281,27	7,4231E-36	0,55787	0,56623	0,55787	0,566

$$t_{exp} = 281,27$$

$$t_{tabla} = 2,09$$

Resultado:

$t_{exp} > t_{tabla}$, para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

c. Test de la proporcionalidad

Test para la hipótesis del intercepto a:

$H_0 = "a"$ es estadísticamente igual a cero.

$H_1 = "a"$ es estadísticamente diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp} < t_{tabla}$, para una probabilidad del 95% ($p=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se acepta la hipótesis nula (H_0), entonces " a " es estadísticamente igual a cero.

Prueba estadística t para evaluación del intercepto de la regresión lineal								
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
		<i>típico</i>	<i>t</i>		<i>95%</i>	<i>95%</i>	<i>95,0%</i>	<i>95,0%</i>
Intercepción	0,011456	0,00565	2,0286	0,056756	-0,0004	0,02328	-0,0004	0,023

$$t_{exp} = 2,02$$

$$t_{tabla} = 2,09$$

Resultado:

$t_{exp} < t_{tabla}$, para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0) y " a " es estadísticamente igual a cero.

Anexo 6. Análisis de la regresión lineal de material fortificado con etanol en diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM para linealidad del método desarrollado

Preparación de material fortificado con etanol

Material enriquecedor : Etanol

Pureza : 99,9 %

Solución stock enriquecida 1 : 1,0143 g de etanol en 100 mL.

Solución stock enriquecida 2 : 1,0078 g de etanol en 100 mL

Solución stock enriquecida 3 : 1,0148 g de etanol en 100 mL

Exp	Concentración de material fortificado con etanol para inyección en el CG/EM (g/L)					
1	0,1013	0,5066	1,0133	2,0266	3,0399	4,0531
2	0,1007	0,5034	1,0068	2,0136	3,0204	4,0272
3	0,1014	0,5069	1,0138	2,0276	3,0414	4,0551

Fuente: elaboración propia, enero 2023. Exp. experimento

Exp	A	Relación de áreas (etanol/propan-1-ol) de material fortificado inyectada por duplicado en el CG/EM (g/L)					
1	A1	0,06672	0,28950	0,58565	1,13535	1,69996	2,26460
	A2	0,06699	0,28790	0,58548	1,12794	1,55320	2,27721
2	A1	0,06948	0,28904	0,57869	1,14349	1,69314	2,24133
	A2	0,06669	0,29355	0,56407	1,10122	1,68937	2,29098
3	A1	0,06654	0,29311	0,58189	1,12948	1,67476	2,16208
	A2	0,06811	0,29193	0,57174	1,12489	1,65904	2,32323

Fuente: elaboración propia enero 2023. A: análisis

Exp	A	Concentración de etanol medido en material fortificado inyectado en el CG/EM empleando el método desarrollado (g/L)					
1	A1	0,10177	0,50008	1,02959	2,01243	3,02192	4,03147
	A2	0,10225	0,49723	1,02928	1,99917	2,75951	4,05402
2	A1	0,10671	0,49926	1,01714	2,02698	3,00973	3,98985
	A2	0,10172	0,50733	0,99100	1,95140	3,00299	4,07863
3	A1	0,10144	0,50655	1,02286	2,00192	2,97687	3,84817
	A2	0,10425	0,50443	1,00472	1,99372	2,94877	4,13630

Fuente: elaboración propia, enero 2022.

Matriz de concentración de etanol en material fortificado vs. concentración de etanol medido empleando el método desarrollado

Concentración en estudio (g/L)	Exp	Etanol en material fortificado (g/L)	Etanol medido (g/L)
0,1	1	0,10133	0,10201
	2	0,10068	0,10421
	3	0,10138	0,10285
0,5	1	0,50664	0,49865
	2	0,50340	0,50329
	3	0,50689	0,50549
1,0	1	1,01329	1,02944
	2	1,00679	1,00407
	3	1,01379	1,01379
2,0	1	2,02657	2,00580
	2	2,01358	1,98919
	3	2,02757	1,99782
3,0	4	3,03986	2,89072
	5	3,02038	3,00636
	6	3,04136	2,96282
4,0	1	4,05314	4,04274
	2	4,02717	4,03424
	3	4,05514	3,99224

Fuente: elaboración propia, enero 2023

Estadística para linealidad del método desarrollado en el intervalo de trabajo

A. Coeficiente de correlación (R) y coeficiente de determinación (R²)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9996986
Coeficiente de determinación R ²	0,9993972
R ² ajustado	0,9993594
Error típico	0,0360297
Observaciones	18

Fuente: Elaboración propia, enero 2023.

