

VALIDACIÓN DE LA “DETERMINACIÓN DE ALCOHOLEMIA Y METANOL POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON AUTOMUESTREADOR DE VOLÁTILES E IDENTIFICACIÓN DE ACETALDEHÍDO, ACETONA Y 2-PROPANOL”

**LINA MARCELA HENAO BETANCUR
ELIANA MARCELA VACA DUQUE**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2010**

VALIDACIÓN DE LA “DETERMINACIÓN DE ALCOHOLEMIA Y METANOL POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON AUTOMUESTREADOR DE VOLÁTILES E IDENTIFICACIÓN DE ACETALDEHÍDO, ACETONA Y 2-PROPANOL”

**LINA MARCELA HENAO BETANCUR
ELIANA MARCELA VACA DUQUE**

**Proyecto del trabajo de grado para optar al título de
Químico Industrial**

**DIRECTOR DEL PROYECTO
Carlos Humberto Montoya Navarrete
Químico Industrial,**

**ASESOR EN EL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA
LEGAL Y CIENCIAS FORENSES
Gloria Inés Ospina Velásquez
Profesional Forense**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
QUÍMICA INDUSTRIAL
PEREIRA
2010**

Nota de aceptación

Gloria Inés Ospina Velásquez

Carlos Humberto Montoya Navarrete

Pereira, Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Ciudad de Pereira, por permitirnos desarrollar la Practica Universitaria conducente a trabajo de grado, en especial a sus profesionales forenses Gloria Inés Ospina y Lina Erika Galvis quienes nos aportaron todo su conocimiento y ayuda para que el proyecto se llevara a cabo satisfactoriamente.

Al Químico Industrial Carlos Humberto Montoya Navarrete nuestro director, por su confianza y colaboración.

CONTENIDO

Pág.

LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ANEXOS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 GENERAL.....	14
4.2 ESPECÍFICOS.....	14
5. MARCO REFERENCIAL.....	15
• ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DEL ETANOL.....	15
• CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	17
• VALIDACIÓN.....	17
- SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD.....	17
- TIEMPO DE RETENCIÓN.....	18
- FACTOR DE CAPACIDAD.....	18
- SIMETRÍA.....	18
- PLATOS TEÓRICOS.....	18
- RESOLUCIÓN.....	19
- CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE.....	19
- CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE.....	19
- SENSIBILIDAD.....	19
- PRECISIÓN.....	19
- REPETIBILIDAD.....	19
- PRECISIÓN INTERMEDIA.....	19
- LINEALIDAD.....	20

• ANÁLISIS DE t DE STUDENT.....	20
• ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA.....	21
- EXACTITUD.....	22
6. MARCO LEGAL.....	23
6.1.1 CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE COLOMBIA.....	23
6.1.2 CÓDIGO PENAL.....	23
6.1.3 CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL (Ley 600 de 2000).....	23
6.1.4 CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL (Ley 906 de 2004).....	23
6.1.5 CÓDIGO NACIONAL DE TRÁNSITO TERRESTRE.....	24
6.1.6 CÓDIGO DISCIPLINARIO ÚNICO.....	24
6.1.7 CÓDIGO SUSTANTIVO DEL TRABAJO.....	24
6.1.8 DECRETO 2535 DE 1993, PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA.....	24
6.1.9 RESOLUCIÓN 000414 de AGOSTO 27 de 2002, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES.....	24
6.1.10 RESOLUCIÓN 000453 DE SEPTIEMBRE 24 DE 2002, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES.....	24
6.1.11 RESOLUCIÓN 0-1890 2002, FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN.....	24
6.1.12 RESOLUCIÓN 0-6394 2004, FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN.....	25
6.1.13 OTROS.....	25
6.2 CORRELACIÓN ENTRE EMBRIAGUEZ Y ALCOHOLEMÍA.....	25
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS.....	26
7.1.1.1 REACTIVOS.....	26
7.1.1.2 EQUIPOS.....	26
7.1.1.3 MATERIAL DE LABORATORIO.....	27
7.1.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	27
7.1.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	28
7.1.3.1 HEAD SPACE.....	28
7.1.3.2 CROMATÓGRAFO DE GASES.....	29
• IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	29

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
8.1 REPETIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR INTERNO	31
8.2 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	33
8.3 VALIDACIÓN	35
8.3.1 SELECTIVIDAD	35
8.3.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE	37
8.3.3 PRECISIÓN	38
8.3.4 REPETIBILIDAD	38
8.3.4.1 ETANOL	38
8.3.4.2 METANOL	39
8.3.5 PRECISIÓN INTERMEDIA	40
8.3.5.1 ETANOL	40
8.3.5.2 METANOL	41
8.3.6 DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LAS CURVAS	43
8.3.6.1 ETANOL	43
8.3.6.2 METANOL	47
8.3.7 SENSIBILIDAD	51
8.3.7.1 EXACTITUD	51
8.3.7.1.1 ETANOL	51
8.3.7.1.2 METANOL	51
8.3.8 COMPARACIÓN ENTRE SISTEMA Y MÉTODO	52
8.3.8.1 ETANOL	52
8.3.8.2 METANOL	53
8.4 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO	55
9. CONCLUSIONES	57
10. BIBLIOGRAFÍA	58
11. ANEXOS	59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución de concentraciones en los seis niveles de la curva.....	20
Tabla 2. Modelos para evaluar el intercepto, coeficiente de Correlación y pendiente.....	20
Tabla 3. Modelo análisis de varianza para evaluar la regresión de la Recta.....	21
Tabla 4. Condiciones del Head Space.....	28
Tabla 5. Condiciones del Cromatógrafo de gases.....	29
Tabla 6. Datos de repetibilidad para el estándar interno a los 21 días de Su preparación.....	32
Tabla 7. Datos de repetibilidad para el estándar interno a los 75 días de la preparación del estándar para verificar estabilidad.....	32
Tabla 8. Parámetros cromatográficos para los analitos estudiados.....	33
Tabla 9. Parámetros y criterios de selectividad.....	35
Tabla 10. Tiempos de retención de los analitos de interés.....	35
Tabla 11. Tiempos de retención de los solventes estudiados.....	36
Tabla 12. Diluciones realizadas al nivel tres para el cálculo de la CMD y CMC...37	
Tabla 13. Resultados límite de detección de etanol y metanol.....	37
Tabla 14. Resultados límite de cuantificación de etanol y metanol.....	38
Tabla 15. Repetibilidad para Etanol.....	38
Tabla 16. Repetibilidad para Metanol.....	39
Tabla 17. Precisión intermedia del método en tres días diferentes, tres Concentraciones y dos analistas.....	40
Tabla 18. Análisis de varianza precisión intermedia del Etanol.....	41
Tabla 19. Precisión intermedia del método en tres días diferentes, tres Concentraciones evaluadas y dos analistas.....	42
Tabla 20. Análisis de varianza precisión intermedia del Metanol.....	43
Tabla 21. Datos usados para la curva de calibración de etanol en el sistema y obtención de la ecuación.....	44

Tabla 22. Datos usados para la curva de calibración de Etanol en el método y obtención de la ecuación.....	45
Tabla 23. Análisis del intercepto, pendiente, coeficiente de correlación Para etanol en el sistema y el método.....	46
Tabla 24. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del etanol en el sistema.....	46
Tabla 25. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del etanol en el método.....	47
Tabla 26. Datos usados para la curva de calibración de metanol en el sistema y obtención de la ecuación.....	48
Tabla 27. Datos usados para la curva de calibración de metanol en método y Obtención de la ecuación.....	48
Tabla 28. Análisis de intercepto, pendiente, coeficiente de correlación Para metanol en el sistema y el método.....	49
Tabla 29. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del metanol en el sistema...	50
Tabla 30. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del metanol en el método...	50
Tabla 31. Exactitud Etanol.....	51
Tabla 32. Exactitud Metanol.....	51
Tabla 33. Datos para la comparación entre el sistema y el método, analito Etanol.....	52
Tabla 34. ANOVA para la comparación de tratamientos, analito Etanol.....	53
Tabla 35. Datos para la comparación entre el sistema y el método, analito Metanol.....	53
Tabla 36. ANOVA para la comparación de tratamientos, analito Metanol.....	54
Tabla 37. Resumen de los componentes de la incertidumbre identificados en el Análisis de alcoholemia.....	55

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Cromatograma del nivel 3 de la curva, contiene todos los analitos.....	33
Figura 2. Cromatograma sobrepuesto del etanol y del acetonitrilo.....	36
Figura 3. Curva de calibración para etanol sistema.....	44
Figura 4. Curva de calibración para etanol método.....	45
Figura 5. Curva de calibración para metanol sistema.....	48
Figura 6. Curva de calibración para metanol método.....	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico.....	59
Anexo 2. Repetibilidad del Etanol en sistema y método.....	61
Anexo 3. Repetibilidad del Metanol en sistema y método.....	65
Anexo 4. Precisión intermedia de Etanol.....	67
Anexo 5. Precisión intermedia de Metanol.....	68
Anexo 6. Linealidad de Etanol y análisis de t de Student en el Sistema.....	69
Anexo 7. Linealidad de Etanol y análisis de t de Student en el Método.....	71
Anexo 8. Análisis de varianza ANOVA para el Etanol en sistema y método.....	73
Anexo 9. Linealidad de Metanol y análisis de t de Student en el Sistema.....	76
Anexo 10. Linealidad de Metanol y análisis de t de Student en el Método.....	78
Anexo 11. Análisis de varianza ANOVA para el Metanol en sistema y método....	80
Anexo 12. Cálculo de la incertidumbre.....	82

RESUMEN

La función pericial en los laboratorios forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, es el punto de apoyo científico al proceso probatorio dentro del contexto de la administración de la justicia en Colombia. Con tal premisa, es de gran importancia que los resultados en los análisis, sean confiables y conlleven a encontrar la verdad más allá de toda duda razonable.

Desde hace una década se inicio el programa de aseguramiento de la calidad para las técnicas de análisis en todas las regionales del país, es así como se implemento el sistema de calidad teniendo en cuenta los parámetros analíticos utilizados por la comunidad científica internacional y la normatividad vigente para laboratorios de pruebas y ensayos (Norma NTC-ISO-IEC 17025 de 2005).

El presente informe presenta los resultados obtenidos en los estudios de validación del Procedimiento Estandarizado de Trabajo, DG-M-PET-02-V05, con el fin de garantizar la reproducibilidad y exactitud de los resultados analíticos cuando este método sea aplicado en la estación de alcoholemia de la ciudad de Pereira.

Los parámetros de selectividad, especificidad, exactitud, precisión y linealidad que fueron evaluados en este estudio, cumplieron los criterios de aceptación establecidos en el protocolo de validación.

La documentación generada durante la validación; Cromatogramas y Análisis estadístico generado por el software del equipo, se encuentra en la carpeta Validación de alcoholemia 2010 (que esta almacenada en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Ciudad de Pereira).

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia del consumo de alcohol en la población colombiana, es un factor de riesgo que incide negativamente en el orden público y privado, comúnmente se encuentra presente en delitos como la violencia intrafamiliar, sexuales, hurtos, homicidios y en mayor número de casos en accidentes de tránsito.

La determinación de la cantidad de alcohol ingerida por una o varias personas involucradas en un proceso judicial por algún delito, es importante al momento de esclarecer la comisión del mismo.

Entre los análisis forenses utilizados internacionalmente para determinar alcohol en humanos, están, la determinación de etanol expirado (Alcohol sensor), prueba poco confiable a nivel cuantitativo y la determinación de etanol en sangre total (Alcoholemia) por Cromatografía de Gases. Que junto al examen clínico cuando se trata de personas vivas, pueden dar una aproximación del estado de embriaguez del delincuente o la víctima al momento de ocurridos los hechos investigados.

La alcoholemia indica el nivel de etanol contenido en sangre total, expresado en miligramos de etanol en 100 mililitros de sangre (mg Etanol/100mL de sangre o mg%).

Desde el punto de vista analítico, en el análisis toxicológico se debe contar con métodos analíticos selectivos y sensitivos para la evaluación cualitativa y cuantitativa de las sustancias tóxicas que conduzcan a una correcta interpretación forense, teniendo en cuenta que además de esto una correcta interpretación, se debe buscar resultados confiables obtenidos bajo rigurosos controles de calidad.

La cromatografía de gases HS-GC/FID es la técnica aceptada internacionalmente para el análisis de alcoholemia. La metodología consiste en someter una muestra de sangre a calentamiento controlado, tomar una muestra del vapor generado, pasarlo por una columna de separación y a la salida detectar y cuantificar etanol y sustancias relacionadas.

De otro lado se entiende por validación de un método como un proceso documentado mediante el cual se demuestra que un procedimiento analítico es idóneo y apropiado para el propósito para el cual fue diseñado.

Típicamente, los parámetros que se validan en un método analítico son: exactitud, precisión, especificidad, selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. También, en el estudio de validación se evalúa la idoneidad del sistema que para métodos cromatográficos incluyen el factor de simetría, determinación y estabilidad del tiempo de retención de cada uno de los analitos, la resolución, el factor de capacidad y el número de platos teóricos. Estos

parámetros permiten determinar la capacidad que tiene el sistema cromatográfico de arrojar resultados reproducibles cada vez que el método sea aplicado.

Se realiza un análisis estadístico para la interpretación de los datos obtenidos, en un estudio de validación, la aplicación de pruebas como análisis de varianza (ANOVA), análisis de regresión lineal, aplicación t-student, desviación estándar y coeficiente de variación, son utilizadas para demostrar la validez del método.

La validación de un método analítico permite conocer la confiabilidad del mismo para su aplicación rutinaria y es fiable cuando es capaz de conservar los parámetros que se han validado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es bien sabido que el alcohol y el tabaco son las drogas legales más consumidas en todo el mundo, por lo que todas las culturas, a excepción de la musulmana, contemplan el consumo ritual u ordinario de alguna bebida alcohólica, obtenida por medios tradicionales y propios de cada una de ellas, por fermentación natural o controlada, de sustancias, generalmente alimentos como leche, cereales, jugos vegetales y frutas, etc. de alto contenido en hidratos de carbono. Los líquidos fermentados constituyen las bebidas primarias (sidras, vinos, cervezas, chichas, pulque, etc.), de los que por destilación pueden obtenerse concentrados alcohólicos (Repetto, 1995).

El modo de ingestión de las bebidas alcohólicas es bien diferente según el lugar, la época, la edad y nivel social del individuo. Tradicionalmente, las bebidas alcohólicas primarias y algunos destilados han constituido un aglutinante social tomado con moderación, aunque hubiese un porcentaje de abusadores en frecuencia y cantidad (“bebedores excesivos”), que aumentan cada vez más.

Debido al incremento en el porcentaje de personas que ingieren alcohol de manera excesiva y a que éste se encuentra ampliamente aceptado por nuestra sociedad sin que, por otro lado, se perciba claramente cuáles son los riesgos que ocasiona, riesgos que, desde el punto de vista sanitario, son tanto de índole físico como psíquico.

En concreto, la afectación del Sistema Nervioso Central por parte del alcohol dará lugar a trastornos psiquiátricos así como a modificaciones de conducta, que traen consigo una problemática social.

De este modo la importancia del alcohol en nuestra sociedad es innegable, es lógico pensar que el mismo esté implicado en numerosas situaciones que requieran una solución judicial: en el ámbito penal, lo más habitual es informar acerca de la imputabilidad del presunto autor del hecho delictivo; en el ámbito civil nos encontramos que el alcohol se relaciona con problemas de incapacidad, internamientos psiquiátricos o temas de custodia en familia; en el ámbito laboral puede ser causa de despido y finalmente y entre otros, los problemas derivados de la circulación de vehículos.

Desde la perspectiva de la patología médica y psiquiátrica, no cabe duda que los problemas sanitarios relacionados con el alcohol constituyen un problema de primera magnitud. Por otro lado, el gran consumo que de esta sustancia se lleva a cabo en nuestro país y las modificaciones de conducta que el mismo produce, conlleva, necesariamente, a consecuencias médico-legales por su frecuente relación con la Justicia, por lo que es de gran importancia que las autoridades competentes garanticen el seguimiento de las normas sobre la ingestión excesiva de alcohol, mediante pruebas que permitan la cuantificación de su porcentaje presente en la sangre y que a su vez sea una prueba que garantice un alto nivel de confianza, realizando así las sanciones correspondientes o la determinación de la causa de algún delito.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores problemas que se tiene en nuestra sociedad con relación al consumo de alcohol, es que este ha aumentado excesivamente durante los últimos años, trayendo consigo consecuencias que afectan los diferentes ámbitos que rodean al ser humano. Debido a esto y a la aceptación que tiene el alcohol, es necesario un control por parte de las autoridades, para la prevención de problemas sanitarios, culturales y sociales.

De este modo el estado de embriaguez o alcoholemia se determinara mediante una prueba que no cause lesión, la cual será determinada por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, el cual se consolida como el principal órgano científico del sistema judicial colombiano, que aporta las pruebas parciales necesarias para garantizar la objetividad de los procesos judiciales y policivos. La determinación de alcoholemia se realizara de manera directa, a través de la medición de alcohol en sangre por cromatografía de gases, ya que es el examen de calidad legal mas exacto que existe actualmente.

La metodología empleada para determinar alcoholemia, debe demostrar la aplicación de un sistema de aseguramiento de la calidad que incluya aspectos relacionados con la calibración de los equipos, la idoneidad del personal que lo opera, el método utilizado y los demás componentes de este sistema, por lo que es de gran importancia que un laboratorio acredite sus técnicas de análisis, lo cual conlleva al cumplimiento de las exigencias de una serie de normas, la cuales buscan garantizar resultados confiables.

