



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)  
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE  
SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS  
POR HS-GC-FID/FID**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-TOX-023**

VERSIÓN: 15

Rige desde: 25/07/2023

PAGINA: 1 de 79

<b>Elaborado o modificado por:</b>  <b>Dr. Marco Martínez Esquivel</b> <b>Perito Judicial 2B Sección Toxicología</b>	<b>Revisado por Líder Técnico:</b>  <b>Dr. Marco Martínez Esquivel</b> <b>Líder Técnico Unidad de Trámite Rápido</b>
<b>Visto Bueno Encargado de Calidad:</b>  <b>Dr. Marco Martínez Esquivel</b> <b>Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología</b>	<b>Aprobado por:</b>  <b>Dr. Diego Arias Alfaro</b> <b>Jefatura, Sección de Toxicología</b>

**CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN**

<b>Versión</b>	<b>Fecha de Aprobación</b>	<b>Fecha de Revisión</b>	<b>Descripción del Cambio</b>	<b>SCD</b>	<b>Solicitado por</b>
01	15/12/2010	12/12/2016	Versión Inicial del Procedimiento	-	GBA
02	12/12/2016	03/04/2017	Cambio de formato del procedimiento, inclusión en el procedimiento de todos los analitos volátiles analizados en la sección de toxicología	008-2016	DAA
03	03/04/2017	04/07/2017	Cambios en redacción, criterios de aceptación, matrices del alcance, uso de agua desionizada, rango de congeladores, lavado de viales, inclusión de base de datos, hojas de cálculo y formularios.	003-2017	DAA
04	04/07/2017	24/8/2017	Inclusión de anexo 9, ajuste por modelo de automuestreador, cambio orden de montaje de muestras y controles, criterios de aceptación de controles y preparación de controles	007-2017	DAA
05	24/8/2017	19/02/2018	Inclusión de nueva bibliografía, resultados e informes de validación y estimación de incertidumbre.	009-2017	DAA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)  
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE  
SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS  
POR HS-GC-FID/FID**

PROCEDIMIENTO DE  
OPERACIÓN NORMADO  
ESPECIFICO

**P-DCF-ECT-TOX-023**

VERSIÓN: 15

Rige desde: 25/07/2023

PAGINA: 2 de 79

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitud o por
06	19/02/2018	15/06/2018	Inclusión de nuevo formulario. Modificación por inclusión de matriz del alcance y en manejo de controles. Actualización de datos en anexos.	002-2018	DAA
07	15/06/2018	06/12/2019	Modificación por hallazgos de auditoría interna de 2018.	011-2018	DAA
08	06/12/2019	24/7/2020	Modificación de reporte de incertidumbre	029-2019	DAA
09	24/7/2020	03/8/2021	Inclusión de Cabinas de Bioseguridad tipo I y Clase 2-B2. Actualización de las figuras de anexo de hojas de cálculo y métodos del GC.	009-2020	DAA
10	03/8/2021	6/12/2021	Modificación por cambios en PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense por aspectos relacionados con guías y estándares de ANSI/ASB.	012-2021	DAA
11	6/12/2021	29/4/2022	Modificación para incluir verificación de confirmación de resultados positivos en una réplica.	019-2021	DAA
12	29/4/2022	07/07/2022	Eliminar termómetro de lista de equipos y atender observaciones de auditoría interna	009-2022	DAA
13	07/07/2022	05/06/2023	Modificar el procedimiento para análisis exclusivo de etanol y congéneres. Actualizar anexo de estimación de incertidumbre.	011-2022	DAA
14	05/06/2023	25/07/2023	Eliminar matrices del alcance, incluir criterios de aceptación e incluir reporte cuantitativo de matrices sólidas	004-2023	DAA
15	25/07/2023		Revisión de documento e inclusión de ejemplo de factor de cobertura para una distribución rectangular y de materiales.	008-2023	DAA

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL  
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES  
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

**La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 3 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

## 1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer un procedimiento para la determinación cualitativa y cuantitativa de sustancias volátiles (etanol y sus congéneres: acetona, isopropanol y metanol), en muestras de origen biológico en la Sección de Toxicología, del DCF, del O.I.J. de Costa Rica.