B. Varianza residual constante (Homocedasticidad)

Residuales respecto concentración de etanol medido y la concentración de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM		
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
1	0,1033912	-0,00137680
2	0,1027506	0,00146380
3	0,1034405	-0,00059361
4	0,5032229	-0,00456822
5	0,5000201	0,00327391
6	0,5034692	0,00201707
7	1,0030124	0,02642417
8	0,9966069	0,00746679
9	1,0035052	0,01028362
10	2,0025917	0,00320702
11	1,9897804	-0,00058938
12	2,0035772	-0,00575447
13	3,0021709	-0,06111453
14	2,9829539	0,02340777
15	3,0036491	-0,04083326
16	4,0017501	0,04099057
17	3,9761274	0,05811669
18	4,0037211	-0,01148253

Fuente: elaboración propia, enero 2023.

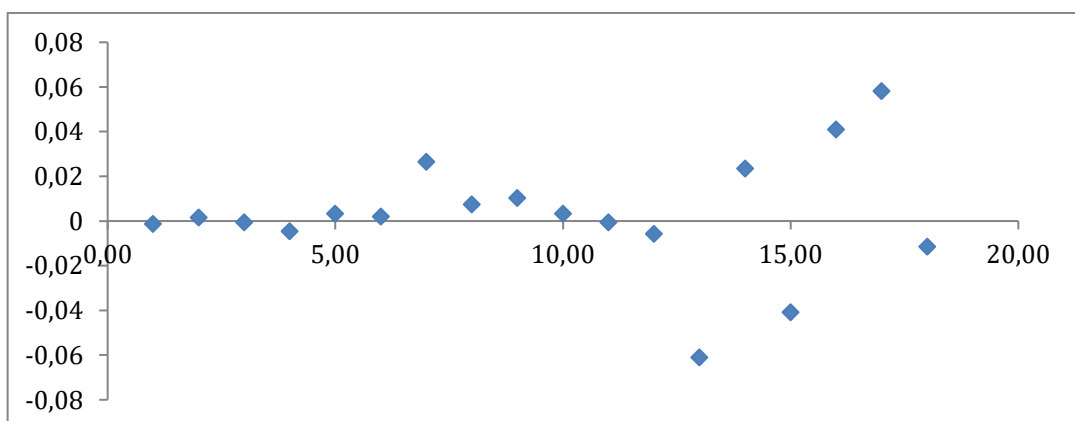


Gráfico de los residuales respecto concentración de etanol medido por el método desarrollado y concentración de etanol en material fortificado inyectado en el CG/EM

C. ANOVA

a. Ajuste de datos

Planteamiento de la hipótesis

H_0 : $b=0$, El modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos.

H_1 : $b \neq 0$, El modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Criterio de aceptación

Si $F_{exp} > F_{tabla}$, para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal SI proporciona buen ajuste de los datos

Prueba estadística F para análisis de ajuste de datos						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	<i>F tabla</i>
Regresión	1	34,4355838	34,436	26526,9	3,4245E-27	4,493
Residuos	16	0,02077025	0,0013			
Total	17	34,456354				

Resultado:

Como $F_{exp} > F_{tabla}$, no se acepta H_0 ; el modelo lineal SI proporciona buen ajuste de datos.

b. Significación estadística de la pendiente.

Test de hipótesis de la pendiente

H_0 = "b" es estadísticamente igual a cero

H_1 = "b" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp} > t_{tabla}$ para una probabilidad 95% ($p=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula (H_0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero

Prueba estadística t para evaluación de la pendiente de la regresión lineal								
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Pendiente	0,986473	0,00606	162,87	3,425E-27	0,97363	0,99931	0,9736	0,999

$$t_{exp} = 162,87$$

$$t_{tabla} = 2,12$$

Resultado

$T_{exp} > t_{tabla}$, para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

c. Test de la proporcionalidad

Test de hipótesis para el intercepto a

H_0 = "a" es estadísticamente igual a cero.

H_1 = "a" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación

Si $t_{exp} < t_{tabla}$, para una probabilidad de 95% ($p=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se acepta la hipótesis nula (H_0), entonces “a” es estadísticamente igual a cero

Prueba estadística t para evaluación del intercepto de la regresión lineal								
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	0,003433	0,0138	0,2496	0,8060785	-0,0257	0,0326	-0,0257	0,033

$$t_{exp} = 0,25$$

$$t_{tabla} = 2,12$$

Resultado

$T_{exp} < t_{tabla}$ para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0) concluyendo que “a” es estadísticamente igual a cero.

