

Artículo Original

Desarrollo y validación de un método full scan para determinar alcoholemia por cromatografía de gases con detección de espectrofotometría de masas simple cuadrupolo

Development and validation of a full scan method to determine blood alcohol concentration by gas chromatography with detection of simple quadrupole mass spectrophotometry

Elder M. Reyes^{1,a}, Luis A. Inostroza^{1,b}, Americo J. Castro^{1,c}, Milagros M. Llacza^{1,d}, Max H. de la Cruz^{1,e}

Recibido: 05/12/2022 Aceptado: 15/04/2023 Publicado: 30/12/2023

Resumen

La alcoholemia es una de las pruebas químicas realizadas con mayor frecuencia en los laboratorios forenses por lo que es imprescindible disponer de métodos analíticos exactos, precisos y adecuados para el propósito. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar un método para determinar alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Se desarrolló el método por inyección de espacio de cabeza estático empleando propan-1-ol como estándar interno, el cromatógrafo de gases se configuró a 40 °C, la adquisición de datos del espectrómetro de masas fue en modo full scan (28 - 65 uma), los analitos se identificaron por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas del espectrómetro de masas, el etanol se cuantificó considerando el fragmento iónico 31. El método desarrollado resultó selectivo (separó eficientemente el etanol del metanol, etanal, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol con resolución superior a 3), sensible (los límites de detección y cuantificación fueron de 0,00213 g/L y 0,00710 g/L respectivamente), lineal ($R^2 = 0,9994$, en el rango de trabajo de 0,1 g/L hasta 4,0 g/L), preciso (los coeficientes de variación fueron inferiores a 1,36 % y 1,97 % en la repetibilidad y precisión intermedia respectivamente), exacto (la recuperación obtenida fue del 98,4 % al 101,7 %) y robusto (estadísticamente se obtuvieron los mismos resultados al hacer variaciones mínimas en el método). Se concluye que el método desarrollado y validado para la determinación de alcoholemia por cromatografía de gases/espectrometría de masas es selectivo, sensible, lineal, preciso, exacto y robusto.

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

Abstract

Blood alcohol concentration in one of the most frequently performed chemical tests in forensic laboratories, so it is essential to have accurate, precise and fit-for-purpose analytical methods. The objective of this study was developed and validate a method to determinate blood alcohol levels by gas chromatography/mass spectrometry. The method was developed with headspace injection, using propan-1-ol as internal standard, the gas chromatograph was set at 40 °C, the mass spectrometer data acquisition was full scan (28 - 65 uma), the analytes were identified by comparison of the mass spectra with the mass spectrometer libraries, ethanol was quantified considering the ionic fragment 31. The developed method was selective (it efficiently separated ethanol from methanol, ethanal, propanone, propan-1-ol and propan-2-ol with a resolution greater than 3), sensitive (the limits of detection and quantification were 0.00213 g/L and 0.00710 g/L respectively), linear

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.

^a Autor para correspondencia: elder.reyes@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7260-2404>

^b E-mail: inostrza@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8038-0730>

^c E-mail: acastro@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8012-967X>

^d E-mail: milagros.llacza@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5305-1352>

^e E-mail: max.delacruz2@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8036-3279>

Citar como:

Reyes E., Inostroza L., Castro A., Llacza M., De La Cruz M. (2023). Desarrollo y validación de un método Full Scan para determinar alcoholemia por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas simple cuadrupolo *Ciencia e Investigación* 2023 26(1):21-30. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v26i1.27483>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>) que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

($R^2 = 0.9994$, in the working range from 0.1 g/L to 4.0 g/L), precise (the coefficients of variation were less than 1.36 % and 1.97 % in the repeatability and intermediate precision respectively), accurate (the recovery obtained was from 98.4 % and 101.7 %) and robust (statistically the same results were obtained when by making minimal variations in the method). It is concluded that the method developed and validated for the determination of alcohol levels by gas chromatography/mass spectrometry is selective, sensitive, linear, precise, accurate and robust.

Keywords: Analytical method, blood alcohol concentration, development, gas chromatography, mass spectrometry, validation.

INTRODUCCIÓN

El etanol es considerado la sustancia química más usada y abusada en la sociedad, por lo que su cuantificación en un laboratorio forense es una de las pruebas toxicológicas realizadas con mayor frecuencia¹. Lidera la lista de sustancias psicoactivas que son reportadas en toxicología post mortem² y toxicología conductual³, su excesivo consumo genera intoxicaciones agudas, diversos procesos patológicos, altera el sistema nervioso distorsionando la percepción y el razonamiento pudiendo generar accidentes fatales y diversos crímenes violentos⁴.

Para la cuantificación del etanol en matrices biológicas se han desarrollado diversos métodos, desde colorimétricos y espectrofotométricos que son indirectos e inespecíficos⁵, debido a que uno de los reactivos utilizados podría reaccionar con otros analitos de comportamiento químico similar al etanol dando resultados erróneos, sin embargo, aún son utilizados por algunos laboratorios forenses. Posteriormente, se ha desarrollado la cromatografía de gases con detector de ionización por llama acoplado a muestreador de espacio de cabeza que actualmente se emplea en la mayoría de los laboratorios forenses en el mundo⁶, no obstante, tiene la desventaja de que solo depende del tiempo de retención del compuesto objetivo de análisis⁷, pudiendo existir algún componente que tenga el mismo tiempo de retención generando controversia en la interpretación de resultados.