Con la elaboración de este proyecto se busca desarrollar un método de validación de la prueba de alcoholemia, por cromatografía de gases, la cual tiene como propósito principal la producción de datos de alta calidad, por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, fiables y adecuadas para tal fin.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Validar la “Determinación de alcoholemia y metanol por cromatografía de gases con auto muestreador de volátiles e identificación de acetaldehído, acetona y 2-propanol” en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Pereira.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ejecutar un método de validación para buscar el rigor estadístico de la prueba de alcoholemia por cromatografía de gases con el detector FID.
- Estimar y calcular los criterios de calidad analítica: Exactitud, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad, porcentaje de recuperación y robustez, del ensayo, con el fin de aprobar un requisito para la validación de la “Determinación de alcoholemia y metanol por cromatografía de gases con automuestreador de volátiles e identificación de acetaldehído, acetona y 2-propanol”, en el laboratorio del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Pereira.
- Valorar los resultados obtenidos con los parámetros de etanol establecidos, de acuerdo a los criterios específicos para el caso estudiado.

5. MARCO REFERENCIAL

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DEL ETANOL

El etanol es un compuesto hidrófilo y liposoluble, esta característica le confiere la facilidad de ser absorbido por cualquier vía y distribuirse rápidamente tanto en los compartimientos acuosos como en los lipídicos y penetrar en el sistema nervioso central (SNC).

Por su hidrosolubilidad es difundido en el plasma sanguíneo, siendo la concentración de alcohol en sangre o alcoholemia el factor decisivo para la impregnación tisular y los efectos consecuentes. La mujer al tener menor proporción de agua corporal que el hombre, una misma dosis de alcohol origina mayor concentración en la sangre. La alcoholemia es comúnmente expresada en gramos de alcohol por litro de sangre (g/L).

El alcohol es una bebida que se consume en todo el mundo; no obstante, la población consumidora puede clasificarse según su relación con el alcohol, en los siguientes grupos: los bebedores “ligeros”, los abstemios y los bebedores “pesados” o “excesivos”, que representan un importante problema sanitario, por el daño que se infligen y un problema social y de orden público por los trastornos que producen a la sociedad.

El etanol puede dar origen a diferentes efectos según que el consumo sea esporádico de dosis bajas, o frecuente y de dosis altas, ya que este se categoriza como xenobiótico tóxico. Bajo sus efectos se pueden considerar situaciones de: Intoxicación subaguda, Intoxicación aguda, Intoxicación crónica y Dependencia alcohólica

Al igual que el consumo de otras drogas, el alcohol puede dar lugar a trastornos somáticos (corporales), mentales y sociales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1996), bajo el nombre de Trastornos mentales y del comportamiento debidos al consumo de sustancias psicotropas.

En Toxicología Analítica, tanto Clínica (Nordgren y col., 2004), como Forense (García y col., 2002), la sangre es la matriz biológica de elección para determinar, por diferentes métodos la concentración de una sustancia química, ya que es allí donde se llevan a cabo los principales procesos de toxicocinética (absorción, distribución, biotransformación, acumulación y eliminación) que permiten el cálculo de su concentración y las variaciones que esta tenga en su acción en un organismo vivo (Moffat, 1986; Repetto, 1997; Baselt y col., 1995).

En la sangre es posible analizar una serie de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. La identificación, casi siempre es precedida por una fase previa de separación y/o extracción del xenobiótico, debido a la complejidad de la matriz biológica y a la posible unión del agente químico con algún constituyente de la sangre. (Repetto, 1997; Chen y col, 1992; Repetto y col., 1983; Soriano y col, 2001).

El 90 % del alcohol absorbido se elimina mediante biotransformación, que se realiza en dos fases:



En la primera fase el etanol se oxida, por deshidrogenación, a acetaldehído y a diferentes radicales de oxígeno, a través de vías alternativas principales:

La vía mayoritaria es catalizada por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), presente en las mitocondrias; no es específica para el etanol, sino activa sobre los grupos oxidrilos en general.

En la segunda fase se tiene dos vías de desarrollo:

1. Vía principal: oxidación del acetaldehído, mediante las enzimas: Acetaldehído deshidrogenasas (ALDH). Que transforman el acetaldehído en ion acetato que se condensa para formar acetil coenzima A, la cual se integra en el ciclo de Krebs hasta CO_2 .

Algunos individuos poseen formas casi inactivas de estas enzimas, y experimentan reacciones de intolerancia al alcohol, al no eliminar apropiadamente al acetaldehído.

Oxidasas como xantinoxidasa, aldehído hidroxidasa, etc., que forman agua oxigenada y también ion acetato.

2. Vía secundaria, realizada por enzimas liasas, que condensan el aldehído acético con varias sustancias, como neurotransmisores, originando diversos productos activos sobre el sistema nervioso central, responsables de algunos efectos secundarios y tardíos del etanol. (Repetto y Martínez, 1976; Repetto, 1995).

Al analizar sangre de individuos que no han consumido alcohol, se pueden encontrar alcoholemias de hasta 0,03 g/L, correspondientes a lo que se llama alcohol endógeno, formado por fermentación intestinal. También, durante la putrefacción cadavérica y en muestras de sangre sin aditivos conservadores se pueden formar proporciones variables de etanol, pero en estos casos van acompañadas de alcohol isopropílico, que se produce igualmente en esas circunstancias.

Cuando se hace necesario realizar la confirmación de la presencia de una droga específica o de sus metabolitos, para los que previamente se han obtenido resultados positivos mediante técnicas de detección, se eligen los métodos y técnicas que depende del laboratorio, la selección de estos se basa en el tipo de muestras a analizar, motivo del análisis, rango de concentraciones que haya que cuantificar, equipos y personal disponibles, costo y otros muchos factores.

Para determinaciones de compuestos volátiles como el etanol, la técnica de mayor aplicación es la cromatografía de gases con detector FID.

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

La cromatografía de gases es una de las técnicas más utilizadas internacionalmente para el análisis de drogas de abuso, debido a que es muy específica.

Para llevar a cabo un análisis cromatográfico es necesario que la sustancia de interés sea lo suficientemente volátil como para que su molécula se encuentre en forma de vapor o gas a una temperatura igual o inferior a 400 °C y que además no se descompona a esas temperaturas.

La GC es una técnica de separación, que se puede emplear tanto como técnica de detección, de confirmación y cuantificación. Existen varios tipos de detectores y su elección depende de varios factores como son el precio, sensibilidad, selectividad, facilidad para operar con él, dificultad para encontrar repuestos, etc.

• Detector de ionización de llama (FID)

Este detector es fácil de usar, barato y tiene respuesta con casi todas las drogas de interés toxicológico. La respuesta del FID depende del número de átomos de carbono en la molécula, pero disminuye en los casos que también contengan oxígeno o nitrógeno. La mayor aplicación de este detector es en el análisis de compuestos volátiles, como el etanol.

VALIDACIÓN

Para el desarrollo experimental debe existir una planeación, que permita seguir de manera sistemática cada paso de la investigación, este proceso se denomina desarrollo experimental y con ello se logra obtener resultados confiables y reproducibles.

La validación comprende la determinación de una serie de parámetros que demuestren que los resultados del método son confiables y reproducibles. Cada uno de los parámetros a validar debe tener un diseño experimental planteado donde se define la hipótesis nula (H_0), la hipótesis alternativa (H_1), fijar la probabilidad de error (P) o confiabilidad, los grados de libertad (g), modelo matemático que sea de acuerdo al modelo probabilístico. Posterior al diseño, se compara el valor experimental con el tabulado para aceptar o no la hipótesis planteada.

Los parámetros evaluados son selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, linealidad, exactitud, en un sistema acuoso, similar al humor vítreo y una matriz de sangre enriquecida con soluciones estándares denominada método.

- **SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD:** Se considera selectividad como la habilidad de un método para diferenciar y cuantificar uno o varios analitos en presencia de otros componentes que se sospecha puedan estar presentes en

la muestra. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de degradación, impurezas etc. La selectividad se evalúa inyectando varias muestras de solventes comunes que pueden estar presentes en sangre o humor vítreo como producto de intoxicaciones. El método se considera selectivo si ninguno de los blancos u otras sustancias analizadas presenta el mismo tiempo de retención de los analitos de interés. La especificidad esta definida como la habilidad que tienen el método para medir de forma inequívoca los analitos de interés en presencia de otros componentes que pudiesen estar presente en la muestra.

- **TIEMPO DE RETENCIÓN:** cada analito es retenido durante su recorrido cromatográfico a un tiempo determinado y ese valor se mantiene mientras no se modifiquen las condiciones cromatográficas.
- **FACTOR DE CAPACIDAD:** este parámetro es función de la velocidad de migración, cuando es menor de la unidad el analito viaja a través de la columna de manera rápida haciéndose imposible medir el tiempo de retención.
- **SIMETRÍA:** la distribución de la cantidad de analito cuando se retiene en la fase estacionaria debe ser normal o gaussiana presentándose una señal simétrica en el cromatograma, sin embargo la incidencia de algunos factores hace que la distribución no sea normal, lo que se refleja en un señal con cola o con efecto de coleo. Lo ideal es que la simetría sea cercana a 1.
- **PLATOS TEÓRICOS:** Mide el número de 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. La eficiencia de una columna y por ende su poder separativo se mide en función de éstos. La eficiencia de una columna es una función de sus dimensiones (diámetro, longitud y espesor de la película), el tipo de gas portador y su rata de flujo o velocidad lineal promedio, del compuesto y de su retención. Su determinación sirve para verificar que un método sigue siendo idóneo, controlar el estado de la columna o lo largo de su vida útil, para comparar materiales o para optimizar un método analítico. Una columna con un alto número de platos entregará un pico más estrecho y agudo que una columna con un número bajo de platos.
El número de platos teóricos es solo válido para unas condiciones específicas y en lo posible cuando el factor de retención sea mayor que 5 se debe determinar. Cuando se cambia la columna se debe evaluar periódicamente (cada 3 meses) y determinar hasta cuando sirve. Lo recomendable es que cuando el número de platos teóricos descienda a un 70% del valor inicial se debe cambiar la columna.

- **RESOLUCIÓN:** El termino resolución se utiliza para expresar el grado de separación que hay entre dos picos adyacentes. La literatura recomienda que la resolución entre analitos debe ser mayor de 2, de esta forma se evita que se puedan presentar falsos positivos.
- **CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE:** es la cantidad de concentración de un analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco (y_{SB}) más tres veces la desviación estándar del blanco SB.
- **CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE:** concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud. Para metodologías bioanalíticas el límite de cuantificación debe cumplir los siguientes requisitos:
 - La respuesta de la señal del analito debe ser mínimo diez veces el ruido.
 - Reproducible con coeficiente de variación menor del 20% y exactitud de 80 a 120%.

En la metodología empleada se realizaron diluciones de los analitos Metanol y Etanol en el nivel 3 de la curva de calibración, cada dilución con cinco replicas.

- **SENSIBILIDAD:** se refiere a la capacidad de un método de diferenciar algunas variaciones en la concentración del analito, depende de la pendiente de la curva de calibración y de la reproducibilidad o precisión de los datos, un método se considera sensible entre más alta sea su pendiente. Se tomaron las curvas de calibración utilizadas durante los procesos de análisis rutinario, así como las realizadas con sangre.
- **PRECISIÓN:** es la concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma, e indica la medida del error aleatorio de un análisis. Para metodologías bioanalíticas se deben evaluar tres concentraciones en el rango de esperado y realizar cinco determinaciones por cada concentración.
- **REPETIBILIDAD:** se refiere a la concordancia de los resultados recolectados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo, se evalúa determinando el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD).

$$CV \text{ o } RSD = (s/x) * 100$$

S: desviación estándar

X: media aritmética.

Se preparan seis niveles de concentración del analito, con la matriz sangre y agua destilada, cada concentración con cuatro repeticiones cada una.

- **PRECISIÓN INTERMEDIA:** es hallada realizando mediciones a una muestra en diferentes días, por diferentes analistas, se expresa en coeficiente de variación global. Para este estudio se realizaron análisis a tres muestras en tres días diferentes, dos analistas y el mismo instrumento.

- **LINEALIDAD:** Cuando se varía la concentración de un analito, debe haber un cambio significativo en la respuesta del instrumento de manera proporcional, la linealidad compromete solo al rango de concentraciones estudiadas. En esta validación se consideran seis concentraciones distribuidas como se muestra en la tabla 1, y se toman teniendo en cuenta el primer, segundo y tercer grado de embriaguez según la resolución 414 del 27 de agosto de de 2002, y que 400 mg % es la concentración toxica para etanol y 150 mg % para el metanol.

Tabla 1. Distribución de concentraciones en los seis niveles de la curva.

NIVEL	N1	N2	N3	N4	N5	N6
CONCENTRACIÓN DE ETANOL (mg%)	15	40	100	200	300	400
ANALITO	METANOL		ACETALDEHÍDO	ACETONA	ISOPROPANOL	
NIVEL	N1	N3	N4	N3	N3	N3
CONCENTRACIÓN (mg%)	10	50	150	20	20	60

• DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT

Es una distribución de probabilidad que evalúa la variación entre las variables de estudio mediante el coeficiente de correlación, cuando este es estadísticamente diferente de cero, para el caso en estudio se toma el t de tabla con una seguridad del 97,5% y se trabaja con n-1 grados de libertad.

Hipótesis planteadas para evaluar la metodología:

- Intercepto (a): $H_0: a=0$
 $H_1: a \neq 0$
- Coeficiente de correlación (r):
 $H_0: r=0$
 $H_1: r \neq 0$
- Pendiente (b): $H_0: b=0$
 $H_1: b \neq 0$

Tabla 2. Modelos para evaluar el intercepto, coeficiente de correlación y pendiente.

EVALUADORES	HIPÓTESIS	p	MODELO ESTADÍSTICO	gl	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	LIMITES DE CONFIANZA
INTERCEPTO	$H_0: a = 0$	0.05	$t_{a(\text{exp})} = a / s_{(a)}$	n - 1	$t_{a(\text{exp.})} < t_{(tab.)}$	$Lc_{(a)} = a \pm ts_{(a)}$
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$H_0: r = 0$	0.05	$t_{r(\text{exp})} = \frac{(r (n-2)^{1/2})}{(1-r^2)^{1/2}}$	n - 1	$t_{a(\text{exp.})} > t_{(tab.)}$	
PENDIENTE	$H_0: b = 0$	0.05	$t_{(b)}(\text{exp}) = b / s_{(b)}$	n - 1	$t_{a(\text{exp.})} > t_{(tab.)}$	$Lc_{(b)} = b \pm ts_{(b)}$

p probabilidad de error, gl grados de libertad, $L_{C(a)}$ límites de confianza para el intercepto, $L_{C(b)}$ límites de confianza para la pendiente, $s_{(a)}$ es la desviación estándar del intercepto, $s_{(b)}$ es la desviación estándar de la pendiente.

$$S_{xy} = ((\sum y^2 - a^* \sum y - b^* \sum xy) / (n-2))^{1/2}$$

$$S(b) = (S^2_{xy} / (\sum x^2 - (\sum x^2 / n)))^{1/2}$$

$$S(a) = (S(b)^2 * (\sum x^2 / n))^{1/2}$$

• ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA.

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

Tabla 3. Modelo análisis de varianza para evaluar la regresión de la recta.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	HIPÓTESIS	gl	Sc	CM	F exp	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Regresión	Ho: no hay desvío en la regresión	1	Scrg = S^2_{xy} / S_{xx}	Scrg/gl = CMrg	CMrg/CMr	F exp > F tabla con un intervalo de confianza del 95%, por lo tanto se acepta la hipótesis nula.
Residual		n - 2	Sct - Scrg	Scr/gl		
Error total		n-1	Scr = Syy			

Desviación Estándar de la linealidad: $S_{xx} = \sum x^2 - (\sum x)^2 / n$

Desviación Estándar de la regresión: $S_{xy} = \sum xy - (\sum x \sum y) / n$

Desviación del error total $S_{yy} = \sum y^2 - (\sum y)^2 / n$

Desviación del error dentro $(S_{yy})_k = \sum / k (\sum y^2 - (\sum y)^2 / m)$

Suma de cuadrados de la regresión $Scrg = S^2_{xy} / S_{xx}$

Suma de cuadrados del error residual $Scr = Sct - Scrg$

Desviación del error total Sct

k: concentraciones trabajadas

m: número de réplicas

n: número total de determinaciones (n = mk)

- Hipótesis planteadas para evaluar la metodología:

- Regresión, H_0 : No hay desvío en la regresión.

- **EXACTITUD:** Se refiere a la concordancia entre el valor verdadero y el valor experimental para tal efecto la recuperación del analito en un ensayo es índice de la exactitud de una medida.

El porcentaje de recuperación se calcula comparando las pendientes del sistema y el método.

$$\%R = (\text{pendiente del método/pendiente del sistema}) * 100.$$

6. MARCO LEGAL

La determinación clínica de embriaguez y la determinación de alcohol en muestras biológicas, regulada por este Reglamento Técnico Forense, está enmarcada en los referentes normativos que se mencionan a continuación:

6.1.1 CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE COLOMBIA: Artículos 1 y 13

6.1.2 CÓDIGO PENAL (Ley 599 de 2000):

- Libro Segundo Parte Especial “De los Delitos en Particular”, Título I:
- Capítulo Segundo “Del Homicidio”, artículos 109 y 110, numeral 1.
- Capítulo Tercero “De las Lesiones Personales”, artículos 120 y 121.

6.1.3 CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL (Ley 600 de 2000):

- Título Preliminar “Normas Rectoras”, artículo 1.
- Libro I “Disposiciones Generales”, Título I “De las Acciones”, artículo 42.
- Libro I “Disposiciones Generales”, Título VI “Pruebas”:
- Capítulo I “Principios generales”, artículos 232 y 233.
- Capítulo II “Inspección”, artículo 248.
- Capítulo III “Prueba Pericial”, artículos 249 a 258.
- Capítulo III “Disposiciones Especiales”, artículos 288 a 290.
- Libro II “Investigación”, Título I “Investigación Previa”, Capítulo V “Detención Previa”, artículo 357, numeral 2.

6.1.4 CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL (Ley 906 de 2004)

- Título Preliminar “Principios Rectores y garantías procesales”, artículo 1.
- Libro II, Título I “La indagación y la investigación”, Capítulo I “Órganos de indagación e investigación”, artículo 204.
- Libro II, Título I “La indagación y la investigación”:
- Capítulo I “Órganos de indagación e investigación”, artículo 204.
- Capítulo III “Actuaciones que requieren autorización judicial previa para su realización”, artículos 247, 249, 250.
- Capítulo V “Cadena de Custodia”, artículos 254, 255, 257 a 265.
- Capítulo VI “Facultades de la defensa en la investigación”, artículos 267 a 270.
- Libro II, Medios cognoscitivos en la indagación e investigación”, artículos 275, 276 y 277.