## 2 Alcance:

Este procedimiento es aplicado para la determinación cuantitativa de etanol (entre 0,10 a 5,0 g/L) y sus congéneres (acetona, isopropanol y metanol; entre 0,10 a 4,0 g/L) en muestras de origen biológico (sangre total, coágulo, suero, orina, humor vítreo y músculo) recibidas en la Sección de Toxicología del DCF, en los casos donde se solicite la determinación de etanol y sus congéneres. La metodología para este tipo de determinación presenta los siguientes parámetros de validación (referencia de la validación: 3.11 y 3.12; referencias de los criterios de aceptación de la validación: 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.10):

<b>Resumen de resultados de validación de la determinación cuantitativa de etanol y congéneres en matrices biológicas</b>		
<b>Nombre del parámetro de validación</b>	<b>Valor obtenido del parámetro</b>	<b>Criterio de aceptación y rechazo</b>
Linealidad	Modelo de calibración lineal con "r" > 0,9997 para todos los analitos en el ámbito de trabajo.	"r" > 0,99
Límite de detección y cuantificación	LD estimado: < 0,05 g/L LD verificado: 0,05 g/L LC verificado: 0,10 g/L	Menor o igual a 0,10 g/L
Veracidad	Sesgo%: de -5,42% a 5,47%	Etanol: sesgo% < 10% Congéneres: sesgo % < 20%
Precisión	CV% (dentro corridas): de 0.02% a 2.94%) CV% (entre corridas): de 0.75% a 3.40%	Etanol: CV% < 10% Congéneres: CV % < 20%
Arrastre	No se presenta arrastre. No se detectaron los analitos, posterior a la inyección del nivel más alto de calibración.	Que, en el blanco posterior al nivel más alto de la curva de calibración, no se detecten los analitos con una respuesta mayor a la mitad de la concentración del límite administrativo (0,05 g/L)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 4 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

Estabilidad	Estabilidad en carrusel: estable 24 horas Estabilidad en refrigeración: estable 72 horas Estabilidad en temperatura de montaje de muestras: estable a temperatura ambiente.	<p>Criterio de estabilidad: las respuestas de los analitos no varíen más del porcentaje permitido (porcentaje del sesgo permitido para la metodología) respecto de la señal de los analitos en el tiempo cero. Al evaluar el tiempo en que los analitos son estables en los viales de espacio de cabeza una vez preparados en dos niveles de concentración. Evaluando el tiempo en el automuestreador y el tiempo de estabilidad en almacenamiento en refrigeración del vial preparado.</p> <p>Criterio: el sesgo% y el CV% de material de referencia certificado en sangre analizados a diferentes temperaturas, se encuentran dentro de los criterios de aceptación del método. Al evaluar el efecto de la temperatura durante el montaje de las muestras.</p>
Estudio de interferencias	No se evidencian interferentes del estándar interno, de los analitos ni de las matrices.	<p>Criterio: no presencia de analitos por encima del límite administrativo (0,10 g/L) al evaluar el efecto de interferencia de matriz, analizando 10 muestras por tipo de matriz libre de analitos. Criterio: no presencia de analitos por encima del límite administrativo (en blanco sin analitos) ni presencia del estándar interno (en blanco de matriz sin estándar interno), al evaluar que no hay interferencia del estándar interno sobre los analitos y de los analitos sobre el estándar interno, analizando un blanco de matriz con el estándar interno y otro blanco de matriz enriquecido con los analitos en alta concentración. Criterio: no se deben presentar señales de los analitos de interés por encima del límite administrativo (0,10 g/L), al evaluar la interferencia de otros analitos volátiles, analizando un blanco por tipo de matriz enriquecido con concentración de niveles tóxicos de estas sustancias.</p>
<p>Nota: los resultados de la validación son para los analitos: etanol y los congéneres (acetona, isopropanol y metanol), en las matrices (sangre, orina y humor vítreo) y en los dos cromatógrafos de gases: GC6890 y GC7890.</p>		