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), es una combinación de dos técnicas analíticas diferentes como son la cromatografía y espectrometría; la cromatografía de gases separa eficientemente los componentes de una muestra y el espectrómetro de masas identifica inequívocamente cada componente en su estructura molecular, esta combinación se ha convertido en el estándar de oro para los laboratorios forenses por su alto grado de selectividad y sensibilidad proporcionando evidencia concluyente⁸. Actualmente los países desarrollados están optando por usar esta técnica para la alcoholemia con el objetivo de obtener datos reales e incuestionables para los operadores de justicia⁹. Es necesario que los laboratorios forenses a cargo de la determinación de alcoholemia de los países latinoamericanos posean métodos fiables validados cuando los resultados analíticos se utilizan como prueba en un proceso penal con la finalidad de alcanzar la verdad para una mejor aplicación de justicia en los tribunales¹⁰.

Los métodos empleados para la determinación de alcoholemia luego de ser desarrollados y previos a la implementación deben ser validados, demostrando práctica y documentariamente que se cumplen los requisitos particulares para su uso previsto para generar confiabilidad en los resultados¹¹. Este proceso de validación finaliza con una conclusión y declaración del cumplimiento o no de los requisitos establecidos¹².

Por lo antes mencionado, el objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar un nuevo método full scan para determinar alcoholemia por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas simple cuadrupolo como propuesta para su aplicación en casos forenses cuando los presuntos delitos en investigación son cometidos bajo los efectos del etanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos y material biológico

Etanol absoluto HPLC 99,9 %, propanona HPLC, propan-1-ol HPLC, propan-2-ol HPLC, metanal HPLC y cloruro de sodio ACS se obtuvieron de Merck®. Agua ultrapura obtenido del sistema de purificación de agua GenPure® Pro (Thermo Scientific®) y sangre total humana libre de etanol.

Instrumentación

Los ensayos para el desarrollo y validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM se realizaron en un cromatógrafo de gases modelo Trace 1300 (Thermo Scientific®) equipado con columna capilar TG® - ALC1 de 30 m x 0,32 mm ID x 1,80 μ m, un espectrómetro de masas simple cuadrupolo modelo ISQ 7000 (Thermo Scientific®) y un equipo automuestreador de espacio de cabeza estático modelo Triplus RSH (Thermo Scientific®).

Desarrollo del método para determinar alcoholemia por CG/EM

Se realizaron varios ensayos para el desarrollo del método de alcoholemia por CG/EM, tomando como base estudios similares^{13,14} y notas de aplicación de fabricantes de equipos^{15,16}. El desarrollo del método buscó optimizar los recursos, muestras y el tiempo de análisis, por lo que se realizaron pruebas con diferentes volúmenes de reactivos y cantidades de muestra; instrumentalmente se probó con variaciones del flujo de gas de arrastre y temperaturas del horno hasta alcanzar la

mejor resolución en el menor tiempo posible, resultado un método con las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 1.

Preparación de patrones de calibración, material fortificado y estándar interno

Los patrones de calibración y material fortificado se prepararon a partir de soluciones stock de 10,0 g/L de etanol por dilución en agua ultrapura y sangre total respectivamente a las siguientes concentraciones 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L¹¹. El estándar interno se preparó diluyendo 200 µL de propan-1-ol en 1000 mL de agua ultrapura.

Preparación de soluciones para inyección en el equipo CG/EM

En un vial de vidrio de 20 mL se añadió 100 mg de cloruro de sodio, 1 mL de estándar interno, 200 µL de patrón de calibración o material fortificado según corresponda, se cerró herméticamente con tapa colapsible; luego se agitó en vórtex por aproximadamente 1 min y se colocó en el auto-muestreador de espacio de cabeza para su inyección en el CG/EM. Las soluciones para inyección en el equipo CG/EM fueron preparados por duplicado.

Modelo de calibración

Se inyectaron en el CG/EM soluciones preparadas de patrones de calibración de etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L, 2,0 g/L, 3,0 g/L y 4,0 g/L, por duplicado y se procedió a la calibración del equipo, utilizando propan-1-ol al 0,02 % como estándar interno¹⁷

Validación del método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM

En la validación del método para determinar alcoholemia por CG/EM se analizaron las características de desempeño recomendados por la EURACHEM (selectividad, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez)

en su manual “La adecuación al uso de métodos analíticos. Una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados”¹¹.

Selectividad

Se inyectó en el CG/EM una solución consistente en la mezcla de metanol, etanal, etanol, propan-2-ol, propanona y propan-1-ol preparado a concentración de 1,0 g/L de todos los componentes en sangre total por sextuplicado, se evaluó la capacidad del método para diferenciar los componentes de la solución¹¹.

Sensibilidad

La sensibilidad se evaluó cuantitativamente en términos de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Para su determinación se inyectó material fortificado con etanol al 0,1 g/L en condiciones de repetibilidad por decuplicado en el equipo CG/EM, se obtuvo el resultado cuantitativo y se calculó la desviación estándar corregida (S'_0), LD y LC¹¹:

Desviación estándar corregida

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

DS: desviación estándar, n: número de inyecciones

Límite de detección

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

Límite de cuantificación

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

Linealidad

La linealidad en el intervalo de trabajo del cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas se realizó inyectando en el CG/EM tres grupos por duplicado de soluciones de patrones de calibración a concentraciones de etanol

Tabla 1. Condiciones instrumentales para análisis de alcoholemia por CG/EM.

| Parámetros instrumentales | Valores |
|--|------------------------|
| Automuestreador de espacio de cabeza estático: | 70 °C |
| Temperatura del horno | 15 min |
| Tiempo de incubación | 70 °C |
| Temperatura de la aguja | 1 mL |
| Volumen de inyección | |
| Cromatógrafo de gases | 150 °C |
| Temperatura del inyector | Helio |
| Gas carrier | 5 mL/min |
| Flujo | 40 °C (isotérmico) |
| Temperatura del horno | 3 min |
| Tiempo de corrida | |
| Espectrómetro de masas | 280 °C |
| Temperatura de línea de transferencia | 240 °C |
| Temperatura de fuente de iones | Ionización electrónica |
| Tipo de ionización | 70 eV |
| Voltaje | Full Scan |
| Modo de adquisición de datos | 28 - 65 uma |
| rango de masas | |

al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L; 4,0 g/L y 5,0 g/L, posteriormente se analizó si la respuesta del equipo es proporcional a las concentraciones inyectadas mediante estadística de regresión lineal, análisis de residuales y ANOVA¹⁷.