- Libro III “El juicio”, Título IV “Juicio Oral”, Capítulo III “Práctica de la Prueba”, Parte III “Prueba Pericial” artículos 405 a 423.

6.1.5 CÓDIGO NACIONAL DE TRÁNSITO TERRESTRE (Ley 769 de 2002)

- Título Preliminar “principios rectores y garantías procesales”, artículo 1.
- Título I “Disposiciones Generales”, Capítulo I “Principios”, artículo 2.
- Título I, Capítulo II “Autoridades”, artículos 3 y 131, literal D.
- Título II, “Régimen Nacional de Tránsito”, Capítulo II “Licencia de Conducción”, artículo 26, numerales 3 y 4.
- Título IV “Sanciones y Procedimientos”, Capítulo II “Sanciones por Incumplimiento de las Normas de Tránsito”, artículo 131.
- Título IV “Sanciones y Procedimientos”, Capítulo VII “Actuación en Caso de Infracciones Penales”, artículo 148.
- Título IV “Sanciones y Procedimientos”, Capítulo VIII “Actuación en Caso de Embriaguez”, artículos 150 a 152.

6.1.6 CÓDIGO DISCIPLINARIO ÚNICO (Ley 734 de 2002)

- Libro II Parte Especial, Título Único “La Descripción de las Faltas Disciplinarias en Particular”, Capítulo I “Faltas gravísimas”, artículo 48.

6.1.7 CÓDIGO SUSTANTIVO DEL TRABAJO (Ley 789 de 2002)

- Artículo 60, numeral 2 y artículo 62, literal A, numeral 6.

6.1.8 DECRETO 2535 DE 1993, PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA (reglamentario de la Ley 61 de 1993 sobre armas, municiones y explosivos)

- Artículo 85, literales a y b; artículo 87 literal b; artículo 89 literales c y d.

6.1.9 RESOLUCIÓN 000414 de AGOSTO 27 de 2002, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES

- Artículo 1, literal B; artículo 3 y artículo 4.

6.1.10 RESOLUCIÓN 000453 DE SEPTIEMBRE 24 DE 2002, INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES

- Por la cual se aclara la Resolución 000414 del 27 de agosto de 2002, del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

6.1.11 RESOLUCIÓN 0-1890 de 2002, FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN

- Por la cual se reglamenta el artículo 288 de la Ley 600 de 2000.

6.1.12 RESOLUCIÓN 0-6394 DE 2004, FISCALÍA GENERAL DE LA NACIÓN

- Por la cual se adopta el Manual de Procedimientos del Sistema de Cadena de Custodia para el sistema penal acusatorio.

6.1.13 OTROS

- Régimen Disciplinario de las Fuerzas Militares (Ley 836 de 2003); Decreto No. 1108 de 1994 de la Presidencia de la República; Ley 658 de 2001 y demás normatividad relacionada con la embriaguez producida por alcohol etílico o por otras sustancias depresoras, estimulantes, alucinógenas o con efectos mixtos.

6.2 CORRELACIÓN ENTRE EMBRIAGUEZ Y ALCOHOLEMÍA

De acuerdo a la Resolución No 00414 de 27 de Agosto de 2002 del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses la interpretación se hará así:

- Resultados menores a 40 mg de etanol/100mL de sangre total, se interpretarán como estado de embriaguez negativo.
- Resultados entre 40 y 99 mg de etanol/100mL de sangre total corresponden al primer grado de embriaguez.
- Resultados entre 100 y 149 mg de etanol/100mL de sangre total corresponden al segundo grado de embriaguez.
- Resultados mayores o iguales a 150 mg de etanol/100mL de sangre total corresponden al tercer grado de embriaguez.

La unidad utilizada tanto en los reportes de alcoholemia generados por el software como en los informes periciales es mg%, que es equivalente a mg de Etanol/100mL de muestra,

7. METODOLOGÍA

La metodología se establece con base en el procedimiento estandarizado de trabajo (PET) de la Determinación de Alcholema y metanol por cromatografía de gases con Automuestreador de volátiles e identificación de acetaldehído, acetona y 2-propanol, que se encuentra documentado en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Pereira.

7.1 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1 MATERIALES Y REACTIVOS

7.1.1.1 REACTIVOS

- Etanol Estándar Certificado Primario de las siguientes concentraciones:
- 25mg%, 40mg%, 100mg%, 150mg%, 300mg% y 400mg%.
- Etanol Absoluto Grado Reactivo Analítico (R.A.)
- Metanol R.A.
- n-Propanol R.A.
- Isopropanol R.A.
- Acetona R.A.
- Acetaldehído R.A.
- Cloruro de sodio R.A.
- Agua destilada y desionizada.

7.1.1.2 EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID), (HP 6890)
- Automuestreador de volátiles Head Space Thermo Triplus.
- Sistema de manejo de información, estación de datos cromatográficos de canal simple Chem Station HP
- Columna capilar HP Blood Alcohol Análisis 7.5 metros x 0.320 mm de diámetro interno.
- Sistema de suministro de gases calidad cromatográfica: nitrógeno, aire e hidrógeno.
- Micropipeta de 100 µL -1000 µL, LABMATE
- Balanza analítica con división de escala 0.0001g
- Grafador de viales de 10 mL
- Desgrafador de viales de 10 mL

7.1.1.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- Viales de vidrio de 10 mL de capacidad de dimensiones compatibles con el Automuestreador de volátiles Head Space.
- Agrafes de aluminio de 20 mm de diámetro.
- Septas para viales de polipropileno de 20 mm de diámetro.
- Balones volumétricos de 50, 100 y 1000 mL
- Pipetas aforadas de 3, 5 y 10 mL
- Puntas para micropipetas de capacidad para 100 y 1000uL
- Vasos de precipitado de 50 mL

7.1.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Cuando la muestra para análisis de alcoholemia es sangre debe ser recogida en un tubo tapa gris que contiene fluoruro de sodio como conservante y oxalato de potasio como anticoagulante, cuando se trata de humor vítreo se recolecta en un tubo de vidrio o de plástico.

- Colocar en un vial de 10 mL nuevo, 100 mg aproximadamente de cloruro de sodio R.A.
- Homogenizar la muestra de sangre total (que esta en su envase primario) con agitación manual suave.
- Trasvasar 1 mL de sangre aproximadamente a una copilla de pasta o similar de 1 mL, si lo requiere.
- Ubicar los viales en una gradilla sobre hielo seco y servir las muestras con el aire acondicionado activado.
- Dispensar 100 μ L de estándar interno (n- propanol) y luego 200 μ L de sangre total en un vial de 10 mL.
- Colocar el tapón de polipropileno y el agrafe, grafar perfectamente el vial verificando la hermeticidad manualmente.
- Cambiar la punta de micropipeta entre la medición de cada muestra. Descartar las puntas en el guardián destinado para ello.
- Agitar vigorosamente la muestra utilizando un vortex durante aproximadamente 5 seg.
- Almacenar bajo refrigeración (Nevera 2 a 10°C) hasta el momento de colocarlos en el carrusel del Head Space para el análisis

7.1.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

7.1.3.1 HEAD SPACE

El muestreador automático de volátiles (Head Space) fue operado en las condiciones que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del Head Space

Injection Port	Injector A (SSL)
Incubation Mode	Constant
Analysis time (min)	4.0
Sample draw (mL)	1.0
Enrichments (#)	0.0
Enrichments (min)	1.0
Sampling depth in vial	Standard
Incubation Parameters	
Incubation temperature (°C)	60
Incubation time (min)	10.0
Agitator On time (s)	30
Agitator Off time (s)	20
Syringe Parameters	
Syringe temperature (°C)	90
Enable prefilling	No
Filling volume (mL)	1.2
Filling counts (#)	1
Filling delay (s)	5
Pre-Injection Syringe Flush	Yes
Speed Parameters	
Filling speed (mL/min)	30
Injection speed (mL/min)	50
Injection Parameters	
Injection depth (mm)	30
Pre-Injection delay (s)	0
Post-Injection delay (s)	3
Post-Injection Syringe Washes Parameters	
Solvent wash sequence	A,-,-,-
Solvent cycles	1
Solvent volume (mL)	0.5
Dry time (s)	5
Wash frequency	Never

Stand by Parameters	
St-by Incubation temperature (°C)	60
St-by Syringe temperature (°C)	90
St-by Syringe flush	<i>Off</i>
Sync Mode	
Start sync mode	Normal
Anticipated sync before end of incubation time	
Anticipated time (min)	5
Advanced Parameters	
Needle speed into vial (mm/s)	30

7.1.3.2 CROMATÓGRAFO DE GASES

- **IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO**

La identidad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia. Se establecen entonces el tiempo de retención del analito (t_r), el coeficiente de capacidad (k), simetría, y resolución (R). Estos parámetros se evalúan usando el nivel 3 de la curva de calibración secundaria el cual contiene la totalidad de los analitos estudiados.

El cromatógrafo de gases fue operado en las condiciones que se describen en la Tabla 5. Estas condiciones son basadas en las que están descritas en el DG-M-PET-02-V05.

Tabla 5. Condiciones del Cromatógrafo de Gases

OVEN	Inicial Temp.	120 (On)		
	Inicial time	1.00 min.		
	Ramps			
	#	Rate	Final Temp.	Final time
	1	25.00	165	0.5
	2	0.0 (Off)		
	Post Temp.	50 °C		
	Pos time	0.00 min.		
	Run time	3.3 min.		
	Mode	Split/Splitless		
	Inicial Temp.	250 (On)		

BACK INLET	Pressure	5.00 psi (On)
	Split ratio	50:1
	Split flow	85.4 mL/min
	Total flow	89.0 mL/min
	Gas saver	Off
	Saver flow	0.0 mL/min
	Saver time	
	Gas type	Nitrogen
COLUMNNA	Capillary columna	
	Model Number	J&W 19091S-510 BALC
	Max temperature	270
	Nominal length	7.5 m
	Nominal diameter	320.00 um
	Nominal film thickness	20.00 um
	Mode	Constant pressure
	Pressure	5.00 psi
	Nominal initial flow	1.7 mL/min
	Average velocity	52 cm/seg
	Inlet	Back Inlet
	Outlet	Back detector
	Outlet pressure	Ambient
DETECTOR	Temperature	300 (On)
	Hydrogen flow	40.0 ml/min (On)
	Air Flow	350.0 mL/min
	Mode	Constant makeup flow
	Makeup flow	30.0 mL/min
	Makeup Gas type	Nitrogen
	Flame	On
	Electrometer	On
	Lit offset	2.0

8. ANÁLISIS Y RESULTADOS.

La evaluación de los parámetros de calidad fue realizada utilizando dos matrices:

- Una matriz acuosa denominada sistema que se asemeja al humor vítreo, esto se hace debido a que es muy difícil la recolección de un volumen suficiente de este para la preparación de las soluciones de trabajo.
- Una matriz de sangre llamada método, en ella se evalúa la respuesta del análisis en una de las muestras biológicas más utilizadas para la elaboración de dicha prueba.

8.1 REPETIBILIDAD PARA EL ESTÁNDAR INTERNO

El estándar interno se utiliza en cromatografía de gases con el fin de poder efectuar una determinación cuantitativa, ya que la cantidad de analito es proporcional a la intensidad del pico, para ello se realiza una curva de calibración con estándares de concentración conocida, cada muestra conteniendo el estándar, esta curva es una dependencia entre la relación de concentraciones y la relación de áreas (Analito / estándar interno), el estándar garantiza una relación constante de áreas con los analitos presentes en la muestra.

Por esto se hace necesario inicialmente evaluar la repetibilidad que presenta el estándar interno en cuanto a sus áreas y en su tiempo de retención.

El estándar interno n-Propanol, fue preparado el 24 de Junio de 2010. En la tabla 6 se observa que 21 días después de su preparación el estándar presenta una buena repetibilidad ya que su desviación estándar relativa no supera el 5%.

Tabla 6. Datos de repetibilidad para el estándar interno a los 21 días de su preparación.

15/07/2010		
# muestra	Tiempo de retención (min)	Área
1	3,084	133,783
2	3,083	138,638
3	3,083	126,724
4	3,084	124,108
5	3,084	120,040
6	3,083	125,935
7	3,083	129,920
8	3,085	127,178
9	3,083	134,873
10	3,082	139,150
Promedio	3,083	130,035
S.D.	0,0008	6,3731
R.S.D.	0,0273	4,9010

En la tabla 7 se puede apreciar que las mediciones realizadas al estándar interno siguen presentando buena repetibilidad y estabilidad aun después de 75 días de preparación, presentando un coeficiente de variación menor del 5%, lo cual indica que el estándar aun esta en optimas condiciones.

Tabla 7. Datos de repetibilidad del estándar interno un día distinto para verificar estabilidad.

ESTABILIDAD AL 07/09/2010		
# muestra	Tiempo de retención (min)	Área
1	3,008	223,556
2	3,008	238,814
3	3,010	223,271
4	3,009	224,159
5	3,009	238,890
6	3,011	221,093
7	3,010	238,725
8	3,010	228,878
9	3,010	229,283
10	3,010	241,160
Promedio	3,010	230,783
S.D.	0,0010	7,8407
R.S.D.	0,0323	3,3974

8.2 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATÓGRAFICO Y ESPECIFICAD

Para determinar la idoneidad y especificidad del sistema cromatográfico se realizo un análisis de estadística extendida sobre un Cromatógrama correspondiente al nivel 3 de la curva (mostrado en la figura 1), ya que en él se presentan todos los analitos de interés, los datos presentados en la tabla 8 son un promedio de los valores reportados en el anexo 1 que son extraídos directamente del equipo.

Figura 1. Cromatógrama del nivel 3 de la curva que contiene todos los analitos.

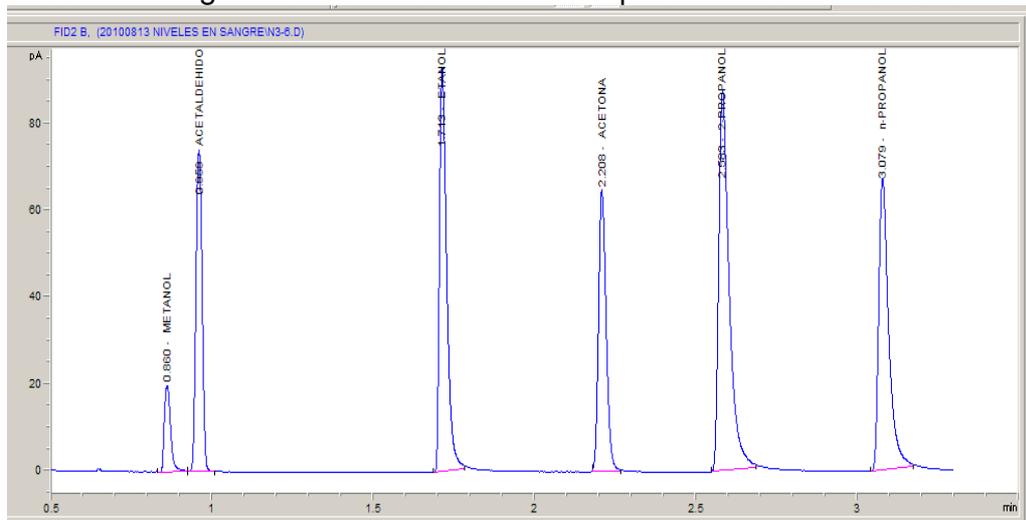


Tabla 8. Parámetros cromatográficos para los analitos estudiados.

Parámetros Evaluados:		Criterio de Aceptación			
Tiempo de Retención (tr)		CV ≤ 5%			
Factor de Capacidad (K')		Entre 1.5 y 10			
Factor de Simetría (S)		≤ 2			
Resolución		≥ 2			
Platos Teóricos (N)					
ESTADÍSTICO	tr (min.)	K	Simetría	N	Resolución
METANOL					
Promedio	0,85990	2,55873	0,73245	9708,47677	N/A
S	0,000	0,001	0,011	82,821	N/A
CV (%)	0,035	0,048	1,434	0,853	N/A
ACETALDEHÍDO					
Promedio	0,95893	2,96856	0,92389	11551,61328	2,80100
S	0,000	0,001	0,001	6,980	0,007
CV (%)	0,030	0,040	0,086	0,060	0,263

ESTADÍSTICO	tr (min.)	K	Simetría	N	Resolución
ETANOL					
Promedio	1,71321	6,09021	0,54357	30860,57	20,16264
S	0,000	0,002	0,004	768,648	0,135
CV (%)	0,026	0,030	0,763	2,491	0,672
ACETONA					
Promedio	2,20911	8,14248	0,78231	42835,14648	12,11812
S	0,000	0,001	0,009	486	0,030
CV (%)	0,022	0,017	1,173	1,135	0,249
ISOPROPANOL					
Promedio	2,58345	9,69171	0,54600	33012,41395	7,50446
S	0,001	0,002	0,009	1942,538	0,127
CV (%)	0,020	0,022	1,613	5,884	1,698
N-PROPANOL					
Promedio	3,07994	11,74644	0,58066	52493,76200	8,95452
S	0,001	0,002	0,005	2847,040	0,175
CV (%)	0,019	0,021	0,939	5,424	1,949

tr: tiempo de retención en min, k: factor de capacidad, N: numero de platos teóricos, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, la media corresponde a 4 determinaciones.

En la tabla 8, se puede observar que los tiempos de retención para cada analito presentan coeficiente de variación inferior a 0,035%. El factor de capacidad tiene un rango de aceptación entre 2 y 10, rango que se cumple para todos los analitos excepto para el n-propanol aunque no se considera significativo ya que excede muy poco el rango. Para todos los analitos se cumple que la simetría es menor de 1, lo que indica que no existen colas en los picos cromatográficos. Se muestra que el número de platos teóricos es significativamente alto, en pruebas anteriores con una columna desgastada se presento el traslape de los picos de acetaldehído y metanol, característica que puede servir como un indicador de deterioro de la columna. En cuanto a la resolución se sabe que lo ideal es que sea mayor de 2, criterio que aceptan todos los analitos, para el metanol no aplica la resolución ya que es el primer pico que se encuentra después del tiempo muerto.