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 5 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

<b>Resumen de resultados de validación de la determinación cuantitativa de etanol y congéneres en matrices biológicas</b>		
<b>Nombre del parámetro validación</b>	<b>Valor obtenido del parámetro</b>	<b>Criterio de aceptación y rechazo</b>
Linealidad	"r" > 0,9996 (para todos los analitos)	"r" > 0,99
Límite de detección y cuantificación	LD estimado < 0,02 g/L LD y LC verificado 0,02 g/L y 0,05 g/L	Menor o igual al menor límite administrativo establecido por matriz (0,10 g/L para sangre, orina y humor vítreo; y 0,20 g/L para músculo)
Veracidad	Sesgo%: de -6.99 a 5,28	Etanol: sesgo% < 10% para sangre, humor vítreo y orina y <20% para músculo. Congéneres: sesgo % < 20%
Precisión	CV% (dentro corridas): < 5.94% CV% (entre corridas): < 5.42%	Etanol: CV% < 10% para sangre, humor vítreo y orina y <20% para músculo. Congéneres: CV % < 20%
Arrastre	No se presenta arrastre.	Que, en el blanco posterior al nivel más alto de la curva de calibración, no se detecten los analitos con una respuesta superior al LA
Estudio de interferencias (selectividad y especificidad)	No se evidencia interferentes del estándar interno, de los analitos, de las matrices ni de otros volátiles.	No presencia de analitos por encima del límite administrativo (en las matrices libre de analitos)  No presencia de analitos por encima del límite administrativo (en blanco sin analitos)  No presencia del estándar interno (en blanco de matriz sin estándar interno)  No se deben presentar señales de los analitos de interés por encima del límite administrativo (en presencia de otros volátiles diferentes a los analitos)
Nota: los resultados de la validación son para los analitos: etanol y los congéneres (acetona, isopropanol y metanol), en las matrices (sangre, orina, humor vítreo y músculo) y en el cromatógrafo de gases: GC8890.		

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 6 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

### 3 Referencias:

- 3.1 Aderjan, R., Daldrup, T., Käferstein, H., Krause, D., Mubßhoff, F., Paul, L. D., et al.. Guidelines for determining blood alcohol concentration (BAC) for forensic purposes e BAC guidelines. Blutalkohol, 2011; 48(3), 137e143.
- 3.2 Caplan, Y.H. The determination of alcohol in blood and breath. In: Saferstein, R. ed. Forensic Science Handbook. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Inc, 1982.
- 3.3 Chromatography and Spectroscopy Supplies. Agilent Technologies. Reference Guide 2002-2003, 422.
- 3.4 Garriot, J. Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens. Lawyers and Judges Publishing, Inc., Tucson, AZ. 1993., 2009
- 3.5 Marques de Cantú, M.J. Probabilidad y Estadística para Ciencias químico-biológicas. Mc Graw Hill. Mexico. 1998.
- 3.6 Martínez, M.A. Criterios cualitativos en toxicología forense. Rev Esp Med Legal. 2012; 38(2): 68-75.
- 3.7 Martínez, M.A. Criterios cuantitativos en toxicología forense. Rev Esp Med Legal. 2014; 40(1): 30-38.
- 3.8 Miller, James N. y Miller, Jane C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4Ta Ed., Prentice-Hall con sello autorizado de Pearson Educación, S.A., Impreso en España, 1994.
- 3.9 Spiridonov, V.P. Tratamiento matemático de datos físico-químicos. Editorial MIR. Moscu. 1973.
- 3.10 Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, SWGTOX Doc 003, revisión 1, published May 20, 2013.
- 3.11 Validación y estimación de incertidumbre de la Determinación cuantitativa de etanol y congéneres (acetona, isopropanol y metanol) en sangre, orina y humor vítreo por el método HS-GC-FID/FID con el equipo HS-GC6890-FID/FID y HS-GC7890-FID/FID. Informes 001-TOX-VAL-2017 y 001-TOX-INC-2017.
- 3.12 Validación y estimación de incertidumbre de la Determinación cuantitativa de etanol y congéneres (acetona, isopropanol y metanol) en sangre, orina, músculo y humor vítreo por el método HS-GC-FID/FID con el equipo HS-GC8890-FID/FID. Informes 009-TOX-VAL-2019 y 009-TOX-INC-2019.