Para evaluar la linealidad del método desarrollado en el intervalo de trabajo, se calibró el CG/EM por el método desarrollado, luego se inyectaron tres grupos de material fortificado con etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por duplicado, calculando sus concentraciones, finalmente se graficó la regresión entre las concentraciones fortificadas vs. concentraciones calculadas evaluando el gráfico generado mediante estadística de regresión lineal, análisis de residuales y ANOVA¹⁷.

Exactitud

La exactitud se evaluó cuantitativamente como recuperación, para lo que se inyectó en el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas material fortificado con etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado, luego se calculó las concentraciones por el método propuesto, finalmente se comparó porcentualmente los resultados las concentraciones calculadas con las concentraciones fortificadas¹⁸.

Precisión

La precisión del método desarrollado para determinar alcoholemia por CG/EM se evaluó mediante repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad se analizó inyectando en el CG/EM material fortificado con etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado, luego se calculó las concentraciones por el método desarrollado, finalmente se analizó estadísticamente la dispersión de los resultados en cada concentración¹⁷.

Para la precisión intermedia dos analistas analizaron independientemente las mismas muestras de material fortificado con etanol al 0,1 g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L; 2,0 g/L; 3,0 g/L y 4,0 g/L por sextuplicado empleando el método desarrollado, posteriormente se realizó el estudio de la dispersión de los resultados obtenidos de los dos analistas y su comparación estadística¹⁷.

Robustez

Se realizaron mínimas variaciones premeditadas en el método instrumental (temperaturas de los equipos y volumen de inyección), así como en la preparación de la muestra (volúmenes añadidos del material fortificado y del estándar interno), posteriormente se realizaron inyecciones en el CG/EM con las variaciones aleatorias del método y se compararon estadísticamente los resultados obtenidos¹⁸.

RESULTADOS

Identificación del analito

DISCUSIÓN

En Perú la CG/EM aún no es utilizada como técnica analítica para la determinación de alcoholemia, sin embargo, en el mundo se han publicado varios estudios

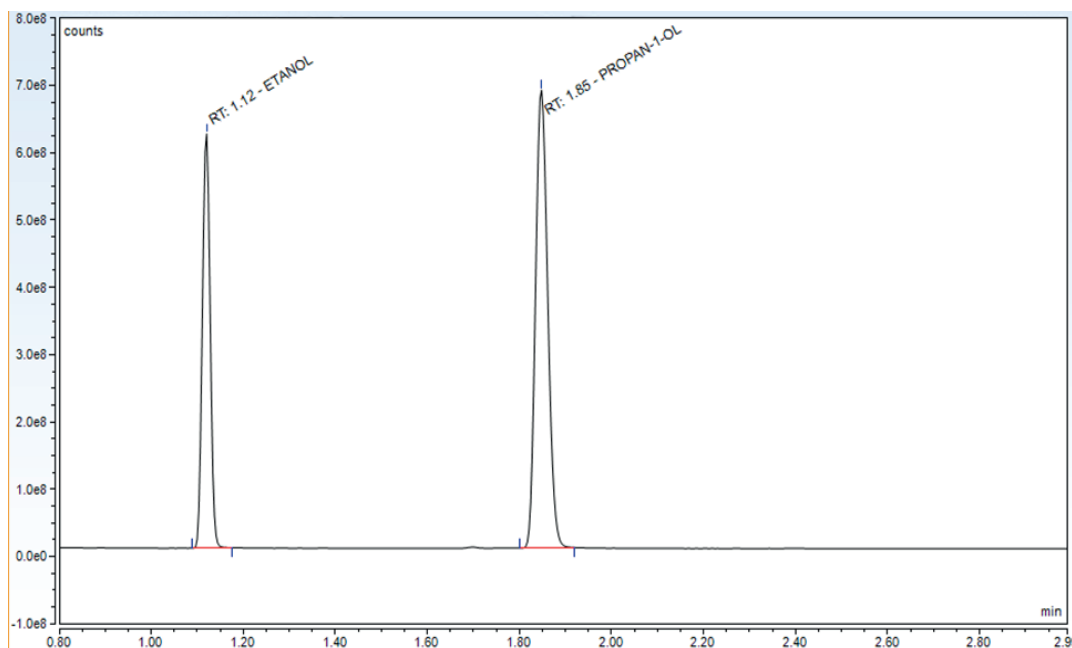


Figura 1. Cromatograma del fragmento iónico 31 extraído del cromatograma obtenido por full scan (28 - 65 uma) en solución preparada para inyección en el CG/EM con material fortificado con etanol al 1,0 g/L, donde se observa los picos cromatográficos el etanol (t_R : 1,12 min) y el propan-1-ol (t_R : 1,85 min). t_R : tiempo de retención.