Según estos resultados se puede considerar que el sistema cromatógrafico es idóneo y específico.

8.3 VALIDACIÓN

8.3.1 SELECTIVIDAD

Se realizaron corridas de cada analito por separado y de algunos solventes volátiles para verificar los tiempos de retención y determinar posibles interferencias.

Tabla 9. Parámetros y criterios de selectividad.

SELECTIVIDAD	
Parámetros Evaluados:	1. Tiempo de retención (Tr) de solventes que potencialmente pueden interferir en el análisis
	2. Los blancos de las muestra no presentan interferentes
Criterio de Aceptación:	1. Ninguno de los solventes analizados presenta el mismo Tr de los analitos de interés
	2. Los blancos de las muestra no presentan interferentes

Tabla 10. Tiempos de retención de los analitos de interés.

Tr ANALITOS DE INTERÉS	
ANALITO	Tr
METANOL	0,832
ACETALDEHÍDO	0,927
ETANOL	1,676
ACETONA	2,164
2-PROPANOL	2,534
n-PROPANOL	3,014

Cada dato corresponde al promedio de 3 mediciones

En la tabla 10 se observa que no se presentaron interferencias entre el etanol, acetaldehído, acetona, 2-propanol y n-propanol.

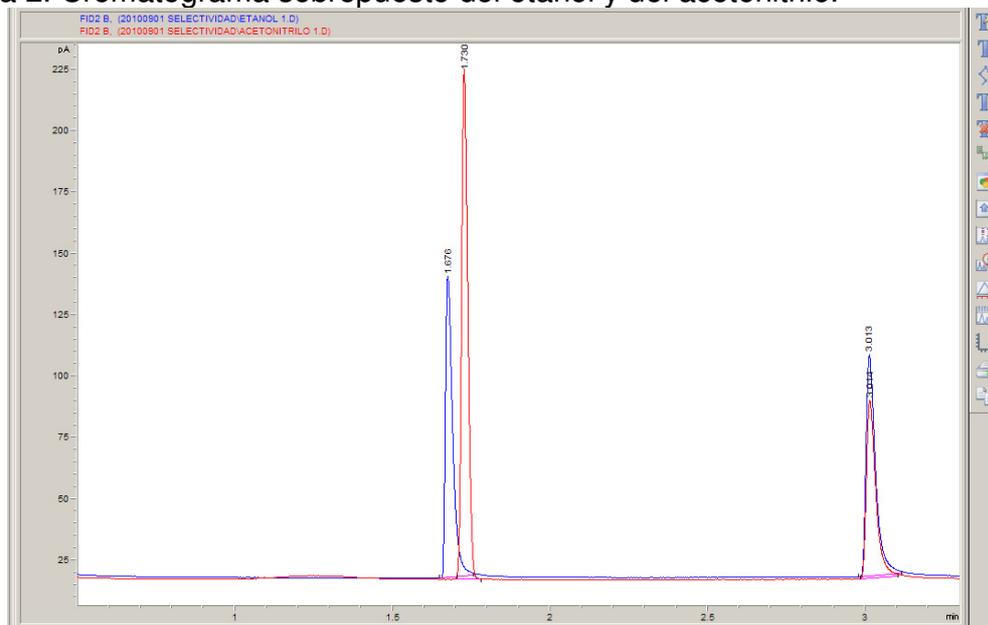
Tabla 11. Tiempos de retención de los solventes estudiados.

SOLVENTES ESTUDIADOS	
SOLVENTE	Tr
Vial solo	(1)
Vial con agua y NaCl	(1)
Vial con sangre	(1)
Acetonitrilo	1,73
Alcohol isoamílico	(1)
n-Butanol	(1)
Hexano	(1)
Acetato de Etilo	(1)
Tolueno	(1)

(1) – No presento ninguna señal

De la tabla anterior se determina que no se presentó ninguna interferencia entre los analitos de interés y analitos volátiles como acetonitrilo, alcohol isoamílico, n-butanol, hexano, tolueno y acetato de etilo a concentración de 100 mg%. Para garantizar que no se traslapaba el pico del acetonitrilo, que fue el único solvente que mostró respuesta a un tr de 1,73 se realizó una sobreposición del cromatógrama de este solvente con un cromatógrama del etanol, como se muestra en la figura 2. (El pico azul corresponde al etanol y el rojo es el correspondiente al acetonitrilo).

Figura 2. Cromatógrama sobrepuesto del etanol y del acetonitrilo.



De estos resultados se concluye que el método es selectivo.

8.3.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE y CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE.

Se realizaron diluciones a partir del nivel 3 de la curva de acuerdo a la tabla 12.

Tabla 12. Diluciones realizadas al nivel tres para el cálculo de la CMD y CMC.

	Volumen tomado nivel 3 (µL)	Volumen dilución (mL)	[] final EtOH	[] final MeOH
C6	1500	10	15	7,5
C5	1000	10	10	5
C4	750	10	7,5	3,75
C3	500	10	5	2,5
C2	300	10	3	1,5
C1	100	10	1	0,5

Se realizó una corrida de cuatro repeticiones de cada una de las concentraciones que se muestran en la tabla 12, a partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que las concentraciones donde se logran diferenciar las señales de los analitos de una manera cualitativa son de 5 mg% para el etanol y 7,5 mg% para metanol, ya que integra sus picos, presenta repetibilidad en sus resultados, mas no se tiene precisión en los datos arrojados de las concentraciones como se indica en la tabla 13, por lo que no pueden ser considerados para cuantificar, los valores de la corrida se encuentran listados en la carpeta Alcoholemia 2010 (que reposa en la documentación de validación en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Ciudad de Pereira).

Tabla 13. Resultados límite de detección de etanol y metanol.

	Concentración teórica EtOH	Concentración teórica MeOH	Concentración leída EtOH	CV %	Concentración leída MeOH	CV%
C1	1	0,5	-	-	-	-
C2	3	1,5	-	-	-	-
C3	5	2,5	7,65474	0,571	-	-
C4	7,5	3,75	9,94466	0,711	-	-
C5	10	5	12,22329	1,105	-	-
C6	15	7,5	16,90351	1,501	8,32642	4,785

Los valores de las concentraciones leídas corresponden al promedio de 4 datos.

En el hombre, dependiendo de las costumbres alimenticias se puede generar etanol o metanol endógeno con concentraciones en sangre de hasta 1,5 mg% y 0,15 mg% respectivamente, ya que el límite de detección es superior en ambos casos se evita el reporte de falsos positivos.

El límite de cuantificación es la menor concentración a la que un analito presenta una buena precisión, estas concentraciones son 15mg% para el etanol y 10 mg% para el metanol correspondientes a los niveles más bajos de las curvas como se muestra en la tabla 14, por lo que valores encontrados por debajo de estos límites

se reportan como concentración de etanol menor de 15 mg% y concentración de Metanol menor de 10mg%, esto se presenta en la carpeta No 1 (Alcoholemia 2010).

Tabla 14. Resultados límite de cuantificación de etanol y metanol.

Concentración teórica	Concentración Leída	% CV
EtOH 15 mg%	15,89281	2,324
	15,72027	
	16,32378	
	15,91907	
MeOH 10 mg%	10,74872	1,601
	10,89642	
	11,33819	
	10,92317	

8.3.3 PRECISIÓN.

Este término está determinado por dos conceptos, la repetibilidad y la precisión intermedia, que indican las desviaciones en los datos debidas a errores aleatorios durante el proceso.

8.3.4 REPETIBILIDAD.

8.3.4.1 ETANOL

Para evaluar la repetibilidad del Etanol se realizaron 4 repeticiones de cada nivel contra la curva de estándares certificados en el caso del sistema y en el caso del método contra la curva de trabajo, con el fin de observar el coeficiente de variación en los resultados arrojados y de verificar que las concentraciones de cada nivel se encuentren dentro del rango de concentraciones aceptadas, los cálculos efectuados se reportan en el anexo 2.

Tabla 15. Repetibilidad para Etanol.

REPETIBILIDAD DE ETANOL SISTEMA						
ESTADÍSTICO	CONCENTRACIÓN					
	15 mg%	40 mg%	100 mg%	200 mg%	300 mg%	400 mg%
PROMEDIO	13,73	39,63	99,60	203,34	303,78	394,28
DESV EST.	0,245	0,580	0,381	5,399	8,543	15,279
RSD %	1,788	1,463	0,383	2,655	2,812	3,875
Rango de aceptación	13-18	36-44	95-105	190-210	285-315	380-420

REPETIBILIDAD DE ETANOL MÉTODO						
ESTADÍSTICO	CONCENTRACIÓN					
	15 mg%	40 mg%	100 mg%	200 mg%	300 mg%	400 mg%
PROMEDIO	15,96	41,55	96,57	206,60	297,98	405,37
DESV EST.	0,256	0,233	1,098	3,824	11,402	7,871
RSD %	1,601	0,561	1,137	1,851	3,826	1,942
Rango de aceptación	13-18	36-44	95-105	190-210	285-315	380-420

Los datos corresponden al promedio de 4 datos.

RSD: desviación estándar relativa, valores expresados en concentraciones de etanol.

Los niveles tanto del sistema como del método se aceptan, ya que como se observa en la tabla 15 los promedios de las concentraciones se encuentran dentro del rango de aceptación y el valor de RSD no se excede del 4%.

Para la metodología acuosa (Sistema), es aceptable un coeficiente de variación de hasta el 5%, mientras que para la metodología bioanalítica que tienen como matriz sangre (Método), se acepta un coeficiente de variación del 15%, por lo tanto para el sistema y el método se cumplen con los criterios de repetibilidad para el etanol.

8.3.4.2 METANOL.

Para el metanol, al igual que para el etanol se verifica la repetibilidad de sus resultados realizando 4 repeticiones de los niveles 1, 3 y 5, corridos contra la curva de trabajo tanto en sistema como en método, los resultados se pueden observar en el anexo 3.

Tabla 16. Repetibilidad para Metanol

REPETIBILIDAD DE METANOL SISTEMA			
ESTADÍSTICO	CONCENTRACIÓN		
	10 mg%	50 mg%	150 mg%
PROMEDIO	10,96	52,50	152,73
DESV EST.	0,247	0,993	4,843
RSD %	2,253	1,891	3,171
Rango de aceptación	9-12	45-55	143-158
REPETIBILIDAD DE METANOL MÉTODO			
ESTADÍSTICO	CONCENTRACIÓN		
	10mg%	50 mg%	150 mg%
PROMEDIO	10,97	51,49	154,72
DESV EST.	0,255	1,282	4,804
RSD %	2,324	2,490	3,105
Rango de aceptación	9-12	45-55	143-158

Los datos corresponden al promedio de 4 datos.

RSD: coeficiente de variación, valores expresados en concentraciones de Metanol.

La tabla 16 indica que tanto para el sistema como para el método el promedio de las concentraciones de metanol no se sale del rango de aceptación, y los coeficientes de variación no superan el 3,5%, la metodología es precisa en el rango de concentraciones estudiadas.

8.3.5 PRECISIÓN INTERMEDIA.

8.3.5.1 ETANOL.

Para determinar la precisión intermedia del método respecto al Etanol se realizaron corridas de los niveles alto, medio y bajo de la curva de calibración durante tres días diferentes y por dos analistas los resultados obtenidos expresados en concentraciones de Etanol se encuentran en la tabla 17.

Tabla 17. Precisión intermedia del método en tres días diferentes, tres concentraciones y dos analistas.

PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE ETANOL
--

Concentración mg%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
15	15,230	13,592	14,637	14,399	14,049	14,388
	15,495	13,041	14,319	14,510	14,397	14,375
	14,715	13,976	13,867	14,268	14,185	14,454
	14,980	13,430	14,007	14,404	14,091	14,620
Promedio	14,27410667			14,3448575		
S.D	0,754140196			0,167799372		
R.S.D	5,283274205			1,169752796		
R.S.D Global	3,742351266					

100	96,408	97,628	99,405	97,690	97,183	97,743
	99,549	97,887	98,656	95,150	96,405	97,920
	97,953	97,204	99,781	96,364	97,613	96,904
	94,583	98,364	98,224	100,026	95,798	95,638
Promedio	97,97016417			97,03624		
S.D	1,450460315			1,311414287		
R.S.D	1,480512284			1,351468571		
R.S.D Global	1,470676869					

Concentración mg%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	DIA 1	DIA 2		DIA 1	DIA 2	
400	416,872	414,781	390,145	406,027	391,837	406,755
	401,865	409,061	398,880	410,446	407,069	394,785
	413,754	399,713	413,702	408,720	406,388	402,317
	414,146	409,733	410,132	409,105	391,638	400,840
Promedio	407,7320775			402,9940042		
S.D	8,225129441			6,762649063		
R.S.D Global	2,017287796			1,678101657		
R.S.D Global	1,912216897					

ANALISTA 1: GLORIA INÉS OSPINA V.

ANALISTA 2: LINA ERIKA GALVIS M.

Se puede observar en la tabla 17 que los coeficientes de variación globales no superan el 4%, ya que para metodologías bioanalíticas se acepta un RSD de hasta 15%, entonces se puede concluir que el método es reproducible en el rango de concentraciones evaluadas.

En la tabla 18 se muestra el análisis de varianza ANOVA, realizado a los datos obtenidos de la precisión intermedia del Etanol en el método, el análisis se realizó sobre los datos de relaciones de áreas que se muestran en el anexo 4, en sus resultados se muestra que el F experimental es menor que el F de tabla por lo que se considera que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados.

Tabla 18. Análisis de varianza precisión intermedia del Etanol.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0549175	23	0,002387717	0,00046778	1	1,756759381
Dentro de los grupos	245,009266	48	5,104359708			
Total	245,0641835	71				

8.3.5.2 METANOL.

Para evaluar la precisión intermedia del método en cuanto a metanol se realizaron corridas de los niveles alto, medio y bajo, en tres días diferentes y por dos analistas.

Tabla 19. Precisión intermedia del método en tres días diferentes, tres concentraciones evaluadas y dos analistas.

PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE METANOL						
Concentración mg%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
10	10,401	10,980	10,537	10,564	10,526	10,335
	11,154	9,294	11,074	10,390	10,860	9,936
	11,083	10,659	10,343	10,413	10,409	10,572
	10,945	9,592	10,681	10,569	10,993	10,624
Promedio	10,539					
S.D	0,448888166					
R.S.D	4,259296361					
50	53,622	51,292	52,768	54,349	51,360	56,295
	55,138	55,260	54,747	50,308	51,849	54,313
	54,647	56,965	52,822	52,412	52,336	54,329
	51,243	56,324	51,431	53,669	52,093	50,666
Promedio	53,343					
S.D	1,902441787					
R.S.D	3,56641405					
150	152,403	141,934	152,108	150,654	158,228	147,648
	149,806	143,185	153,118	153,735	154,830	147,956
	156,004	145,904	152,225	150,106	144,689	152,373
	158,902	156,916	154,270	149,543	154,132	147,390
Promedio	151,169					
S.D	4,543608332					
R.S.D Global	3,005643547					

ANALISTA 1: GLORIA INÉS OSPINA V.

ANALISTA 2: LINA ERIKA GALVIS M.

RSD: coeficiente de variación; valores expresados en concentraciones de etanol.

En la tabla 19 se observa que los coeficientes de variación no superan el 5%, lo que hace que para el analito de interés este método sea reproducible.

La tabla 20 relaciona el análisis de varianza ANOVA efectuado a los resultados obtenidos para la precisión intermedia del método respecto al Metanol, los datos utilizados para el análisis se muestran en el anexo 5, se puede observar que el valor experimental de F es menor que el de tabla, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre concentraciones.

Tabla 20. Análisis de varianza precisión intermedia del Metanol.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00230663	23	0,000100288	0,00136618	1	1,756759381
Dentro de los grupos	3,523563451	48	0,073407572			
Total	3,525870081	71				

8.3.6 DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LAS CURVAS

La evaluación de la linealidad de una gráfica de calibración se realiza con la herramienta de regresión lineal, la dispersión de los puntos que componen la grafica se ajustan a una línea recta empleando el método de los mínimos cuadrados que generan una ecuación de la forma $y = bx + a$ donde b corresponde a la pendiente y a al intercepto en el eje y, y se obtiene de la relación de áreas del analito y el estándar interno, x es la concentración del etanol. El valor del coeficiente de correlación (r) debe ser cercano a 1 para tener una correlación directamente proporcional.

8.3.6.1 ETANOL.

Se evaluó la linealidad del etanol tanto en el sistema como en el método y se efectuaron dos análisis estadísticos: El t de student y el análisis de varianza ANOVA. Para ello se realizaron corridas con cuatro repeticiones por nivel, obteniéndose los siguientes resultados. (Tabla 21; anexo 6 y 7)

La tabla 21 muestra los datos utilizados para realizar la curva de calibración del sistema y en la tabla 22 los correspondientes al método. En el anexo 6 se pueden observar los cálculos realizados para la linealidad del etanol en el sistema, los correspondientes al método se encuentran en el anexo 7.

Tabla 21. Datos usados para la curva de calibración de etanol en el sistema y obtención de la ecuación.

ETANOL – SISTEMA			
PROMEDIOS			
NIVEL	CONCENTRACIÓN mg%	RELACIÓN CONCENTRACIONES	RELACIÓN DE ÁREAS
1	15	0,136	0,137
2	40	0,399	0,432
3	100	1,043	1,152
4	200	1,907	2,123
5	300	2,892	3,222
6	400	3,916	4,367
b		1,093	
a		-0,046	
r		0,99937	

Cada dato corresponde al promedio de 4 mediciones.