### 4 Equipos y Materiales:

- Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).
- Balanza analítica, rango 0 a 200 g o similar, precisión +/- 0,0001 g o similar.
- Balón aforado de 10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL, o similar.
- Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel. (ver anexo 03).
- Botellas de plástico con tapa de rosca de 125 mL, 250 mL, 500 mL o similar.
- Bitácora de Control y uso de Equipo: "Cromatógrafo de gases con doble columna y doble detector FID. Marca: Agilent. Modelo: GC-7890/HSS-7697A".
- Bitácora de Control y uso de Equipo: "Cromatógrafo de gases con doble columna y doble detector FID. Marca: Agilent. Modelo: GC-8890/HSS-7697A".
- Bitácora de Control y uso de Equipo: de Balanza analítica con rango 0 a 200 g o similar y precisión +/- 0,0001 g o similar.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 7 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

-Bitácora de Control y uso de Equipo: de Dilutor Microlab 500 o 600 Series Hamilton, con jeringas de dilución y con jeringas de muestreo con rango de 10 uL a 50000 uL, exactitud  $< a \pm 3,0\%$ , o similar.

-Cámara de Bioseguridad Clase 2-B2.

-Cámara de Bioseguridad tipo I.

-Capilla de extracción.

-Centrífuga refrigerada, Thermo Sorvall S16R o similar.

-Congelador ( $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ).

-Cromatógrafo de gases Agilent 7890, con automuestreador Head-space Agilent 7697A, con doble columna (DB-ALC1 y DB-ALC2) y doble detector FID, o similar.

-Cromatógrafo de gases Agilent 8890, con automuestreador Head-space Agilent 7697A, con doble columna (DB-ALC1 y DB-ALC2) y doble detector FID, o similar.

-Descapsulador para viales de espacio de cabeza de 20 mm.

-Dilutor Microlab 500 o 600 Series Hamilton, con jeringas de dilución y con jeringas de muestreo con rango de 10 uL a 50000 uL, exactitud  $< a \pm 3,0\%$ , o similar.

-Formulario "Cálculo de alcoholemia y cantidad total de alcohol en el organismo"

-Formulario "Cuantificación y estimación de la incertidumbre (reporte ley de tránsito)"

-Formulario "Cuantificación y estimación de la incertidumbre (reporte una muestra)"

-Formulario "Cuantificación y reporte de controles"

-Formulario "Eliminación y estimación retrospectiva de etanol"

-Formulario "Eliminación y estimación retrospectiva con pruebas de alcohol en aliento"

-Formulario "Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo"

-Formulario "Orden de viales con muestras y controles en la secuencia de análisis"

-Horno de laboratorio, rango 20-240 $^{\circ}$  C ( $\pm 10^{\circ}$  C).

-Gabacha.

-Garrafón de plástico con llave de dispensado con volumen de 50 L o similar.

-Gradillas para tubos.

-Guantes desechables.

-Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo alcohol en aliento", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

-Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

-Hoja de cálculo "Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

-Hoja de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel. (ver anexo 5).

-Lavadora automática de cristalería.

-Lentes de seguridad.

-Papel Kraft.

-Pinzas de disección con diente de ratón.

-Pipetas plásticas de transferencia de 5 mL o similar, nuevas.

-Pizeta.