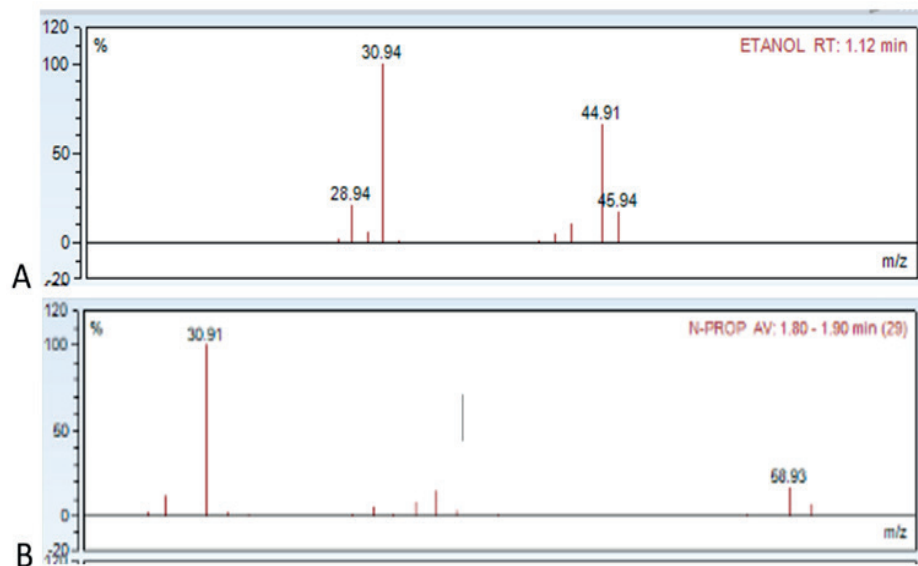


Figura 2. (A) Espectro de masas del etanol y (B). Espectro de masas del propan-1-ol, reportado por el espectrómetro de masas después de inyectar solución preparada para inyección en el CG/EM con material fortificado al 1,0 g/L.

Selectividad

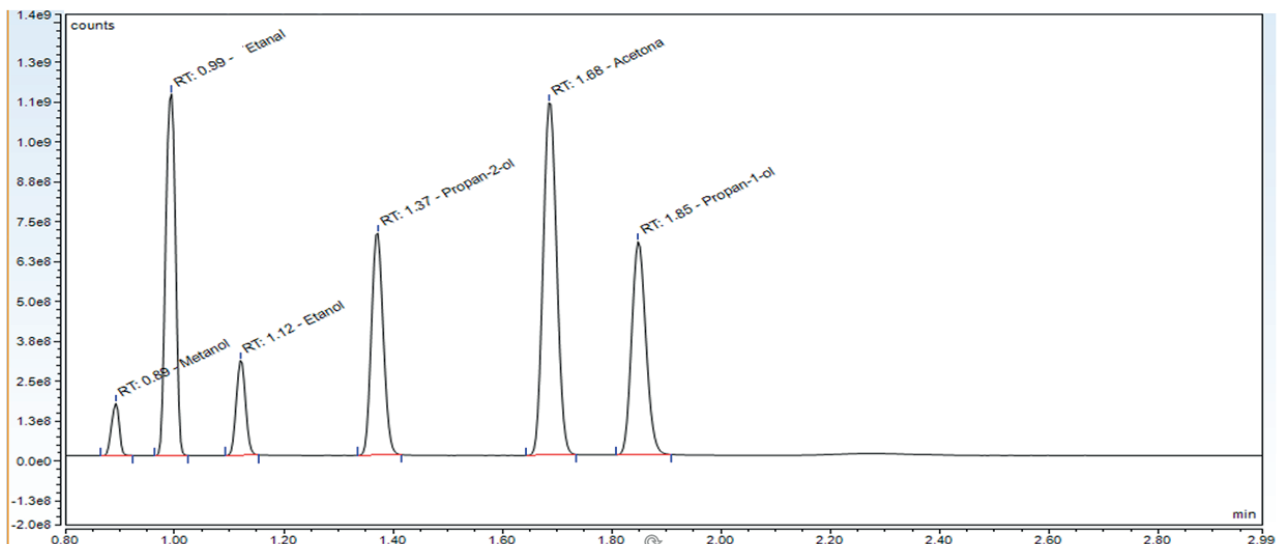


Figura 3. Cromatograma en full scan obtenido después de haber inyectado solución con metanol (t_R :0,89 min), etanol (t_R :0,99 min), etanol (t_R :1,12 min), propan-2-ol (t_R :1,37 min), propanona (t_R :1,68 min) y propan-1-ol (t_R :1,85 min) al 1,0 g/L en sangre total en el CG/EM.

Sensibilidad

$$S'_0 = 0,00071$$

$$LD = 0,00071 \times 3 = 0,00213 \text{ g/L}$$

$$LC = 0,00071 \times 10 = 0,00710 \text{ g/L}$$

S'_0 : Desviación estándar corregida, LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación.