Figura 3. Curva de calibración para etanol sistema

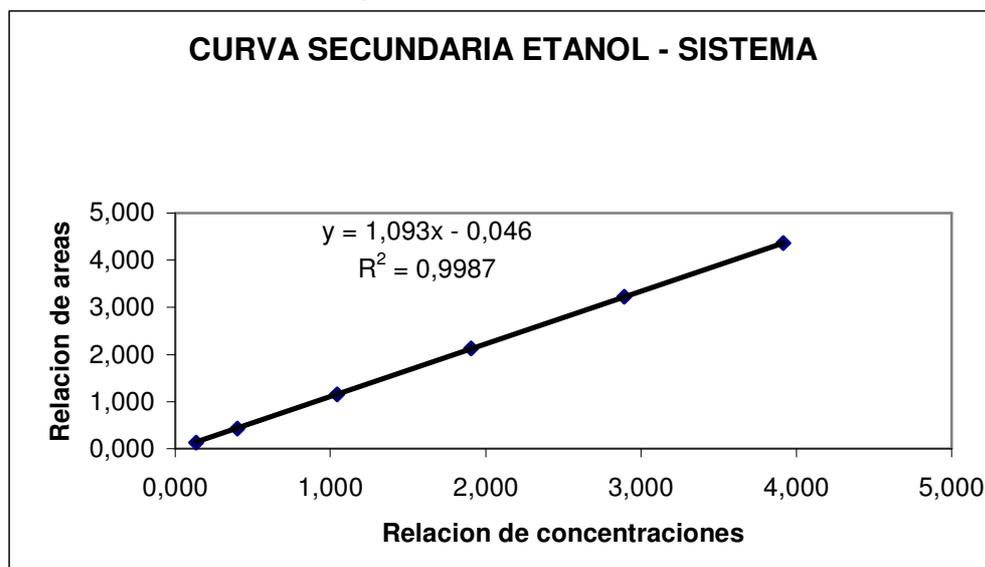
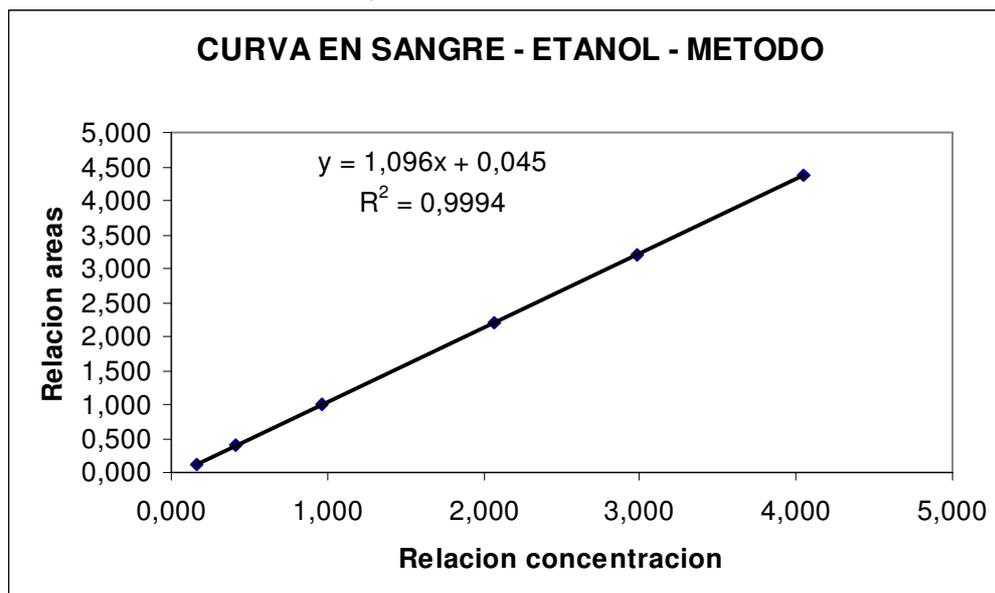


Tabla 22. Datos usados para la curva de calibración de etanol en el método y obtención de la ecuación.

ETANOL – MÉTODO			
PROMEDIOS			
NIVEL	CONCENTRACIÓN mg%	RELACIÓN CONCENTRACIONES	RELACIÓN DE ÁREAS
1	15	0,160	0,128
2	40	0,416	0,408
3	100	0,966	1,009
4	200	2,066	2,210
5	300	2,980	3,204
6	400	4,054	4,382
b		1,096	
a		0,045	
r		0,99970	

Figura 4. Curva de calibración para etanol método.



Las figuras 3 y 4 muestran que tanto el sistema como el método no presentan dispersión amplia de sus puntos y que según el valor del coeficiente de correlación se trata de una tendencia lineal con pendiente positiva.

Tabla 23. Análisis del intercepto, pendiente, coeficiente de correlación para etanol en el sistema y el método.

PARÁMETRO	SISTEMA	MÉTODO	COMPARACIÓN
b	1,093	1,096	t exp > t _{0,975} se rechaza la hipótesis nula, pendiente es significativamente diferente de cero
Sb	0,0486	0,04619	
tb experimental	22,4886	23,7359	
T tabla	2,07	2,07	
Limite de Confianza superior	1,1936	1,1916	
Limite de Confianza inferior	0,9924	1,0004	
a	-0,046	0,045	t exp < t _{0,975} se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
Sa	0,05305	0,05226	
ta experimental	0,87421	0,8645	
T tabla	2,07	2,07	
Limite de Confianza superior	0,0638	0,1532	
Limite de Confianza inferior	-0,1558	-0,0632	
R	0,99937	0,99970	t exp > t _{0,975} se rechaza la hipótesis nula, el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero
R ²	0,99874	0,99940	
Tr experimental	137,926	219,292	
T tabla	2,07	2,07	

r coeficiente de correlación, r² coeficiente de determinación, a intercepto, Sa desviación estándar del intercepto, b pendiente, Sb desviación estándar de la pendiente.

Para el análisis de alcoholemia el valor del coeficiente de correlación debe ser de mínimo 0,999, en la tabla 23 se puede observar que el coeficiente es significativamente diferente de cero y que ambos coeficientes son mayores que el valor nominal, garantizando de esta forma la linealidad en el rango de concentraciones evaluadas, además de acuerdo a los estimadores estadísticos la pendiente es significativamente diferente de cero y el intercepto no es significativamente diferente de cero, los cálculos realizados pueden apreciarse en el anexo 6 para el sistema y 7 para el método.

Tabla 24. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del etanol en el sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99999928
Coeficiente de determinación R ²	0,99999855
R ² ajustado	0,99999849
Error típico	0,00189789
Sxx	437818,369
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F exp	Valor crítico de F
Regresión	1	54,83183777	54,83183777	15222687,9	4,41
Residuos	22	7,92436E-05	3,60198E-06		
Total	23	54,83191701			

Tabla 25. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del etanol en el método.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	1
Coeficiente de determinación R ²	1
R ² ajustado	1
Error típico	7,2513E-08
Sxx	474286,462
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F exp	Valor crítico de F
Regresión	1	56,64524027	56,64524027	1,0773E+16	4,41
Residuos	22	1,15677E-13	5,25806E-15		
Total	23	56,64524027			

Los resultados del análisis de varianza realizado para el etanol tanto en el sistema como en el método se encuentran en las tablas 24 y 25 respectivamente, en ambos se puede observar que el F experimental es mayor al F de tabla, por lo que no se rechaza la hipótesis nula, es decir no hay desvío en la regresión. El procesamiento de los datos se encuentra registrado en el anexo 8.

8.3.6.2 METANOL.

Las tablas 26 y 27 exponen los promedios obtenidos de los cálculos realizados para la linealidad del metanol en el sistema y método que se muestran en los anexos 9 y 10 respectivamente.

Tabla 26. Datos usados para la curva de calibración de metanol en el sistema y obtención de la ecuación.

METANOL – SISTEMA			
PROMEDIOS			
NIVEL	CONCENTRACIÓN mg%	RELACIÓN CONCENTRACIONES	RELACIÓN DE ÁREAS
1	10	0,110	0,035
3	50	0,525	0,188
4	150	1,527	0,555
b		0,366	
a		-0,005	
r		0,99958	

Figura 5. Curva de calibración para metanol sistema

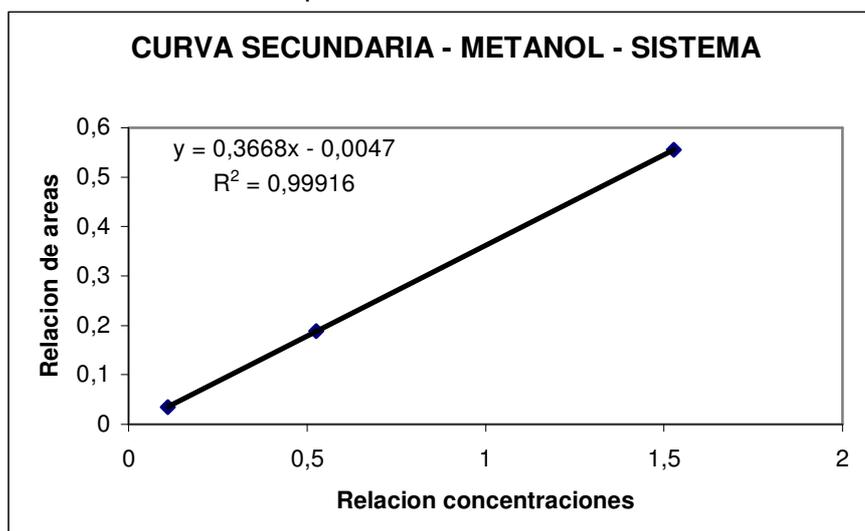
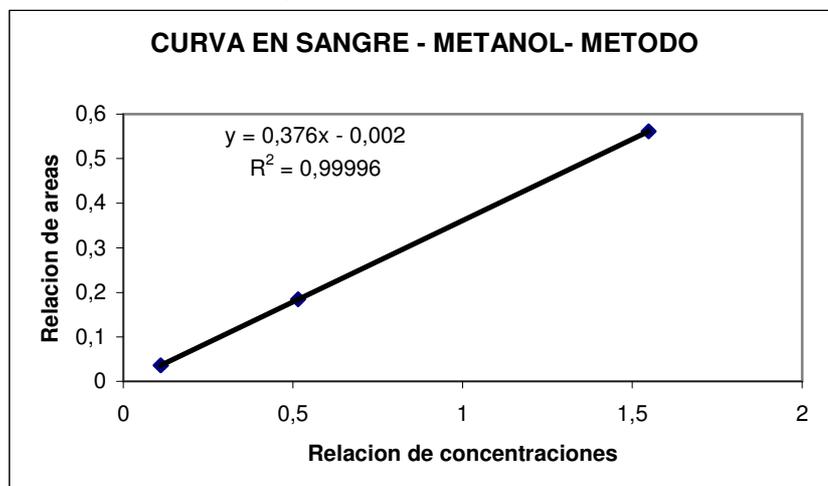


Tabla 27. Datos usados para la curva de calibración de metanol en el método y obtención de la ecuación.

METANOL – SISTEMA			
PROMEDIOS			
NIVEL	CONCENTRACIÓN mg%	RELACIÓN CONCENTRACIONES	RELACIÓN DE ÁREAS
1	10	0,110	0,036
3	50	0,515	0,184
4	150	1,547	0,562
b		0,376	
a		-0,002	
r		0,99998	

Figura 6. Curva de calibración para metanol método



En las figuras 5 y 6 se puede observar la tendencia lineal de la recta, en ambos casos el coeficiente de correlación es positivo, así como su pendiente. Se aprecia el mismo comportamiento de los datos en el sistema y la muestra.

Tabla 28. Análisis de intercepto, pendiente, coeficiente de correlación para metanol en el sistema y el método.

PARÁMETRO	SISTEMA	MÉTODO	COMPARACIÓN
b	0,3668	0,376	t exp > t _{0,975} se rechaza la hipótesis nula, pendiente no es significativamente diferente de cero
Sb	0,158516	0,155451	
tb experimental	2,309547	2,418763	
T tabla	2,2	2,2	
Limite de Confianza superior	0,7155	0,718	
Limite de Confianza inferior	0,0181	0,034	t exp < t _{0,975} se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
a	-0,005	-0,002	
Sa	0,074061	0,072629	
ta experimental	0,061436	-0,02754	
T tabla	2,2	2,2	
Limite de Confianza superior	0,1579	0,1578	t exp > t _{0,975} se rechaza la hipótesis nula, el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero
Limite de Confianza inferior	-0,1679	-0,1618	
r	0,99958	0,99998	
r ²	0,99916	0,99996	
Tr experimental	43,75726	547,7116	
T tabla	2,2	2,2	

Los datos obtenidos en la tabla 28 nos indican una tendencia lineal ya que en ambos casos el coeficiente de correlación tiene valores superiores al 0,999, se muestra igualmente que la pendiente es significativamente diferente de cero, mientras que para el intercepto es un valor mas cercano a cero. Los cálculos para la obtención de estos resultados se presentan en el anexo 9 para el sistema y en el anexo 10 para el método.

Tabla 29. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del metanol en el sistema.

Estadísticas de la regresión					
Coeficiente de correlación múltiple		0,999999956			
Coeficiente de determinación R ²		0,999999912			
R ² ajustado		0,999999904			
Error típico		7,08007E-05			
Sxx		42564,39689			
Observaciones		12			
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F exp	Valor crítico de F
Regresión	1	0,572719312	0,572719312	114252924	5,12
Residuos	10	5,01273E-08	5,01273E-09		
Total	11	0,572719362			

Tabla 30. Análisis de varianza ANOVA de linealidad del metanol en el método.

Estadísticas de la regresión					
Coeficiente de correlación múltiple		1			
Coeficiente de determinación R ²		1			
R ² ajustado		1			
Error típico		1,3393E-05			
Sxx		45450,2417			
Observaciones		12			
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F exp	Valor crítico de F
Regresión	1	0,592252218	0,592252218	3301612434	5,12
Residuos	10	1,79383E-09	1,79383E-10		
Total	11	0,59225222			

Al igual que en el análisis de varianza del etanol, en el metanol se obtienen valores de F experimentales son mayores al valor de tabla como se puede apreciar en las tablas 29 y 30 respectivas del sistema y el método, por lo tanto para el metanol también se concluye que no hay desvío en la regresión ya que no se rechaza la hipótesis nula. El anexo 11 muestra los datos usados para el análisis de varianza efectuado.

8.3.7 SENSIBILIDAD

Esta dada por la pendiente de la curva de calibración: 1.093 mg%/pA para el Etanol y 0.366 mg%/pA para el Metanol

8.3.7.1 EXACTITUD

8.3.7.1.1 ETANOL

En la tabla 31 se dan los datos de exactitud al comparar las pendientes del método y del sistema para el etanol.

Tabla 31. EXACTITUD ETANOL

EXACTITUD ETANOL	
b-SISTEMA	b-MÉTODO
1.09286	1.09646
99.73 %	

b= pendiente

El Porcentaje de recuperación para el etanol es del 99.73% lo cual indica que la metodología se acepta en cuanto al parámetro de exactitud ya que para metodologías bioanalíticas se acepta de 80 a 120 % en porcentajes de recuperación.

8.3.7.1.2 METANOL

En la tabla 32 se observan los resultados del porcentaje de recuperación para el metanol

Tabla 32. EXACTITUD METANOL

EXACTITUD METANOL	
b-SISTEMA	b-MÉTODO
0.366803	0.375496
97.55 %	

b = pendiente

Se acepta la metodología en cuanto a exactitud ya que cumple con porcentajes de recuperación entre 80-120% que es lo recomendado para metodologías bioanalíticas.

8.3.8 COMPARACIÓN DE LAS MEDICIONES

8.3.8.1 COMPARACIÓN ENTRE SISTEMA Y MÉTODO

Se comparan los resultados obtenidos de las curvas de calibración para el sistema y el método, la hipótesis nula planteada es que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los ensayos realizados con agua y sangre como matriz.

8.3.8.1.1 ETANOL

La tabla 33 muestra los datos utilizados en el análisis de varianza ANOVA de un factor. (Ver anexo 6).

Tabla 33. Datos para la comparación entre el sistema y el método, analito Etanol.

	SISTEMA	MÉTODO
Nivel 1	0,133	0,127
	0,136	0,125
	0,140	0,132
	0,136	0,128
Nivel 2	0,438	0,410
	0,430	0,405
	0,434	0,410
	0,429	0,406
Nivel 3	1,140	1,009
	1,147	1,025
	1,175	0,995
	1,147	1,007
Nivel 4	2,095	2,257
	2,158	2,233
	2,112	2,162
	2,128	2,194
Nivel 5	3,217	3,356
	3,230	3,078
	3,199	3,142
	3,244	3,264
Nivel 6	4,325	4,383
	4,379	4,146
	4,372	4,267
	4,392	4,470

Valores correspondientes a la relación de áreas

Tabla 34. ANOVA para la comparación de tratamientos, Etanol.

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Ho: No hay diferencia significativa entre los tratamientos Sistema y Método.						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,043796	7	0,006256568	0,00227189	0,999999995	2,2490
Dentro de los grupos	110,1560	40	2,753900271			
Total	110,1998	47				

En la tabla 34 se presentan los datos obtenidos del análisis usando ANOVA de un factor, el valor de F exp es menor que el F de tabla por lo que no se rechaza la hipótesis nula y se determina que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores del sistema y método.

8.3.8.1.2 METANOL

Para el caso del Metanol se realizó de igual manera el análisis de varianza o ANOVA de un factor para determinar si existen diferencias entre las dos matrices. (Ver anexo 9).

Tabla 35. Datos para la comparación entre el sistema y el método, analito Etanol.

	SISTEMA	MÉTODO
Nivel 1	0,036	0,035
	0,036	0,035
	0,036	0,037
	0,034	0,035
Nivel 3	0,185	0,185
	0,185	0,191
	0,188	0,180
	0,193	0,181
Nivel 4	0,529	0,577
	0,561	0,574
	0,562	0,538
	0,569	0,562

Tabla 36. ANOVA para la comparación de tratamientos, Metanol.

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Ho: No hay diferencia significativa entre los tratamientos Sistema y Método.						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00083733	7	0,00011962	0,0016449	1	2,6571966
Dentro de los grupos	1,16354	16	0,07272125			
Total	1,16437733	23				

En la tabla 36 se muestran los resultados obtenidos para el ANOVA de un factor, el valor de F exp es menor que el F de tabla, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, por consiguiente no existe diferencia estadísticamente significativa entre el sistema y el método.