-Recipiente plástico para desechos punzo-cortantes, de 1 L o similar.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 8 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

- Recipiente plástico para lavado de septum de 2,5 L o similar.
- Refrigerador (0 a 10°C).
- Sellador para viales de espacio de cabeza de 20 mm.
- Sellos de aluminio para viales de espacio de cabeza de 20 mm, nuevos.
- Septum de Teflon/Silicone con Liner-10/90 para sellos de aluminio de 20 mm.
- Tijeras para disección.
- Tinas plásticas de 20 L, 30 L o similar.
- Toallas de papel desechable.
- Viales de plástico con tapa con capacidad de 1,5 mL o similar.
- Viales de espacio de cabeza de 20 mm x 75 mm, o similar.
- Pipetas de vidrio de 10 mL, o similar.
- Probetas de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL y 2000 mL, o similar.

**Nota 1:**

Los viales de espacio de cabeza que tienen contacto directo con fluidos o tejidos biológicos se colocan en una tina con disolución de cloro para lavado de aproximadamente 0,5% a 1% de cloro por mínimo 12 horas, se enjuagan con agua de grifo y se hornean a 140° C por lo menos por dos horas. Los viales de espacio de cabeza que no tienen contacto directo con fluidos o tejidos biológicos se enjuagan con agua de grifo y se hornean a 140° C por lo menos por dos horas.

Las pipetas y los balones se lavan con jabón alcalino, se enjuagan con agua de grifo y se enjuagan tres veces con agua desionizada. Esta cristalería no se hornea, debe colocarse invertida para que escurra y esperar a que esté seca.

Los beakers y probetas se lavan con jabón alcalino, se enjuagan con agua de grifo, se enjuagan tres veces con agua desionizada. Esta cristalería puede ser horneada a 140° C por lo menos por dos horas o puede colocarse invertida para que escurra y esperar a que esté seca.

Descarte la cristalería quebrada en un recipiente plástico para desechos punzo-cortantes.

Los materiales que están en contacto directo con fluidos o tejidos biológicos como las pinzas de disección con diente de ratón, los Septum de Teflon/Silicone con Liner-10/90 para sellos de aluminio de 20 mm, las tijeras para disección y las gradillas para tubos se colocan en una tina o en el recipiente plástico para lavado de septum de 2,5 L con disolución de cloro para lavado de aproximadamente 0,5% a 1% por mínimo 4 horas, luego se lavan con jabón alcalino, se enjuagan con agua de grifo y agua desionizada. Este material no se hornea, deben dejarse sobre toallas de papel para que escurran y esperar a que estén secos.

Los viales de plástico con tapa con capacidad de 1,5 mL o similar se lavan con jabón alcalino, se enjuagan con agua de grifo y se enjuagan tres veces con agua desionizada. Este material no se hornea, deben colocarse invertidos para que escurran y esperar a que estén secos.

Las botellas de plástico con tapa de rosca y el garrafón de plástico con llave de dispensado, se enjuagan con agua de grifo y se enjuagan tres veces con agua desionizada. Este material no se hornea, deben colocarse invertidos para que escurran y esperar a que estén secos.

El sellador y el descapsulador se limpian con papel toalla impregnado de disolución de cloro al 0,5%.

**5 Reactivos y Materiales de Referencia:**

- Agua desionizada.
- Disolución de cloro al 0,5% (Ver Anexo Número 1).
- Disolución de cloro concentrada al 10%, 12% o similar, se adquiere comercialmente.
- Disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5% a 1% (Ver Anexo Número 1).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 9 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