Linealidad

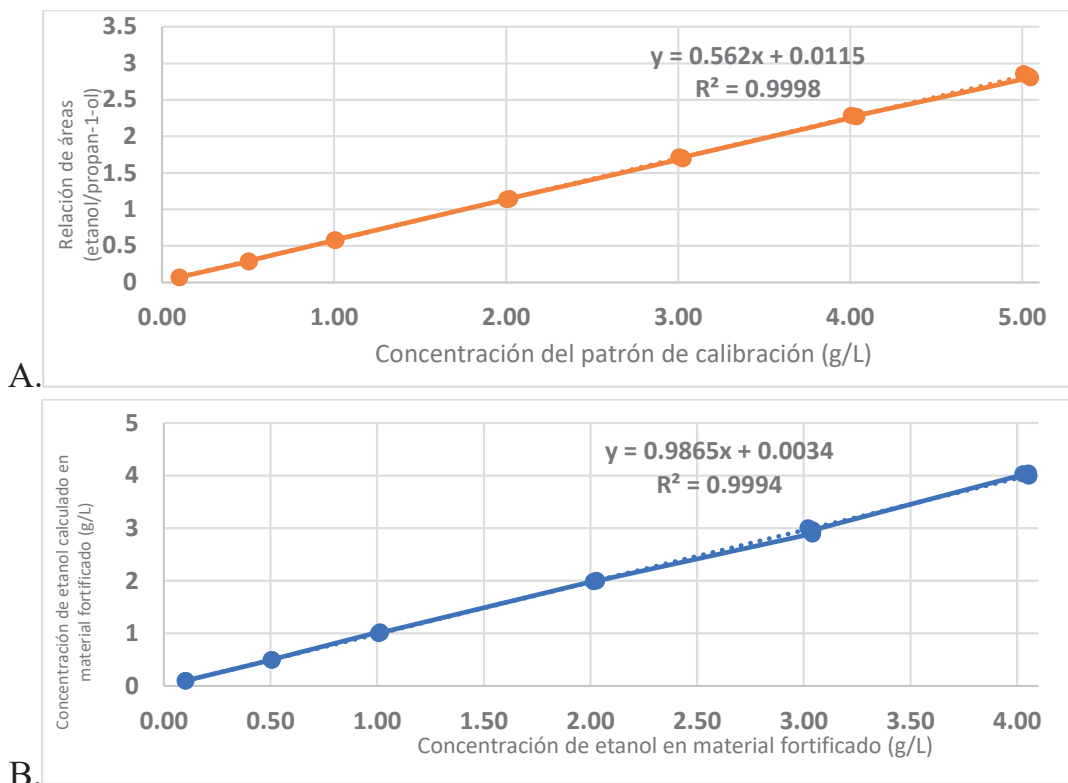


Figura 4. (A) Linealidad para el CG/EM (concentración inyectada vs. relación de áreas del etanol/propan-1-ol). y **(B)** Linealidad para el método desarrollado (concentración etanol fortificado vs. concentración etanol calculado) en el intervalo de trabajo

Exactitud

Tabla 2. Porcentaje de recuperación de etanol en material fortificado con etanol en diferentes concentraciones analizadas en el CG/EM.

| Recuperación de etanol en material fortificado | | | |
|--|------------|------------|---------------|
| Concentraciones de material fortificado inyectado en el CG/EM(g/L) | Máximo (%) | Mínimo (%) | \bar{x} (%) |
| 0,101 | 101,7 | 98,8 | 100,7 |
| 0,506 | 100,2 | 99,8 | 99,8 |
| 1,013 | 101,6 | 98,4 | 100,2 |
| 2,027 | 100,6 | 98,7 | 99,5 |
| 3,040 | 99,9 | 99,4 | 99,7 |
| 4,053 | 100,4 | 99,3 | 99,8 |

\bar{x} : promedio

Repetibilidad

Tabla 3. Análisis estadístico de repetibilidad del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en CG/EM.

| Concentraciones de material fortificado inyectado en el CG/EM (g/L) | Concentración de etanol calculado empleando el método desarrollado | | | | |
|---|--|--------------|-----------------|----------|--------|
| | Máximo (g/L) | Mínimo (g/L) | \bar{x} (g/L) | DS (g/L) | CV (%) |
| 0,101 | 0,104 | 0,100 | 0,102 | 0,001 | 1,17 |
| 0,506 | 0,505 | 0,497 | 0,502 | 0,003 | 0,59 |
| 1,013 | 1,030 | 0,997 | 1,015 | 0,014 | 1,36 |
| 2,027 | 2,034 | 1,999 | 2,017 | 0,016 | 0,79 |
| 3,040 | 3,039 | 3,022 | 3,031 | 0,007 | 0,24 |
| 4,053 | 4,069 | 4,026 | 4,046 | 0,016 | 0,40 |

\bar{x} : promedio, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Precisión intermedia

Tabla 4. Análisis estadístico de precisión intermedia del método desarrollado empleando material fortificado con etanol a diferentes concentraciones inyectados en el CG/EM.

| Concentraciones de material fortificado inyectado en el CG/EM (g/L) | Concentración de etanol calculado empleando el método desarrollado | | | | |
|---|--|--------------|-----------------|----------|--------|
| | Máximo (g/L) | Mínimo (g/L) | \bar{x} (g/L) | DS (g/L) | CV (%) |
| 0,101 | 0,105 | 0,099 | 0,102 | 0,002 | 1,59 |
| 0,506 | 0,514 | 0,497 | 0,504 | 0,005 | 0,99 |
| 1,013 | 1,030 | 0,994 | 1,011 | 0,013 | 1,26 |
| 2,027 | 2,087 | 1,954 | 2,018 | 0,040 | 1,97 |
| 3,040 | 3,065 | 2,981 | 3,026 | 0,021 | 0,69 |
| 4,053 | 4,069 | 3,977 | 4,033 | 0,028 | 0,69 |

X: promedio, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Robustez

Tabla 5. Análisis estadístico de los tiempos de retención de material fortificado con etanol al 0,5 g/L y 2,0 g/L, cuando son analizados por el método desarrollado con ligeras variaciones.

| | Tiempo de retención (min) | |
|--------|---------------------------|-------------|
| | Etanol | Propan-1-ol |
| Máximo | 1,137 | 1,896 |
| Mínimo | 1,107 | 1,807 |
| X | 1,122 | 1,850 |
| DS | 0,014 | 0,043 |
| CV | 1,26 | 2,33 |

X: promedio, DS: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

mostrando la aplicación de esta tecnología para la cuantificación de etanol en sangre donde resaltan su selectividad y especificidad sobre otros métodos¹⁹. En este estudio se presenta la validación de un método desarrollado para determinación de alcoholemia por CG/EM para su aplicación en casos forenses en Perú evaluando las características de desempeño recomendadas por la EURACHEM¹¹.