8.4 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO.

Con la serie de datos obtenidos en la presente validación se encontró la incertidumbre del método basándose en el documento de calidad DG-M-I-13-V01, "Calculo de la Incertidumbre en análisis cuantitativo", en la tabla 37 se enlista un resumen del procedimiento efectuado en el anexo 12 para cada uno de los componentes de la incertidumbre, tomando como ejemplo una concentración de 100 mg%,

Tabla 37. Resumen de los componentes de la incertidumbre identificados en el análisis de alcoholemia.

CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE SEGÚN INSTRUCTIVO DG-M-I-13 V01					
FUENTE DE LA INCERTIDUMBRE		FUENTE DE INFORMACIÓN	TIPO DE INCERTIDUMBRE	INCERTIDUMBRE	
CURVA DE CALIBRACIÓN	Material Referencia	Certificados analíticos del material de referencia		Conc.(mg%)	μ
				25	0,00025339
				40	0,00025016
				100	0,00025016
				150	0,00025556
				300	0,00025016
	400	0,00025016			
Ajuste de la curva	Curvas de Calibración	A	$\mu_{\text{CURVA CALIBRACIÓN}} = 1,888\text{E-}09$		
Incertidumbre combinada debido al ajuste de la curva de calibración μ_{CCC}			$\mu_{\text{CCC}} = 0,03885336 \text{ mg\%}$		
CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR INTERNO MUESTRA	Balanza	Certificados calibración de la balanza	A	$\mu_{\text{balanza}} = 0,000212$	
	Pureza reactivo	Información del rótulo	B	$\mu_{\text{pureza reactivo}} = 0,00289$	
	Material Volumétrico	Información fabricante	B	$\mu_{\text{material vol.}} = 0,24496$	
	Incertidumbre combinada debida a la concentración del estándar interno μ_{CSI}			$\mu_{\text{CSI}} = 0,29185$	
FACTOR DE DILUCIÓN	Micropipeta	Información manual del fabricante	B	$\mu_{100 \mu\text{l}} =$	0,08948929
				$\mu_{200 \mu\text{l}} =$	0,3333334
	Incertidumbre combinada debida al factor de dilución μ_{CFD}			$\mu_{\text{CFD}} = 0,00094586$	
INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CONCENTRACIÓN μ_{CM}				0,348738697	

VARIABILIDAD DE ÁREAS	Factor de respuesta	Precisión intermedia de los estudios de transferencia del método	A	$\mu_{\delta} = 0,420$
INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CONCENTRACIÓN CORREGIDA POR LA VARIABILIDAD DE LAS ÁREAS				$\mu_c = 0,34876379$
U EXPANDIDA CON UN NIVEL DE CONFIANZA DEL 95,45%				$U = 0,6975 \text{ mg\%}$
ECUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE		$U_{\text{alcoholemia}} = 0,006894643 X + 0,011473$		

Donde X es la concentración a determinar la incertidumbre.

9. CONCLUSIONES.

- Se valido el método a las condiciones indicadas del Head Space y Cromatógrafo de Gases con detector de ionización de llama HS/GC/FID HP 6890 con la columna capilar HP Blood Alcohol Análisis 7.5 metros x 0.320 mm de diámetro interno.
- El método aplica todos los parámetros de validación por que cumple la rigidez estadística de las metodologías de validación de ensayos cuantitativos de acuerdo a las exigencias de la comunidad internacional en este tipo de estudios.
- Mediante un análisis de varianza de un solo factor se determino que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el sistema (Acuoso) y el método (Matriz sangre).
- Se realizaron corridas a muestras reales sobre el método creado, en ellas se examino la confiabilidad en la respuesta a partir de la utilización de los controles de estándares certificados, obteniéndose buena repetibilidad y buena precisión en las concentraciones arrojadas, de esta forma se concluye que tanto el sistema como el método presentan resultados repetibles y reproducibles.
- La incertidumbre del método sigue la ecuación: $U_{\text{alcoholemia}} = 0,00688454 X + 0,0146781$ siendo X la concentración a evaluar en mg%.

10. BIBLIOGRAFÍA

- BASELT R, CRAVEY R. Disposition of Toxic Drugs end Chemicals in Man. Chem. Toxicol. Inst., 1995, Davis California, USA.
- CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO. Código DG-M-I-13- V01. Bogotá. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2009.
- FLORES GARCÍA Inmaculada Servicio de Garantía de Calidad. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla
- GARCÍA R., MORENO E, SORIANO T, ROCA I, MENÉNDEZ M. Screening de drogas de abuso en sangre total mediante inmunoensayo enzimático CEDIA originalmente diseñado para el análisis de orina. Aplicación a casos forenses. Rev. Toxicol., 2002, 19(3): 105-108.
- MOFFAT AC. Clarke's Isolation and Identification of Drugs The Pharmaceutical Press, 2º Ed., 1986, London, UK. Baselt R, Cravey R. Disposition of Toxic Drugs end Chemicals in Man. Chem. Toxicol. Inst., 1995, Davis California, USA.
- NORDGREN HK, BECK O. Multicomponent screening for drugs of abuse: direct analysis of urine by LC-MS-MS. Ther. Drug Monit., 2004, 26(1), 90-97.
- PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE TRABAJO "Determinación de Alcoholemia y Metanol por Cromatografía de Gases con Automuestreador de Volátiles, e Identificación de Acetaldehído, Acetona y 2- Propanol. Código: DG-M-PET-02 Versión 05".
- REPETTO M, GIMÉNEZ MP. Sistemática Analítica Toxicológica General. Quím. Indus., 1983, 29(4), 255 - 258.
- REPETTO M. Toxicología del alcohol etílico. En Repetto M. (editor): Toxicología Avanzada. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 1995.
- REPETTO M, MARTÍNEZ D. Biosíntesis de un alcaloide harmínico en el catabolismo etanólico. Anales Real Soc. Española de Física y Química, 1976, 72: 1015-1017.
- SORIANO T, JURADO C, MENÉNDEZ M, REPETTO M. Improved method solid phase extraction method for systemic toxicological analysis in biological fluid J. Anal. Toxicol, 2001, 25(2), 137-143.

11. ANEXOS

Anexo 1. Idoneidad y Especificidad del sistema cromatográfico

Parámetros Evaluados:	Criterio de Aceptación
Tiempo de Retención (tr)	CV ≤ 5%
Factor de Capacidad (K')	Entre 1.5 y 10
Factor de Simetría (S)	≤ 2
Resolución	≥ 2
Platos Teóricos (N)	

METANOL					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	0,86030	2,56037	0,72604	9756,58429	N/A
2	0,85976	2,55816	0,72572	9744,45568	N/A
3	0,85961	2,55752	0,74791	9584,47661	N/A
4	0,85993	2,55888	0,73013	9748,39050	N/A
Promedio	0,85990	2,55873	0,73245	9708,47677	N/A
S	0,000	0,001	0,011	82,821	N/A
CV (%)	0,035	0,048	1,434	0,853	N/A
Cumple	SI	SI	SI	N/A	N/A

ACETALDEHÍDO					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	0,95927	2,96996	0,92282	11559,76095	2,80215
2	0,95892	2,96851	0,92471	11551,33857	2,80740
3	0,95856	2,96704	0,92386	11542,74125	2,79046
4	0,95897	2,96873	0,92416	11552,61236	2,80398
Promedio	0,95893	2,96856	0,92389	11551,61328	2,80100
S	0,000291	0,001	0,001	6,980	0,007
CV (%)	0,030	0,040	0,086	0,060	0,263
Cumple	SI	SI	SI	N/A	SI

ETANOL					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	1,71379	6,09260	0,54529	31209,55948	20,22591
2	1,71330	6,09055	0,54510	31651,87633	20,29917
3	1,71279	6,08847	0,54648	30723,07164	20,14151
4	1,71297	6,08921	0,53742	29857,77703	19,98396
Promedio	1,71321	6,09021	0,54357	30860,57112	20,16264
S	0,000	0,002	0,004	768,648	0,135
CV (%)	0,026	0,030	0,763	2,491	0,672
Cumple	SI	SI	SI	N/A	SI

ACETONA					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	2,20931	8,14330	0,76984	42134,3838	12,08777
2	2,20932	8,14338	0,80152	42695,0218	12,18465
3	2,20837	8,13942	0,74889	42658,0322	12,08922
4	2,20943	8,14383	0,80898	43853,1482	12,11083
Promedio	2,20911	8,14248	0,78231	42835,1465	12,11812
S	0,000	0,001	0,009	486,1348	0,030
CV (%)	0,022	0,017	1,173	1,1349	0,249
Cumple	SI	SI	SI	N/A	SI

ISOPROPANOL					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	2,58384	9,69334	0,54490	30776,3672	7,33466
2	2,58323	9,69079	0,53864	34643,7517	7,59656
3	2,58283	9,68916	0,54181	34633,1690	7,60800
4	2,58389	9,69355	0,55864	31996,3679	7,47861
Promedio	2,58345	9,69171	0,54600	33012,4139	7,50446
S	0,001	0,002	0,009	1942,5382	0,127
CV (%)	0,020	0,022	1,613	5,8843	1,698
Cumple	SI	SI	SI	N/A	SI

N-PROPANOL					
Muestra	Tr	K'	S	N	R
1	3,08051	11,74881	0,57972	53547,7359	8,84216
2	3,07976	11,74570	0,58066	49241,6672	8,92994
3	3,07917	11,74328	0,58775	55852,6973	9,20840
4	3,08030	11,74796	0,57449	51332,9475	8,83759
Promedio	3,07994	11,74644	0,58066	52493,7620	8,95452
S	0,001	0,002	0,005	2847,0405	0,175
CV (%)	0,019	0,021	0,939	5,4236	1,949
Cumple	SI	NO	SI	N/A	SI

Anexo 2. Repetibilidad del Etanol en sistema y método.

CORRIDA DE LOS NIVELES CONTRA LA CURVA DE ESTÁNDARES COMO MUESTRAS PARA VERIFICAR CONCENTRACIONES
ETANOL – SISTEMA

nivel 1				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n – propanol	ÁREA RELACIÓN
15,0 mg	13,74	13,95	97,38	0,14110442
	13,32	13,93	94,53	0,14090898
	13,93	13,49	102,45	0,13600296
	14,39	13,54	105,40	0,13652597
promedio	13,85	13,73	99,94	0,14
des	0,444	0,245	4,896	0,003
Coef. var.	3,205	1,788	4,899	1,982

nivel 2				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
40,0 mg	51,10	40,47	116,68	0,4379821
	50,79	39,16	119,99	0,42328552
	53,35	39,43	125,14	0,42631124
	51,15	39,44	119,95	0,42640044
promedio	51,60	39,63	120,44	0,43
des	1,178	0,580	3,497	0,006
Coef. var.	2,284	1,463	2,904	1,514

nivel 3				
concentración	Relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
100 mg	136,99	99,97	124,04	1,10439337
	139,99	99,78	126,89	1,1031672
	127,28	99,09	116,30	1,09447807
	129,12	99,58	117,38	1,09999735
promedio	133,34	99,60	121,15	1,10
Des	6,108	0,381	5,134	0,004
Coef. var.	4,581	0,383	4,238	0,402

nivel 4				
concentración	Relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
200 mg	245,37	201,86	109,31	2,2446737
	258,62	206,13	112,49	2,29911806
	264,73	196,50	121,17	2,18465865
	247,14	208,88	106,38	2,32323116
promedio	253,96	203,34	112,34	2,26
Des	9,272	5,399	6,397	0,062
Coef. var.	3,651	2,655	5,695	2,725

nivel 5				
concentración etanol	Relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
300 mg	415,18	313,51	118,82	3,49413606
	434,35	305,67	127,51	3,40635929
	425,47	303,13	125,96	3,37789631
	433,69	292,82	132,93	3,2625141
promedio	427,17	303,78	126,31	3,39
Des	8,958	8,543	5,817	0,096
Coef. var.	2,097	2,812	4,605	2,824

nivel 6				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
400 mg	537,63	415,04	116,11	4,6303784
	521,37	382,39	122,25	4,26490149
	527,28	396,48	119,22	4,42262822
	526,81	383,19	123,26	4,27394815
promedio	528,27	394,28	120,21	4,40
Des	6,790	15,279	3,228	0,171
Coef. Var.	1,285	3,875	2,685	3,888

CORRIDA DE LOS NIVELES CONTRA LA CURVA DE ESTÁNDARES COMO MUESTRAS PARA VERIFICAR CONCENTRACIONES

nivel 1				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n-propanol	ÁREA RELACIÓN
15,0 mg	16,75	15,89	131,59	0,12730915
	16,48	15,72	131,43	0,12542353
	16,13	16,32	122,19	0,13201898
	16,67	15,92	130,67	0,12759614
promedio	16,51	15,96	128,97	0,13
Des	0,276	0,256	4,536	0,003
Coef. var.	1,674	1,601	3,517	2,180

nivel 2				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n-propanol	ÁREA RELACIÓN
40,0 mg	50,93	41,76	124,21	0,41002907
	48,38	41,31	119,43	0,40507207
	48,66	41,74	118,75	0,40975063
	50,09	41,39	123,37	0,40597967
promedio	49,51	41,55	121,44	0,41
Des	1,204	0,233	2,749	0,003
coef. var.	2,432	0,561	2,264	0,625

nivel 3				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n-propanol	ÁREA RELACIÓN
100 mg	137,28	96,55	136,08	1,00881889
	138,79	98,00	135,46	1,02460255
	144,34	95,32	145,01	0,99537559
	142,11	96,41	141,09	1,00724546
promedio	140,63	96,57	139,41	1,01
Des	3,192	1,098	4,505	0,012
coef.var.	2,270	1,137	3,231	1,190

nivel 4				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
200 mg	303,80	210,74	134,62	2,25674603
	308,07	208,55	137,98	2,23281566
	319,98	202,09	147,99	2,16213816
	297,35	205,01	135,52	2,19413973
promedio	307,30	206,60	139,03	2,21
Des	9,533	3,824	6,144	0,042
coef. var.	3,102	1,851	4,419	1,890

nivel 5				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
300 mg	433,71	311,37	129,22	3,35645422
	452,93	285,85	147,17	3,07757844
	411,87	291,74	131,09	3,14191792
	389,12	302,95	119,20	3,26442145
promedio	421,91	297,98	131,67	3,21
Des	27,554	11,402	11,578	0,125
coef. var.	6,531	3,826	8,793	3,882

nivel 6				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
400 mg	589,05	405,28	134,40	4,38274413
	594,34	408,29	134,60	4,41561599
	595,43	394,66	139,55	4,26666577
	580,48	413,28	129,86	4,47018532
promedio	589,83	405,37	134,60	4,38
Des	6,826	7,871	3,962	0,086
coef. var.	1,157	1,942	2,943	1,962

Anexo 3. Repetibilidad del Metanol en sistema y método.

CORRIDA DE LOS NIVELES CONTRA LA CURVA DE ESTÁNDARES COMO MUESTRAS PARA VERIFICAR CONCENTRACIONES DE ANALITOS
METANOL – SISTEMA

nivel 1				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
10,0 mg	5,31	11,11	147,42	0,03603608
	5,28	10,97	148,63	0,03550573
	5,25	11,14	145,35	0,03614653
	5,38	10,60	157,48	0,03417426
promedio	5,31	10,96	149,72	0,04
Des	0,056	0,247	5,346	0,001
coef. var.	1,050	2,253	3,571	2,552

nivel 3				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
50,0 mg	25,01	51,73	135,17	0,18501742
	24,55	51,86	132,33	0,18549531
	25,68	52,51	136,69	0,18787958
	25,06	53,89	129,84	0,19296996
promedio	25,07	52,50	133,51	0,19
Des	0,467	0,993	3,043	0,004
coef. var.	1,861	1,891	2,280	1,939

Nivel 4				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
150 mg	80,55	145,62	152,15	0,52940834
	75,62	154,22	134,80	0,56097193
	74,08	154,57	131,76	0,56226543
	74,61	156,49	131,06	0,56928804
promedio	76,22	152,73	137,44	0,56
Des	2,958	4,843	9,937	0,018
coef. var.	3,881	3,171	7,230	3,198

CORRIDA DE LOS NIVELES CONTRA LA CURVA DE ESTÁNDARES COMO MUESTRAS PARA VERIFICAR CONCENTRACIONES DE ANALITOS
METANOL – MÉTODO

Nivel 1				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
10,0 mg	4,56	10,74	131,59	0,03468325
	4,63	10,90	131,43	0,03525032
	4,51	11,34	122,19	0,03687075
	4,62	10,92	130,67	0,03534836
promedio	4,58	10,97	128,97	0,04
Des	0,058	0,255	4,536	0,001
coef. var.	1,270	2,324	3,517	2,632

Nivel 3				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
50,0 mg	25,11	51,59	136,08	0,18453183
	25,82	53,25	135,46	0,19062213
	26,11	50,37	145,01	0,18002592
	25,60	50,75	141,09	0,18144483
Promedio	25,66	51,49	139,41	0,18
Des	0,420	1,282	4,505	0,005
coef.var.	1,637	2,490	3,231	2,554

nivel 4				
concentración	relación áreas etanol	concentración	áreas n- propanol	ÁREA RELACIÓN
150 mg	77,71	158,66	134,62	0,5772385
	79,18	157,74	137,98	0,57386517
	79,67	148,04	147,99	0,53831285
	76,13	154,43	135,52	0,56172863
promedio	78,17	154,72	139,03	0,56
Des	1,597	4,804	6,144	0,018
coef.var.	2,043	3,105	4,419	3,131

Anexo 4. Precisión intermedia de Etanol

DIA 1								
	analista 1				analista 2			
15	0,135	0,138	0,129	0,132	0,126	0,127	0,124	0,126
100	1,025	1,059	1,042	1,005	1,039	1,011	1,024	1,064
400	4,538	4,374	4,504	4,509	4,42	4,468	4,449	4,453

DIA 2								
	analista 1				analista 2			
15	0,117	0,111	0,121	0,115	0,126	0,122	0,123	0,122
100	1,038	1,041	1,033	1,046	1,033	1,025	1,038	1,018
400	4,517	4,453	4,35	4,46	4,264	4,431	4,424	4,262

DIA 3								
	analista 1				analista 2			
15	0,128	0,125	0,12	0,121	0,125	0,125	0,126	0,128
100	1,058	1,049	1,062	1,045	1,039	1,041	1,03	1,016
400	4,245	4,341	4,465	4,504	4,428	4,296	4,379	4,363

Anexo 5. Precisión intermedia de Metanol

DIA 1								
	analista 1				analista 2			
10	0,037	0,040	0,040	0,039	0,038	0,037	0,037	0,038
50	0,200	0,206	0,204	0,191	0,202	0,187	0,195	0,200
150	0,571	0,561	0,584	0,595	0,564	0,576	0,562	0,560

DIA 2								
	analista 1				analista 2			
10	0,040	0,033	0,038	0,034	0,038	0,039	0,037	0,040
50	0,191	0,206	0,212	0,210	0,191	0,193	0,195	0,194
150	0,531	0,536	0,546	0,588	0,592	0,580	0,542	0,577

DIA 3								
	analista 1				analista 2			
10	0,038	0,040	0,035	0,038	0,037	0,036	0,038	0,038
50	0,196	0,204	0,197	0,191	0,210	0,202	0,202	0,189
150	0,569	0,573	0,570	0,578	0,553	0,554	0,570	0,552

Anexo 6. Linealidad de Etanol y análisis de t de Student en el Sistema.