- Disolución de n-propanol 0,20 g/L (Estándar interno) (Ver Anexo Número 1).
- Disoluciones de etanol en agua de diferentes niveles de concentración (dentro del ámbito de trabajo) utilizadas como niveles para realizar curva de calibración o controles, Material de referencia certificado: Cerilliant Certified Reference Standard – NIST traceable o similar (se adquieren comercialmente).
- Disoluciones de etanol en matriz de orina, Material de referencia en diferentes niveles concentraciones (dentro del ámbito de trabajo), utilizadas como control para verificar la curva de calibración, Liquichek Urine Toxicology Control BIO-RAD o similar (se adquieren comercialmente).
- Disoluciones de etanol y congéneres en agua de diferentes concentraciones (dentro del ámbito de trabajo) utilizadas como niveles para realizar curva de calibración o controles, Material de referencia certificado multicomponente: Cerilliant Certified Reference Standard Calibration Kit– NIST traceable o similar (se adquieren comercialmente).
- Disoluciones de etanol y congéneres de diferentes concentraciones (dentro del ámbito de trabajo) utilizadas como niveles para realizar curva de calibración, preparadas en agua a partir de Material de referencia (Ver Anexo Número 1).
- Disoluciones de Etanol (y/o congéneres) en matriz de sangre total humana, Material de referencia certificado en diferentes niveles concentraciones (dentro del ámbito de trabajo), utilizadas como control para verificar la curva de calibración, Medidrug Ethanol VB-plus para Toxicología Forense o similar (se adquieren comercialmente).
- Disoluciones mix de etanol y congéneres (acetona, isopropanol y metanol) de diferentes niveles de concentración (dentro del ámbito de trabajo) utilizadas como control para verificar la curva de calibración, preparadas en agua a partir de Material de referencia certificado (Ver Anexo Número 1).
- Gas ultrapuro (hidrógeno, helio y aire).
- Jabón alcalino.
- Material de referencia certificado de los diferentes analitos volátiles, con pureza de 99,9% GC o similar (Acetona, Etanol, Isopropanol y Metanol).

## 6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Temperatura en el proceso de preparación de muestras con ayuda del dilutor	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Se recomienda utilizar cámara de bioseguridad tipo I para preparación de muestras, capilla de extracción de gases para manejo de solventes o cabina de bioseguridad clase 2-B2 para ambos procesos.

## 7 Procedimiento:

### 7.1 Labores previas al análisis de calibradores, controles y muestras:

- 7.1.1** Utilice las Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional descritas en el punto 11 de este procedimiento.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 10 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

- 7.1.2** Como funcionario encargado del análisis, previo al montaje de calibradores, controles o muestras limpie la mesa de trabajo con disolución de cloro al 0,5% utilizando toallas desechables, nunca con alcohol o algún otro desinfectante que contenga sustancias volátiles. Prepare el área de trabajo con papel Kraft (la limpieza y preparación del área de trabajo puede realizarse desde el día anterior al montaje del análisis). Cierre las ventanas, celosías y la puerta del cuarto de análisis para minimizar la presencia de posibles sustancias volátiles en el ambiente.
- 7.1.3** Saque los reactivos (estándar interno, controles o calibradores) a utilizar que se conservan en refrigeración y déjelos atemperar en el cuarto de volátiles mínimo media hora antes de su utilización.
- 7.1.4** Encienda el dilutor que va a utilizar en el análisis, seleccione el método del equipo según el analito a analizar (ver anexo 02). Acondicione el dilutor (revisión de jeringas, tuberías y cebado de vías).
- 7.1.5** Verifique el suministro de gases y encienda el cromatógrafo y el automuestreador que va a utilizar en el análisis si se encontraran apagados. Seleccione el método del equipo según el analito a analizar. (ver anexo 03)
- 7.1.6** Verifique que el equipo alcanza las condiciones del método a utilizar.
- 7.2 Montaje de una muestra, calibrador, control o blanco en los viales de espacio de cabeza con ayuda del dilutor:**
- 7.2.1** En el caso de controles, calibradores y muestras reales líquidas, con ayuda del dilutor coloque 50 uL de muestra y 450 uL de disolución de estándar interno dentro del vial de espacio de cabeza (ver anexo 02).
- 7.2.2** En el caso de los blancos, realice el punto anterior sustituyendo la cantidad de muestra por agua desionizada.
- 7.2.3** En el caso de muestras reales sólidas (coágulo o músculo), con ayuda de una balanza analítica, pinzas de disección con diente de ratón, pipetas plásticas de transferencia y tijeras para disección, coloque y pese  $0,050 \pm 0,001$  g de muestra (masa equivalente al volumen de 50 uL, asumiendo una densidad de la muestra sólida de 1 g/mL) dentro del vial de espacio de cabeza (la muestra debe tomarse de la parte interna del tejido y estar picada finamente). Inmediatamente después con ayuda del dilutor coloque 450 uL de disolución de estándar interno dentro del vial de espacio de cabeza (ver anexo 02).
- 7.2.4** Selle cada vial con un sello de aluminio con el septum de teflon/silicone.
- 7.3 Análisis de una curva de calibración y/o controles:**
- 7.3.1** Para etanol y congéneres monte una nueva curva de calibración en el cromatógrafo de gases cuando:
- no se cuente con más estándar interno del que se preparó al montar la curva de calibración anterior
  - los controles de corridas de rutina se salen de los rangos establecidos o para evitarlo
  - la curva de calibración está cerca de alcanzar su periodo de vigencia (4 meses)
- 7.3.2** En el caso de etanol y congéneres monte en el cromatógrafo de gases junto a una nueva curva de calibración los controles que verifican su exactitud. Posteriormente en el periodo de vigencia de esa curva de calibración, monte controles cada día antes y durante un análisis en serie de muestras para verificar la vigencia de la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo). En el anexo 8 se muestra un