El cromatógrafo de gases en su columna separa eficientemente los componentes del vapor de la muestra inyectada por el automuestreador de espacio de cabeza y estos llegan al detector de espectrometría de masas para ser identificados y cuantificados²⁰.

El espectrómetro de masas puede ser configurado para que adquiera datos en un rango de masas determinado (*full scan*) excluyendo de esta manera muchos interferentes²⁰, la adquisición de masas del presente método desarrollado para determinación alcoholemia por GC/MS fue de 28 - 65 uma porque el etanol (PM: 46,07 g/L) y propan-1-ol (PM: 60,10 g/L) se encuentran en este rango, lo que automáticamente excluye componentes de mayor peso molecular; se empleó *full scan* para obtener los espectros de masas completos e identificarlos por comparación con las bibliotecas de los espectrómetros de masas. La capacidad de buscar fragmentos iónicos característicos de analitos (filtro de masas) dentro de un análisis hace de la espectrometría de masas un detector altamente específico para diversos análisis como de alcoholemia, al aplicar un filtro de masas, el software genera un cromatograma con las señales de los componentes que

poseen únicamente el fragmento iónico seleccionado observando gráficamente la presencia del componente en el tiempo. Para el análisis cuantitativo del etanol considera el fragmento iónico 31 por ser el más abundante y el común con el estándar interno (propan-1-ol). Estas características hacen de la espectrometría de masas una herramienta sensible y selectiva frente a otras técnicas de análisis.

En el cromatograma de la figura 1 se aprecia buena señal del fragmento iónico 31, de alrededor de 650 000 000 cuentas, valores que son tomados por el equipo para el cálculo de la relación de áreas (etanol/propan-1-ol), que son empleados en los análisis cuantitativos del etanol²¹. Este método utilizó el propan-1-ol como estándar interno por el parecido químico al etanol para la corrección de las fluctuaciones aleatorias instrumentales y del método que puede compensar errores aleatorios como sistemáticos²².

En las figuras 2A y 2B se observan los espectros de masas de los componentes hallados en los tiempos de retención 1,12 y 1,85 minutos, los que al ser comparados con las bibliotecas del espectrómetro de masas identificaron al etanol y al propan-1-ol con probabilidades de coincidencia superiores al 95 %²³. La técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas, además de tomar la coincidencia de los tiempos de retención con los estándares para la identificación de sustancias, utiliza los fragmentos iónicos para la identificación molecular definitiva del etanol²⁴, La espectrometría de masas en

la identificación y cuantificación de xenobióticos para el Comité de Ciencias Forenses de Estados Unidos tiene la más alta puntuación en los análisis forenses²⁵ y para el grupo de trabajo científico para análisis de drogas comisadas del Departamento de Justicia de Estados Unidos, por su alto poder de discriminación, corresponde a un método de categoría A, por lo que se obtienen resultados concluyentes²⁶.

El cromatograma en full scan obtenido después de haber inyectado metanol, etanal, etanol, propanona, propan-1-ol y propan-2-ol a concentración de 1,0 g/L en el CG/EM se observa en la figura 3, obteniéndose resolución superior a 3 de todos los componentes evidenciando buena selectividad del método desarrollado, estos resultados son coherentes con los hallados por Tiscinone *et al.*¹⁴ Además del software que filtra los iones y la configuración del equipo para adquirir datos en un determinado rango de masas lo hace ser una técnica de alta confiabilidad por ser mucho más selectivo. Se evaluó los componentes mencionados debido a que son comúnmente encontrados en laboratorios forenses porque son marcadores en severas enfermedades e intoxicaciones agudas²⁷ y podrían ser encontrados en un examen forense de alcoholemia rutinario.

Se corroboró que el método desarrollado para determinación de alcoholemia es muy sensible, evidenciado por el límite de detección (0,00213 g/L) y el límite de cuantificación (0,00710 g/L). Xiao *et al.*¹⁹ reportaron valores de 0,4 µg/mL y 39,5 µg/mL como límite de detección y cuantificación respectivamente, asimismo otros autores establecieron muy buena sensibilidad para métodos analíticos empleando espectrometría de masas¹⁴. Esto demuestra la potencialidad del método en los análisis de etanol en sangre con otros objetivos como en clínica o en investigación, sin embargo, con fines de aplicación en casos forenses, en el método desarrollado se consideró la concentración del etanol al 0,1 g/L como concentración mínima, considerando que los valores críticos para toma de decisiones en la legislación peruana son de 0,25 g/L y 0,5 g/L²⁸.

En la figura 4A se observa la linealidad para el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas mostrando la dispersión de los patrones de calibración inyectados vs. la relación de áreas (etanol/propan-1-ol), comprobando linealidad en el rango de concentraciones de etanol desde 1,0 g/L hasta 5,0 g/L¹⁷, obteniéndose un coeficiente de determinación de 0,9998 por lo que se considera lineal²⁹.

En la figura 4B se encuentra la linealidad del método desarrollado para cuantificación de etanol en sangre en el intervalo de trabajo, luego de haber inyectado soluciones de material fortificado con etanol en el CG/EM se graficó la dispersión entre las concentraciones del etanol fortificado vs. concentración calculada, resultando una muy buena la regresión lineal en el rango de concentraciones para el etanol desde 1,0 g/L hasta 4,0 g/L¹⁷, obteniendo un coeficiente de determinación de 0,9994, por lo que se considera lineal²⁹. El límite

superior del intervalo de trabajo del método se proyectó hasta 4,0 g/L, basado en que según diversos autores alcoholemia superior a la concentración mencionada son tóxicos e incompatibles con la vida³⁰.