Anexo 7. Análisis estadístico para la precisión intermedia del método desarrollado por CG/EM

Análisis de varianza de un factor

Se plantea:

H_0 = Los resultados son estadísticamente iguales entre analistas

H_1 = Los resultados son estadísticamente diferentes entre los analistas

Criterio de aceptación:

Si $f_{exp} < f_{tabla}$, para una probabilidad de 95% ($p=0,05$), se acepta la hipótesis nula, entonces los resultados son iguales entre analistas

Prueba estadística f para análisis de precisión intermedia en diversas concentraciones de etanol entre dos analistas

Concentración (g/L)	f_{Exp}	f_{tabla}
0,1	0,5300	4,9646
0,5	4,7210	
1,0	0,5949	
2,0	0,0048	
3,0	0,6261	
4,0	2,9710	

Resultado:

$f_{exp} > f_{tabla}$, para $p=0,05$, por lo que se acepta hipótesis nula (H_0) como consecuencia que estadísticamente los resultados son iguales entre analistas.

Anexo 8. Análisis estadístico para robustez de método desarrollado por CG/EM

Análisis estadístico de concentraciones medidas por el método desarrollado vs. concentraciones de material fortificado con etanol a 0,5 g/L inyectado en el CG/EM con variaciones de acuerdo tabla 5		
Material fortificado con etanol	Concentración de material fortificado etanol (g/L)	Concentración de etanol medido por el método desarrollado (g/L)
MFEt1	0,5034	0,5071
MFEt2	0,5034	0,5115
MFEt3	0,5034	0,5231
MFEt4	0,5034	0,4993
MFEt5	0,5034	0,4988
MFEt6	0,5034	0,5045
MFEt7	0,5034	0,5085
MFEt8	0,5034	0,5067
MFEt9	0,5034	0,4960
MFEt10	0,5034	0,5091
\bar{x}		0,5065
DE		0,0077
CV		1,5247

Fuente: elaboración propia, enero 2023. MFEt: Material fortificado con etanol

Análisis de varianza de un factor

Se plantea:

H_0 : Los resultados son estadísticamente iguales

H_i : Los resultados son estadísticamente diferentes

Si $F_{\text{critico}} > f_{\text{tabla}}$ Se rechaza la hipótesis nula (H_0)

Prueba estadística F para análisis de varianza de concentraciones medidas por el método desarrollado en material fortificado con etanol al 0,5 g/L						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,696E-05	1	4,696E-05	1,5750	0,22553	4,413873
Dentro de los grupos	0,0005367	18	2,982E-05			

Se observa que $f_{\text{critico}} < f_{\text{tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis nula, concluyendo que los resultados son estadísticamente iguales

Análisis estadístico de las concentraciones fortificadas vs. halladas a concentración de 2,0 g/L

Análisis estadístico de concentraciones medidas por el método desarrollado vs. concentraciones de material fortificado con etanol al 2,0 g/L inyectado en el CG/EM con variaciones según tabla 5		
Material fortificado con etanol	Concentración de material fortificado con etanol (g/L)	Concentración de etanol calculado
MFEt1	2,0136	1,9985
MFEt2	2,0136	2,0470
MFEt3	2,0136	1,9866
MFEt4	2,0136	1,9985
MFEt5	2,0136	1,9787
MFEt6	2,0136	2,0017
MFEt7	2,0136	1,9395
MFEt8	2,0136	1,9545
MFEt9	2,0136	2,0271
MFEt10	2,0136	2,0287
\bar{x}		1,9961
DE		0,0333
CV		1,668

Fuente: elaboración propia, enero 2023.

Análisis de varianza de un factor

Se plantea:

H_0 : Los resultados son estadísticamente igual.

H_1 : Los resultados son estadísticamente diferentes.

Si $f_{\text{critico}} > f_{\text{tabla}}$, se rechaza la hipótesis nula (H_0)

Prueba estadística F para análisis de varianza de concentraciones medidas por el método desarrollado en material fortificado con etanol al 2,0 g/L

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0015292	1	0,0015292	2,7578741	0,1140957	4,41387342
Dentro de los grupos	0,0099808	18	0,0005545			

Se observa que $f_{\text{critico}} < f_{\text{tabla}}$, entonces se acepta la hipótesis nula, concluyendo que los resultados son estadísticamente iguales

Anexo 9. Flujograma del método desarrollado y validado por CG/EM para determinar alcoholemia