ETANOL - SISTEMA

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	ÁREA	mg %						
1	15,268	13,525	16,294	13,635	15,249	13,803	16,345	13,466
2	48,729	40,402	49,834	39,712	47,715	40,008	49,546	39,556
3	102,492	103,289	109,332	103,860	104,179	106,305	100,025	103,837
4	319,825	188,305	332,901	193,873	349,259	189,724	355,930	191,055
5	519,433	288,737	474,141	289,922	526,072	287,086	497,842	291,083
6	519,011	387,759	502,555	392,651	531,253	392,105	524,711	394,028

NIVEL	ÁREAS			CONCENTRACIÓN		
	PROM	SD	CV %	PROM	SD	CV %
1	15,789	0,613	3,884	13,607	0,148	1,087
2	48,956	0,951	1,942	39,920	0,372	0,933
3	104,007	3,938	3,787	104,323	1,348	1,292
4	339,479	16,288	4,798	190,739	2,372	1,243
5	504,372	23,482	4,656	289,207	1,708	0,591
6	519,383	12,283	2,365	391,636	2,708	0,692

PROPANOL – SISTEMA							
NIVEL	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 4	PROM	SD	CV %
	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA			
1	115,074	117,967	108,976	120,118	115,534	4,836	4,186
2	111,333	115,866	110,056	115,594	113,212	2,956	2,611
3	89,898	95,331	88,694	87,181	90,276	3,549	3,931
4	152,664	154,268	165,336	167,252	159,880	7,476	4,676
5	161,470	146,777	164,456	153,481	156,546	7,992	5,105
6	120,006	114,771	121,519	119,460	118,939	2,912	2,448

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	Relación mg %	Relación áreas						
1	0,135	0,133	0,136	0,138	0,138	0,140	0,135	0,136
2	0,404	0,438	0,397	0,430	0,400	0,434	0,396	0,429
3	1,033	1,140	1,039	1,147	1,063	1,175	1,038	1,147
4	1,883	2,095	1,939	2,158	1,897	2,112	1,911	2,128
5	2,887	3,217	2,899	3,230	2,871	3,199	2,911	3,244
6	3,878	4,325	3,927	4,379	3,921	4,372	3,940	4,392

NIVEL	X - Relación concentraciones	Y - Relación de áreas	(X)2	(Y)2	X * Y
1	0,136	0,137	0,018	0,019	0,019
2	0,399	0,432	0,159	0,187	0,172
3	1,043	1,152	1,088	1,327	1,202
4	1,907	2,123	3,637	4,507	4,049
5	2,892	3,222	8,364	10,381	9,318
6	3,916	4,367	15,335	19,071	17,101

Σ	10,293	11,433	28,601	35,492	31,860
---	--------	--------	--------	--------	--------

$$S_{x/y} = \left\{ \frac{(\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy)}{(n-2)} \right\}^{1/2} = 0,23384$$

$$S_b = \frac{S_{xy}}{(\sum x^2 - ((\sum y)^2/n))^{1/2}} = 0,0486$$

$$S_a = (S(b)^2 * (\sum x^2/n))^{1/2} = 0,05305$$

$$Tr = \frac{r(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}} = 137,926 \quad t = t \text{ de tabla } = 2,07$$

$$Ta = \frac{a}{S(a)} = 0,87421 \quad LCa = a \pm tSa = -0,046 \pm 0,1098$$

$$Tb = \frac{b}{S(b)} = 22,4886 \quad LCb = b \pm tSb = 1,093 \pm 0,1006$$

Anexo 7. Linealidad de Etanol y análisis de t de Student en el Método.

ETANOL – MÉTODO

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	ÁREA	mg %						
1	16,752	15,893	16,484	15,720	16,132	16,324	16,673	15,919
2	50,928	41,763	48,379	41,309	48,657	41,737	50,088	41,392
3	137,278	96,554	138,791	97,998	144,338	95,323	142,112	96,410
4	303,802	210,743	308,074	208,553	319,984	202,086	297,354	205,014
5	433,711	311,369	452,934	285,851	411,874	291,738	389,119	302,948
6	589,051	405,278	594,343	408,286	595,430	394,656	580,479	413,279

NIVEL	ÁREAS			CONCENTRACIÓN		
	PROM	SD	CV %	PROM	SD	CV %
1	16,510	0,276	1,674	15,964	0,256	1,601
2	49,513	1,204	2,432	41,550	0,233	0,561
3	140,630	3,192	2,270	96,571	1,098	1,137
4	307,304	9,533	3,102	206,599	3,824	1,851
5	421,909	27,554	6,531	297,977	11,402	3,826
6	589,826	6,826	1,157	405,375	7,871	1,942

PROPANOL – SISTEMA							
NIVEL	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 4	PROM	SD	CV %
	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA			
1	131,588	131,427	122,193	130,672	128,970	4,536	3,517
2	124,206	119,432	118,748	123,375	121,440	2,749	2,264
3	136,078	135,459	145,009	141,090	139,409	4,505	3,231
4	134,619	137,976	147,994	135,522	139,028	6,144	4,419
5	129,217	147,172	131,090	119,200	131,670	11,578	8,793
6	134,402	134,600	139,554	129,856	134,603	3,962	2,943

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	Relación mg %	Relación áreas						
1	0,159	0,127	0,157	0,125	0,163	0,132	0,159	0,128
2	0,418	0,410	0,413	0,405	0,417	0,410	0,414	0,406
3	0,966	1,009	0,980	1,025	0,953	0,995	0,964	1,007
4	2,107	2,257	2,086	2,233	2,021	2,162	2,050	2,194
5	3,114	3,356	2,859	3,078	2,917	3,142	3,029	3,264
6	4,053	4,383	4,083	4,416	3,947	4,267	4,133	4,470

NIVEL	X - Relación concentraciones	Y - Relación de áreas	(X)2	(Y)2	X * Y
1	0,160	0,128	0,026	0,016	0,020
2	0,416	0,408	0,173	0,166	0,170
3	0,966	1,009	0,933	1,018	0,975
4	2,066	2,210	4,268	4,884	4,566
5	2,980	3,204	8,880	10,266	9,548
6	4,054	4,382	16,435	19,202	17,765
Σ	10,642	11,341	30,715	35,553	33,043

$$S_{x/y} = \left\{ \frac{(\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy)}{(n-2)} \right\}^{1/2} = 0,2361$$

$$S_b = \frac{S_{xy}}{(\sum x^2 - ((\sum y)^2/n))^{1/2}} = 0,04619$$

$$S_a = (S(b)^2 * (\sum x^2/n))^{1/2} = 0,05226$$

$$Tr = \frac{r(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}} = 219,292$$

$$t = t \text{ de tabla } = 2,07$$

$$Ta = \frac{a}{S(a)} = 0,86434$$

$$LCa = a \pm tSa = 0,045 \pm 0,1082$$

$$Tb = \frac{B}{S(b)} = 23,7359$$

$$LCb = b \pm tSb = 1,096 \pm 0,0956$$

Anexo 8. Análisis de varianza ANOVA para el Etanol en sistema y método.

ETANOL – SISTEMA							
		X concentración mg%	Y Relación de áreas	X ^ 2	Y ^ 2	X*Y	
15	1	13,525	0,133	182,930	0,0176	1,7945	$\sum y^2$ 0,0748
	2	13,635	0,138	185,910	0,0191	1,8833	$\sum y$ 0,547
	3	13,803	0,140	190,514	0,0196	1,9314	$(\sum y)^2$ 0,299
	4	13,466	0,136	181,329	0,0185	1,8324	
40	5	40,402	0,438	1632,326	0,1916	17,6833	$\sum y^2$ 0,7482
	6	39,712	0,430	1577,064	0,1850	17,0804	$\sum y$ 1,730
	7	40,008	0,434	1600,666	0,1880	17,3457	$(\sum y)^2$ 2,992782
	8	39,556	0,429	1564,641	0,1837	16,9545	
100	9	103,289	1,140	10668,572	1,2998	117,7591	$\sum y^2$ 5,3111
	10	103,860	1,147	10786,974	1,3153	119,1139	$\sum y$ 4,609
	11	106,305	1,175	11300,768	1,3797	124,8645	$(\sum y)^2$ 21,24175
	12	103,837	1,147	10782,185	1,3164	119,1356	
200	13	188,305	2,095	35458,886	4,3888	394,4907	$\sum y^2$ 18,0367
	14	193,873	2,158	37586,713	4,6567	418,3653	$\sum y$ 8,493
	15	189,724	2,112	35995,170	4,4623	400,7780	$(\sum y)^2$ 72,13821
	16	191,055	2,128	36501,887	4,5288	406,5845	
300	17	288,737	3,217	83368,859	10,3485	928,8396	$\sum y^2$ 41,5377
	18	289,922	3,230	84054,639	10,4351	936,5466	$\sum y$ 12,890
	19	287,086	3,199	82418,308	10,2327	918,3464	$(\sum y)^2$ 166,1463
	20	291,083	3,244	84729,196	10,5214	944,1760	
400	21	387,759	4,325	150357,306	18,7045	1677,0082	$\sum y^2$ 76,2833
	22	392,651	4,379	154174,847	19,1735	1719,3236	$\sum y$ 17,468
	23	392,105	4,372	153746,504	19,1124	1714,1954	$(\sum y)^2$ 305,1229
	24	394,028	4,392	155258,404	19,2929	1730,7176	
Σ		4117,726	45,737	1144304,597	141,992	12746,751	
Σ^2		16955669	2091,83808				

m=4 k=6 n=24

$S_{xy} = \sum xy - [(\sum x \sum y) / n]$ 4899,631186

$S_{xx} = \sum x^2 - (\sum x)^2 / n$ 437818,3686

$S_{yy} = \sum y^2 - (\sum y)^2 / n$ 54,83191701

$(S_{yy})_k = \sum / k (\sum y^2 - (\sum y)^2 / m)$ 0,006601565

$S_{crg} = S^2_{xy} / S_{xx}$ 54,83183777

Sct = Syy 54,83191701
 Scr = Sct – Scrg 7,92436E-05
 CMrg = Scrg/gl (1) 54,83183777
 CMr = Scr / gl (22) 3,60198E-06
 F regresión 15222687,86

ETANOL – MÉTODO								
		X concentración mg%	Y Relación de áreas	X ^ 2	Y ^ 2	X*Y		
15	1	15,8928	0,1273	252,5814	0,0162	2,0233	Σy ²	0,0656
	2	15,7203	0,1254	247,1269	0,0157	1,9717	Σy	0,512
	3	16,3238	0,1320	266,4658	0,0174	2,1550	(Σy) ²	0,2625
	4	15,9191	0,1276	253,4168	0,0163	2,0312		
40	5	41,7625	0,4100	1744,1081	0,1681	17,1238	Σy ²	0,6649
	6	41,3090	0,4051	1706,4294	0,1641	16,7331	Σy	1,631
	7	41,7371	0,4098	1741,9813	0,1679	17,1018	(Σy) ²	2,659611
	8	41,3920	0,4060	1713,2977	0,1648	16,8043		
100	9	96,5536	1,0088	9322,5919	1,0177	97,4051	Σy ²	4,0728
	10	97,9978	1,0246	9603,5727	1,0498	100,4088	Σy	4,036
	11	95,3235	0,9954	9086,5639	0,9908	94,8827	(Σy) ²	16,28964
	12	96,4096	1,0072	9294,8110	1,0145	97,1081		
200	13	210,7426	2,2567	44412,4519	5,0929	475,5926	Σy ²	19,5675
	14	208,5529	2,2328	43494,3204	4,9855	465,6602	Σy	8,846
	15	202,0857	2,1621	40838,6342	4,6748	436,9372	(Σy) ²	78,24888
	16	205,0140	2,1941	42030,7238	4,8142	449,8293		
300	17	311,3692	3,3565	96950,7663	11,2658	1045,0964	Σy ²	41,2654
	18	285,8512	3,0776	81710,9200	9,4715	879,7296	Σy	12,840
	19	291,7385	3,1419	85111,3407	9,8716	916,6184	(Σy) ²	164,8752
	20	302,9479	3,2644	91777,4422	10,6564	988,9497		
400	21	405,2778	4,3827	164250,0546	19,2084	1776,2287	Σy ²	76,8931
	22	408,2856	4,4156	166697,1475	19,4977	1802,8325	Σy	17,535
	23	394,6563	4,2667	155753,5636	18,2044	1683,8664	(Σy) ²	307,4836
	24	413,2789	4,4702	170799,4327	19,9826	1847,4332		
Σ	4256,141	45,401	1229059,745	142,529	13234,523			
Σ^ 2	18114740	2061,21853						

m=4 k=6 n=24

$S_{xy} = \sum xy - [(\sum x \sum y)/n]$	5183,207809
$S_{xx} = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$	474278,9167
$S_{yy} = \sum y^2 - (\sum y)^2/n$	56,64524027
$(S_{yy})_k = \sum/k (\sum y^2 - (\sum y)^2/m)$	0,074491956
$Scrg = S^2_{xy}/S_{xx}$	56,64524027
$Sct = S_{yy}$	56,64524027
$Scr = Sct - Scrg$	6,39488E-14
$CMrg = Scrg/gl (1)$	56,64524027
$CMr = Scr/gl (22)$	2,90677E-15
$CMrg = Scrg/gl$	56,64524027
F regresión	1,0773E+16

Anexo 9. Linealidad de Metanol y análisis de t de Student en el Sistema.

METANOL – SISTEMA

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	ÁREA	mg %						
1	5,313	11,111	5,277	10,966	5,254	11,141	5,382	10,603
3	25,010	51,727	24,546	51,857	25,682	52,507	25,055	53,895
4	80,547	145,617	75,622	154,222	74,085	154,574	74,608	156,489

NIVEL	ÁREAS			CONCENTRACIÓN		
	PROM	SD	CV %	PROM	SD	CV %
1	5,306	0,056	1,050	10,955	0,247	2,253
3	25,073	0,467	1,861	52,496	0,993	1,891
4	76,215	2,958	3,881	152,725	4,843	3,171

PROPANOL - SISTEMA							
NIVEL	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 4	PROM	SD	CV %
	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA			
1	147,423	148,630	145,350	157,478	149,720	5,346	3,571
3	135,174	132,325	136,694	129,839	133,508	3,043	2,280
4	152,146	134,805	131,761	131,055	137,442	9,937	7,230

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	Relación mg %	Relación áreas						
1	0,111	0,036	0,110	0,036	0,111	0,036	0,106	0,034
3	0,517	0,185	0,519	0,185	0,525	0,188	0,539	0,193
4	1,456	0,529	1,542	0,561	1,546	0,562	1,565	0,569

NIVEL	X - Relación concentraciones	Y - Relación de áreas	(X)2	(Y)2	X * Y
1	0,160	0,128	0,026	0,016	0,020
3	0,966	1,009	0,933	1,018	0,975
4	2,066	2,210	4,268	4,884	4,566
Σ	10,642	11,341	30,715	35,553	33,043

$$S_{x/y} = \left\{ \frac{(\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy)}{(n-2)} \right\}^{1/2} = 0,236711$$

$$S_b = \frac{S_{xy}}{(\sum x^2 - ((\sum y)^2/n))^{1/2}} = 0,158516$$

$$S_a = (S(b)^2 * (\sum x^2/n))^{1/2} = 0,074061$$

$$Tr = \frac{r(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}} = 43,7573$$

t = t de tabla 2,2

$$Ta = \frac{a}{S(a)} = 0,06144$$

$$LCa = a \pm tSa = -0,005 \pm 0,1629$$

$$Tb = \frac{b}{S(b)} = 2,30955$$

$$LCb = b \pm tSb = 0,366 \pm 0,3487$$

Anexo 10. Linealidad de Metanol y análisis de t de Student en el Método.