El análisis ANOVA de regresión lineal, tanto para el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas y para el método desarrollado para alcoholemia, arrojó que los modelos son lineales, proporcionan un buen ajuste de los datos, las pendientes fueron significativamente diferentes de cero y los interceptos fueron estadísticamente iguales a cero. Además, en el análisis de los residuales se apreció una distribución aleatoria en torno a cero lo cual confirmó su linealidad¹¹, similar a lo hallado por Iwai *et al.*, (2019)⁷ para la linealidad en el rango de trabajo de 0,1 a 5,0 g/L con un coeficiente de determinación superior a 0,998.

La tabla 2 presenta los porcentajes de recuperación de etanol en material fortificado analizado en el CG/EM de soluciones preparadas donde se observa que el método recuperó entre 98,4 % y 101,7 % en todas las concentraciones, calificándose como un método con alto nivel de exactitud²⁹. Resaltando el etanol al 0,5 g/L que tuvo el mejor porcentaje de recuperación (99,8 %) lo que deja un despreciable margen de error para esta concentración aceptando estadísticamente el dato obtenido como el real³¹.

Las tablas 3 y 4 demuestran estadísticamente la precisión del método analítico desarrollado para alcoholemia por CG/EM en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

La tabla 3 reporta la repetibilidad del método en cada concentración de etanol analizado en material fortificado con etanol dentro del rango de trabajo, se observa una dispersión mínima en los resultados de todas las concentraciones con un coeficiente de variación inferior al 1,36 %, considerando que para determinación de alcoholemia las guías sugieren un coeficiente de variación menor o igual a 10 %³¹, destacando el material fortificado con etanol al 0,5 g/L que obtuvo un coeficiente de variación de 0,59 %. Prenti *et al.*³² señalaron 1,7 % de precisión intermedia para ésta concentración, lo que demuestra baja variabilidad en los resultados³¹, por lo que al analizar muestras de concentración de 0,5 g/L se obtienen resultados precisos con una variación de (\pm 0,003 g/L) que resulta imponderable en el redondeo al décimo obteniendo el mismo resultado al repetir las inyecciones, dando un máximo grado de confiabilidad por su precisión y exactitud.

En la tabla 4, se detalla el análisis estadístico de la precisión intermedia, examinando estadísticamente las diferencias entre los resultados cuando dos analistas analizan las mismas muestras¹¹, Para el método desarrollado se obtuvo un coeficiente de variación inferior a 1,97 % en todas las concentraciones de material fortificado con etanol dentro del rango de trabajo, mientras que Wasfi *et al.*³³ reportaron coeficientes de variación inferiores al 5%. Lo que demuestra una baja dispersión de los resultados corroborado la precisión³⁰, además el análisis

ANOVA demuestra que los resultados entre el analista 1 y analista 2 son estadísticamente iguales resultado en un método preciso para los fines forenses como prueba en los tribunales para delitos relacionados al etanol¹¹.

La tabla 5 demuestra el análisis estadístico de los tiempos de retención para la robustez, encontrando un coeficiente de variación de 1,26 % para el etanol y 2,33 % para el propan-1-ol, los que aún se encuentran dentro de la ventana de reconocimiento de los componentes por el equipo, además cuantitativamente los análisis ANOVA arrojó que los resultados obtenidos de los ensayos realizados con las variaciones mínimas deliberadas en el método analizando material fortificado a concentraciones de etanol al 0,5 g/L y 2,0 g/L son estadísticamente iguales¹¹.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un nuevo método *full scan* para determinar alcoholemia por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas simple cuadrupolo en el rango de 0,1 g/L hasta 4,0 g/L de etanol en sangre siendo selectivo, sensible, lineal, preciso, exacto y robusto que sería de potencial aplicación en casos forenses por hechos punibles cometidos bajo los efectos del etanol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chun H, Poklis J, Poklis A, Wolf C. Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *J Anal Toxicol*. [Internet]. 2016 [citado el 05 de octubre 2022]; 40(8): 653-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/jat/article/40/8/653/2450720>
2. Demlie L, Gebretsadik A, Nigussie K, Gebrekidan A, Hadush Y. Determination of ethanol in blood using headspace gas chromatography with flame ionization detector (HS-CS-FID): Validation of a method. *Cogent Chemistry* [Internet]. 2020 [citado el 5 de octubre del 2022]; 6(1). Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/10.1080/23312009.2020.1760187?scroll=top&needAccess=true>
3. Repetto M. Desarrollo y evolución histórica de la toxicología. En: Repetto M, Repetto G, editores. *Toxicología Fundamental*. Madrid: Díaz de Santos; 2009. p. 11 - 5.
4. Villanueva E. Estudio Toxicológico y Médico Legal del Alcohol Etilico. En: Gisbert J, editor. *Medicina Legal y Toxicología*. 6º ed. Barcelona: Editorial Elsevier Masson. 2004. p. 875-95.
5. Williams M, Reese D. Colorimetric Determination of Ethyl Alcohol. *Anal. Chem*. [Internet]. 1950 [citado 02 de agosto del 2022]; 22(12): 1556-61. Disponible en <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60048a025>.
6. Jones AW. Medicolegal Alcohol Determinations – Blood - or Breath Alcohol Concentrations?. *Forensic Sci Rev*. [Internet]. 2020 [citado 28 de julio 2022]; 12(1-2): 23-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26256024/>
7. Iwai M, Kondo F, Suzuki T, Ogawa T, Seno H. Quantification of ethanol in whole blood by extraction using NeedlEx® and gas chromatography/mass spectrometry. *Medical Mass Spectrometry* [Internet]. 2019 [citado 06 de agosto del 2021]; 3(1): 1-5. Disponible en: http://www.jsbms.jp/english/publish/3-1_iwai.pdf.
8. Aebi B, Bernhard W. *Modern Gas Chromatography - Mass Spectrometry in Human Forensic Toxicology*. En: Riviere J, editor. *Biological Concepts and Techniques in Toxicology An Integrated Approach*. 1ra ed. New York: Editorial Taylor & Francis; 2006. p. 365 - 75
9. Scientific Area Committees for Forensic Science, de la Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) of United States. Standard for Mass Spectral Data Acceptance in Forensic Toxicology. [Internet]. 2019 [citado 05 de mayo del 2022]. Disponible en https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spec_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf
10. Wayne A. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. *Forensic Science International* [Internet]. 2010 [citado el 15 de octubre del 2022]; 200(1-3): 1-20. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/42371529_Evidence-based_survey_of_the_elimination_rates_of_ethanol_from_blood_with_applications_in_forensic_casework
11. EURACHEM. a Focus for Analytical Chemistry in Europe. La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. [Internet] 2º ed. 2016 [citado 12 de noviembre del 2021]. Disponible en https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf.
12. Norma internacional - ISO/IEC 17025:2017: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. [Internet]. 2017 [citado 12 de noviembre del 2021] Génova. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>.
13. Wasfi I, Hassan A, Naser Z, Juma F, Abdulla N. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. *Journal of Chromatography B* [Internet]. 2001 [Citado 06 de agosto del 2022]; 799(2):331-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14670752/>.
14. Tiscione N, Alford I, Tate D, Shan X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2011 [Citado 06 de agosto del 2022]; 35(7):500-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21871160/>.
15. Cooper J, Riccardino G, Cojocariu C. Rapid, automated and accurate determination of blood alcohol concentration (BAC) by headspace coupled to gas chromatography and flame ionization detection. Application note 10713. [Internet]. 2018 [citado 20 de diciembre del 2021]. Disponible en; <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-10713-gc-fid-blood-alcohol-concentration-bac-an10713-en.pdf>
16. Measurement of Ethanol in Blood Using Headspace GC-MS. Application Data Sheet N°7. Shimadzu. [Internet] 2011 [citado el 20 de diciembre del 2021]. Disponible en; https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com/an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/12060/jpo212062.pdf
17. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), ICH harmonised tripartite guideline. [Internet] 2005 [citado el 25 de noviembre del 2022]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf

18. United States Pharmacopeia Convention, IV. (2019). USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos. p. 8388-93.
19. Xiao HT, He L, Tong RS, Yu JY, Chen L, Zou J, et al. Rapid and sensitive headspace gas chromatography – mass spectrometry method for the analysis of ethanol in the whole blood. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2014 [citado 10 de febrero 2022]; 28(5): 386-90. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6807615/>.
20. Hübschmann H-J. *Handbook of GC-MS Fundamentals and Applications*. 3º ed. Editorial Wiley-VCH. 2015. Weinheim. p. 7-40
21. Rubinson J. *Análisis Instrumental*. Madrid: Editorial Prentice Hall; 2001. P. 522-550.
22. Skoog D, Holler F, Crouch S. *Principios de Análisis Instrumental*. 6ª Edición. México: Editorial Cengage Learning; 2008. p. 11-21.
23. Maurer H, Pflieger K, Weber A. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants, and their Metabolites*. 10 ed. Editorial Wiley-VCH. Alemania 2017. p. 106.
24. Bermejo R, Moreno A. *Análisis Instrumental*. Madrid: Editorial Síntesis S.A.; 2014. p. 291 - 310.
25. Scientific Area Committees for Forensic Science, de la Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSAC) of United States. *Standards for Identification Criteria in Forensic Toxicology*. [Internet]. 2019 [citado 05 de mayo 2022]. Disponible en: https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spec_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf.
26. United States Department of Justice Drug Enforcement Administration. *SWGDRUG. Recommendations for methods of analysis*. [Internet]. 2019 [citado el 18 de agosto del 2022]. Estados Unidos. Disponible en: https://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%208_FINAL_ForPosting_092919.pdf
27. Schlatter J, Chiadmi F, Gandon V, Chariot P. Simultaneous determination of methanol, acetaldehyde, acetone and ethanol in human blood by gas chromatography with flame ionization detection. *Hum Exp Toxicol*. [Internet]. 2014 [citado el 30 de setiembre del 2022];33(1):74-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23584355/>
28. Decreto legislativo N° 957 y sus modificatorias. Código procesal penal. Lima – Perú [Internet]; 22Jul2004 [citado 02 de agosto del 2022]. Disponible en: http://www.oas.org/juridico/PDFs/mesicic4_per_cod_procesal.pdf.
29. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito. *Directrices para la validación de métodos analíticos y calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. New York. [Internet]. 2010 [citado 12 de noviembre del 2021]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
30. Repetto M. *Toxicología del alcohol etílico*. En: Repetto M, editor. *Toxicología Avanzada*. Madrid: Díaz de Santos.; 1995. p. 425-75.
31. American Academy of Forensic Sciences. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. [Internet]. 2019 [citado el 17 de agosto del 2022] New York. Disponible en <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-practices-method-validation-forensic-toxicology>
32. Prenesti E, Bagnati M, Berto S, Basile M, Vidali M, Bellomo G. Measurement Uncertainty of Ethanol Concentration in Venous Whole Blood Determined By a HS-GC-MS Method. *JSM Analytical and Bioanalytical Techniques* [Internet]. 2019 [citado el 14 de julio del 2022]; 4(7): 1-7. Disponible en: <https://www.jscentral.org/Analytical/jsmabt123906.pdf>
33. Wasfi I, Hassan A, Nazer Z, Juma F, Abdulla N. Rapid and sensitive static headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. *Journal of Chromatography B* [Internet]. 2021 [citado el 06 de Agosto del 2022]; 799(2):331-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14670752/>

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Fuente de financiamiento

Este trabajo de investigación fue financiado con recursos propios de los investigadores.