METANOL – MÉTODO

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	ÁREA	mg %						
1	4,564	10,742	4,633	10,896	4,505	11,338	4,619	10,923
3	25,111	51,594	25,821	53,255	26,105	50,366	25,600	50,753
4	77,708	158,656	79,179	157,737	79,667	148,044	76,127	154,428

NIVEL	ÁREAS			CONCENTRACIÓN		
	PROM	SD	CV %	PROM	SD	CV %
1	4,580	0,058	1,270	10,975	0,255	2,324
3	25,659	0,420	1,637	51,492	1,282	2,490
4	78,170	1,597	2,043	154,716	4,804	3,105

PROPANOL – SISTEMA							
NIVEL	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 4	PROM	SD	CV %
	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA			
1	131,588	131,427	122,193	130,672	128,970	4,536	3,517
3	136,078	135,459	145,009	141,090	139,409	4,505	3,231
4	134,619	137,976	147,994	135,522	139,028	6,144	4,419

NIVEL	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3		CURVA 4	
	Relación mg %	Relación áreas						
1	0,107	0,035	0,109	0,035	0,113	0,037	0,109	0,035
3	0,516	0,185	0,533	0,191	0,504	0,180	0,508	0,181
4	1,587	0,577	1,577	0,574	1,480	0,538	1,544	0,562

NIVEL	X - Relación concentraciones	Y - Relación de áreas	(X)2	(Y)2	X * Y
1	0,110	0,128	0,012	0,016	0,014
3	0,525	0,408	0,276	0,166	0,214
4	1,527	1,009	2,332	1,018	1,541
Σ	2,162	1,545	2,619	1,201	1,769

$$S_{x/y} = \left\{ \frac{(\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy)}{(n-2)} \right\}^{1/2} = 0,232135$$

$$S_b = \frac{S_{xy}}{(\sum x^2 - ((\sum y)^2/n))^{1/2}} = 0,155451$$

$$S_a = (S(b)^2 * (\sum x^2/n))^{1/2} = 0,072629$$

$$Tr = \frac{r(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}} = 547,712$$

t = t de tabla 2,2

$$Ta = \frac{a}{S(a)} = -0,0275$$

$$LCa = a \pm tSa = -0,002 \pm 0,1598$$

$$Tb = \frac{b}{S(b)} = 2,41876$$

$$LCb = b \pm tSb = 0,366 \pm 0,3420$$

Anexo 11. Análisis de varianza ANOVA para el Metanol en sistema y método.

METANOL - SISTEMA

		X Concentración mg%.	Y Relación de Áreas	X ^ 2	Y ^ 2	X*Y		
10	1	11,11	0,0360	123,4321	0,0013	0,4004	Σy^2	0,0050
	2	10,97	0,0355	120,3409	0,0013	0,3895	Σy	0,142
	3	11,14	0,0361	124,0996	0,0013	0,4027	$(\Sigma y)^2$	0,020125
	4	10,60	0,0342	112,3600	0,0012	0,3622		
50	5	51,79	0,1850	2682,2041	0,0342	9,5821	Σy^2	0,1412
	6	51,86	0,1855	2689,4596	0,0344	9,6198	Σy	0,751
	7	52,51	0,1879	2757,3001	0,0353	9,8656	$(\Sigma y)^2$	0,56454525
	8	53,89	0,1930	2904,1321	0,0372	10,3992		
150	9	145,62	0,5294	21205,1844	0,2803	77,0924	Σy^2	1,2352
	10	154,22	0,5610	23783,8084	0,3147	86,5131	Σy	2,222
	11	154,57	0,5623	23891,8849	0,3161	86,9094	$(\Sigma y)^2$	4,93698954
	12	156,49	0,5693	24489,1201	0,3241	89,0879		

Σ	864,77	3,12	104883,33	1,38	380,62
Σ^2	747827,1529	9,704213061			

m=4 K=3 n=12

$$S_{xy} = \Sigma xy - [(\Sigma x \Sigma y) / n] \quad 156,1328027$$

$$S_{xx} = \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n \quad 42564,39689$$

$$S_{yy} = \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / n \quad 0,572719362$$

$$(S_{yy})_k = \Sigma / k (\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / m) \quad 0,000988838$$

$$S_{crg} = S^2_{xy} / S_{xx} \quad 0,572719312$$

$$S_{ct} = S_{yy} \quad 0,572719362$$

$$S_{cr} = S_{ct} - S_{crg} \quad 5,01273E-08$$

$$C_{Mrg} = S_{crg} / gl \quad (1) \quad 0,572719312$$

$$C_{Mr} = S_{cr} / gl \quad 5,01273E-09$$

$$F \text{ regresión} \quad 114252924,2$$

METANOL - MÉTODO

		X Concentración en mg%	Y Relación de áreas	X ^ 2	Y ^ 2	X*Y		
10	1	10,74	0,0347	115,3476	0,0012	0,3725	Σy^2	0,0051
	2	10,90	0,0353	118,8100	0,0012	0,3842	Σy	0,142
	3	11,34	0,0369	128,5956	0,0014	0,4181	$(\Sigma y)^2$	0,02020738
	4	10,92	0,0353	119,2464	0,0012	0,3860		
50	5	51,59	0,1845	2661,5281	0,0341	9,5200	Σy^2	0,1357
	6	53,25	0,1906	2835,5625	0,0363	10,1506	Σy	0,737
	7	50,37	0,1800	2537,1369	0,0324	9,0679	$(\Sigma y)^2$	0,54261579
	8	50,75	0,1814	2575,5625	0,0329	9,2083		
150	9	158,66	0,5772	25172,9956	0,3332	91,5847	Σy^2	1,2678
	10	157,74	0,5739	24881,9076	0,3293	90,5215	Σy	2,251
	11	148,04	0,5383	21915,8416	0,2898	79,6918	$(\Sigma y)^2$	5,06765452
	12	154,43	0,5617	23848,6249	0,3155	86,7478		
Σ		857,99	3,10	106795,81	1,41	387,68		
Σ^2		736146,8401	9,580505558					

m=4 K=3 n=12

$S_{xy} = \Sigma xy - [(\Sigma x \Sigma y) / n]$	166,3739153
$S_{xx} = \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n]$	45450,24169
$S_{yy} = \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / n]$	0,609041693
$(S_{yy})_k = \Sigma / k (\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / m)$	0,00100066
$Scrg = S^2_{xy} / S_{xx}$	0,609023817
$Sct = S_{yy}$	0,609041693
$Scr = Sct - Scrg$	1,78756E-05
$CMrg = Scrg / gl (1)$	0,609023817
$CMr = Scr / gl$	1,78756E-06
F regresión	3301612434

Anexo 12. Cálculo de la incertidumbre

CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE TENIENDO EN CUENTA EL MENOR VALOR DE ALCOHOLEMIA OBTENIDO DE DOS DETERMINACIONES QUE CUMPLEN CON COEFICIENTE DE VARIACIÓN MENOR DE 10% PARA VALORES DE ALCOHOLEMIA MENORES O IGUALES A 40 MG% Y CV DE 5% PARA VALORES DE ALCOHOLEMIA MAYORES O IGUALES A 41 MG%.

1. INCERTIDUMBRE DEBIDA A LA CURVA DE CALIBRACIÓN

1.1 DEBIDA A LA PUREZA DEL MATERIAL DE REFERENCIA

De acuerdo a los límites de los estándares

El nivel de confianza de los límites es del 95%

valor nominal del estándar	Límites	u estándar = limite /1.96	(u estándares/ concentración del estándar)	(u estándares/ concentración del estándar) ²
25	0,78	0,39795918	0,015918367	0,000253394
40	1,24	0,63265306	0,015816327	0,000250156
100	3,1	1,58163265	0,015816327	0,000250156
150	4,7	2,39795918	0,015986395	0,000255565
300	9,3	4,74489796	0,015816327	0,000250156
400	12,4	6,32653061	0,015816327	0,000250156
Suma				0,001509584

1.2 POR AJUSTE DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se determina a partir del análisis estadístico y regresión de la curva de calibración con 6 niveles de 15 a 400 mg% y una concentración de estándar interno aproximada de 100 mg%

Donde :

Concentración para la cual se determina la incertidumbre, el resultado mas bajo de dos determinaciones que cumplen con el CV	X	100	mg%
Promedio entre el punto mas alto y el mas bajo de la curva	X barra	(400-15)/2	192,5 mg%
Diferencia entre la concentración a la cual se le determina la incertidumbre y el promedio entre el punto más alto y más bajo de la curva	X-X barra	-92,5	mg%
Pendiente del análisis estadístico(b)	m	1,096	mg%/pA

desviación estándar residual o error típico (sale de la regresión)		Se	7,2513E-08	mg%
Variabilidad de x sale del análisis estadístico de la curva de calibración		Sxx	437818,37	
Número de puntos de la curva o niveles de concentración		q	6	
Numero de determinaciones por cada punto	p	(numero de curvas de calibración con las cuales hace el análisis)	4	
n = p*q Número total de determinaciones		n	24	
(Se / m)			6,6161E-08	
1/p			0,25	
1/q			0,1666667	
[1/q + 1/p]			0,4166667	
(X barra - X)^2			8556,25	
n * Sxx			10507640,9	
1/q + 1/p + (X - X)^2 / n * Sxx]			0,00081433	
$\sqrt{1/q + 1/p + (X - X)^2 / n * Sxx]}$			0,02853643	
U _{curva de calibración} = (Se / m) $\sqrt{1/p + 1/q + (X barra - X)^2 / n * Sxx]}$			1,888E-09	mg%
(u curva de calibración /la concentración a la cual se le determina la incertidumbre) ²			3,56455E-22	

1.2 INCERTIDUMBRE COMBINADA DEBIDA A LA CURVA
Resulta de combinar las incertidumbres debidas a la curva de calibración
$U_{\text{combinada de la curva}} = \sqrt{[(u_{\text{estándares}}/\text{concentración del estándar})^2 + (u_{\text{ajuste de la curva}}/\text{la concentración a la cual se le determina la incertidumbre})^2]}$

		0,00150958
U _{combinada de la curva}	μ_{ccc}	0,03885337

2. INCERTIDUMBRE DEBIDA AL ESTÁNDAR INTERNO

$C_{SI} = (\text{masa del n-propanol} \times \text{pureza del n-propanol}) / \text{volumen de aforo}$				
Masa	2,0202	g	2020,20	mg
Pureza del reactivo	99,50%		0,995	
Volumen de aforo	2	L	2000	ml
$C_{sim} = (\text{masa (g)} \times 99.5\%) / 2 \text{ litros} = 99.5\text{g/l} / 100 = 100.50 \text{ mg\%}$	100,50495	mg%	1,0050495	mg/mL
m de la balanza, (distribución rectangular) dado por la ecuación ($\mu = m_o + b m_w = 2.08 \times 10^{-4} + 1,88 \times 10^{-6} \times m$, donde m es la masa en gramos. Para 2 g la incertidumbre es...			0,000212	

m material volumétrico (distribución triangular) = $0.6/\sqrt{6} = 0,244949$, para el calculo de la incertidumbre combinada se debe tener en cuenta 1 vez esta valor por que se utiliza un balón de dos litros.	0,24496
m pureza del reactivo (distribución rectangular) = $0,005/\sqrt{3} = 0,00288675$	0,00289
$\mu_{csi} = 100,50 \sqrt{[(\mu_{\text{balanza}}/2020,20)^2 + (\mu_{\text{material volumétrico}}/2000)^2 + (\mu_{\text{pureza del reactivo}}/0,995)^2]}$	
$(\mu_{\text{balanza}}/Masa)^2$	1,09875E-14
$(\mu_{\text{material volumétrico}}/2000)^2$	1,50012E-08
$(\mu_{\text{pureza del reactivo}}/0,995)^2$	8,4173E-06
$[(\mu_{\text{balanza}}/Masa)^2 + (\mu_{\text{material volumétrico}}/2000)^2 + (\mu_{\text{pureza del reactivo}}/0,995)^2]$	8,4323E-06
$\sqrt{[(\mu_{\text{balanza}}/Masa)^2 + (\mu_{\text{material volumétrico}}/2000)^2 + (\mu_{\text{pureza del reactivo}}/0,995)^2]}$	0,00290384
INCERTIDUMBRE COMBINADA DEBIDA A LA PREPARACIÓN Y DISPENSACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO	0,29185 μ_{csi}

3. INCERTIDUMBRE COMBINADA DEBIDA AL FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA			μ_{Cfd}
Volumen de muestra			200 μL
Exactitud para un volumen de 200 μL de acuerdo al manual del equipo			0,5773504 μL
$\mu_{\text{Micropipeta}}$ 0,577/ $\sqrt{3}$ para un volumen de 200 (distribución rectangular)	0,5773504	1,732050808	0,33333341
Factor de dilución			0,5
volumen dispensado de SI			100 μL
Exactitud para un volumen de 100 μL de acuerdo al manual del equipo			0,155 μL
$\mu_{\text{Micropipeta}}$ 0,155/ $\sqrt{3}$ para un volumen de 100 (distribución rectangular)	0,155	1,732050808	0,08948929
$\mu_{Cfd} = 1/2 \sqrt{[(\mu_{\text{Micropipeta}}/100)^2 + (\mu_{\text{Micropipeta}}/200)^2]}$			
$(\mu_{\text{Micropipeta}}/100)^2$			8,00833E-07
$(\mu_{\text{Micropipeta}}/200)^2$			2,77778E-06
$[(\mu_{\text{Micropipeta}}/100)^2 + (\mu_{\text{Micropipeta}}/200)^2]$			3,57861E-06
$\sqrt{[(\mu_{\text{Micropipeta}}/100)^2 + (\mu_{\text{Micropipeta}}/200)^2]}$			0,00189172
INCERTIDUMBRE COMBINADA DEL FACTOR DE DILUCIÓN			0,00094586 μ_{cfd}

4. INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN LA MUESTRA μ_{cm}
Se hace uso de las incertidumbres combinadas hallada en los numerales 1,2,3

para una concentración de [] mg%	$\mu_{CM} = [] \text{mg}\% \sqrt{[(\mu_{cc}/[] \text{mg}\%)^2 + (\mu_{csim}/100,50)^2 + (\mu_{cfd}/0,5)^2]}$		
$(\mu_{cc}/[] \text{mg}\%)^2$	nivel	100	1,50958E-07
$(\mu_{csim}/100,50)^2$			8,4323E-06
$(\mu_{cfd}/0,5)^2$			3,57861E-06
SUMA			1,21619E-05
μ_{CM}			0,348739 μCM

5. INCERTIDUMBRE DEBIDA A LA VARIABILIDAD DE LA RELACIÓN DE ÁREAS $\mu\delta$

ÁREA DEL ETANOL/ÁREA DEL ESTÁNDAR INTERNO (AETOH/ASI)

$$\mu\delta = s/\sqrt{n}$$

N	72
S	0,0355
\sqrt{n}	8,48528137
$\mu\delta$	0,00418372
CONVERTIDA A CONCENTRACIÓN	0,420

6. INCERTIDUMBRE CORREGIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL POR LA VARIABILIDAD DE LAS ÁREAS μ_c

$$\mu_c = \sqrt{[(\mu_{cm})^2 + (\mu\delta)^2]}$$

$(\mu_{cm})^2$	0,121619
$(\mu\delta)^2$	1,75035E-05
$(\mu_{cm})^2 + (\mu\delta)^2$	0,121636
μ_c	0,34876379 μC

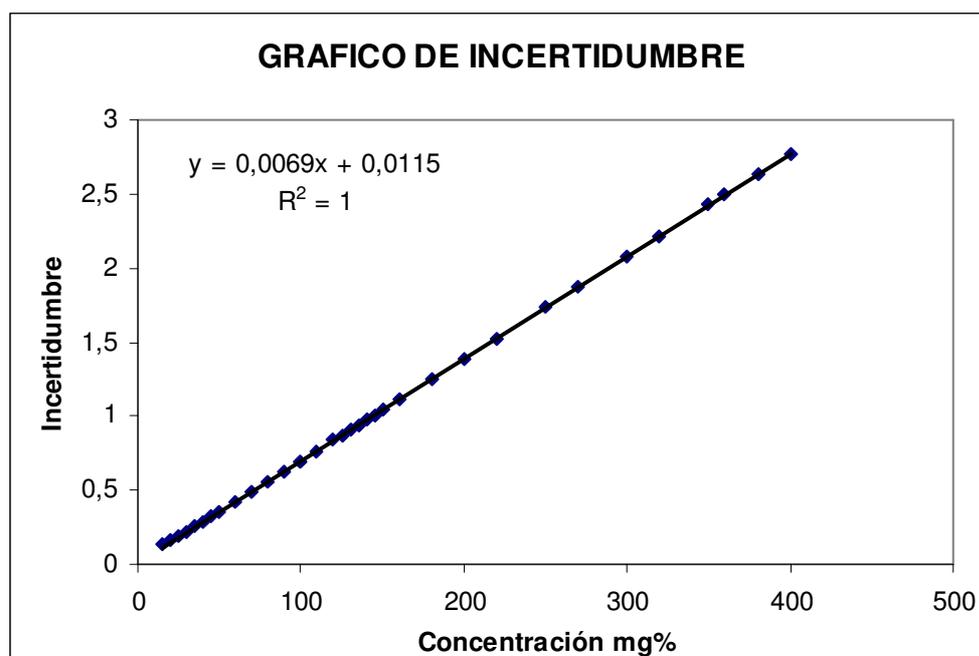
7. INCERTIDUMBRE EXPANDIDA U

Se determina para un nivel de confianza del 95,45 por lo tanto el factor de cobertura es 2

$$U = K \mu_c$$

K	2			0,69752758 mg%
Ejemplo por tanto para 100 mg%				100 mg% ± 0,6975mg%

Realizando el calculo para cada nivel de concentración dentro del rango de la curva de calibración			
NIVEL DE CONCENTRACIÓN	U	NIVEL DE CONCENTRACIÓN	U
15	0,1301	130	0,9045
20	0,1591	135	0,939
25	0,1901	140	0,9735
30	0,2221	145	1,0081
35	0,2549	150	1,0426
40	0,2881	160	1,1118
45	0,3216	180	1,2501
50	0,3553	200	1,3885
60	0,4232	220	1,5269
70	0,4914	250	1,7346
80	0,5600	270	1,8731
90	0,6287	300	2,0809
99	0,6906	320	2,2194
100	0,6975	350	2,4272
110	0,7664	360	2,4965
120	0,8354	380	2,6351
125	0,8699	400	2,7736



ECUACIÓN

m = 0,006894643

b = 0,011472582

r = 0,999917381

U_{ALCOHOLEMIA} = m X + b

U_{ALCOHOLEMIA} = 0,006894643 X + 0,011473

Alcoholemia < 40 mg% - U_{ALCOHOLEMIA} ≤ 0,2881 mg%

Alcoholemia entre 41mg% - 99mg% - U_{ALCOHOLEMIA} 0,2947 mg% - 0,6906 mg%

Alcoholemia entre 100mg% - 149mg% - U_{ALCOHOLEMIA} 0,6975 mg% - 1,0357 mg%

Alcoholemia entre 150mg% - 400mg% - U_{ALCOHOLEMIA} 1,0426mg% - 2,7736 mg%