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 11 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

ejemplo de la distribución de los controles utilizados para verificar las corridas de análisis en serie de muestras de etanol y congéneres.

- 7.3.3** Antes de montar una curva de calibración de etanol y congéneres, realice una limpieza del sistema neumático del automuestreador, para lo cual prepare y monte una secuencia de 20 viales de espacio de cabeza con 1 mL de agua desionizada y tres con aire, con el método denominado "Limpieza" en el cromatógrafo de gases correspondiente (ver anexo 04).
- 7.3.4** La curva de calibración debe elaborarse con 5 niveles de calibración de cada sustancia volátil como mínimo y cada nivel de calibración debe analizarse por duplicado como mínimo. Los niveles de calibración utilizados deben encontrarse dentro del ámbito de trabajo declarado en el alcance de este procedimiento, por ejemplo, para la determinación cuantitativa de etanol entre 0,10 a 5,0 g/L.
- 7.3.5** Para elaborar y verificar la curva de calibración de un analito puede utilizar niveles de calibración y controles adquiridos comercialmente con concentraciones certificadas del analito (materiales de referencia certificados) o niveles de calibración y controles preparados en el laboratorio a partir de material de referencia del analito. (ver anexo 01)
- 7.3.6** Realice la preparación y/o montaje de las réplicas de cada nivel de los calibradores y controles en el dilutor, como lo indica el anexo 01, el anexo 02 y el punto 7.2 de este procedimiento.
- 7.3.7** Programe una secuencia en el cromatógrafo de gases con el orden de los calibradores y/o controles a analizar. Salve la secuencia con la fecha del análisis y una letra para indicar el orden de las secuencias (por ejemplo, 20MARZO2015A.s)
- 7.3.8** Al programar la secuencia tome en cuenta los siguientes aspectos:
- 7.3.8.1** Cada nivel de calibrador o control debe analizarse mínimo por duplicado.
- 7.3.8.2** Las réplicas de los niveles de la curva de calibración deben montarse en series de orden ascendente de la concentración (ejemplo de análisis de una curva de 10 niveles y tres réplicas por nivel: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10, 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 y 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10).
- 7.3.8.3** Inicie la secuencia con un blanco en el vial #1, luego coloque las series ascendentes de réplicas de los niveles de la curva.
- 7.3.8.4** Coloque un blanco posterior al nivel más alto de cada serie ascendente de los niveles de la curva.
- 7.3.8.5** Coloque las réplicas de los controles en la secuencia posterior a los niveles de la curva, agrupadas por nivel de concentración y en orden ascendente de la concentración (ejemplo de análisis de controles de 3 niveles de concentración y dos réplicas por nivel: 1-1, 2-2 y 3-3).
- 7.3.9** Realice el análisis de cada nivel de los calibradores y/o controles en el cromatógrafo con el método correspondiente al analito o grupo de analitos a analizar. (ver anexo 03 y 04) Verifique que el cromatógrafo tiene las condiciones del método a utilizar y está listo, antes de iniciar la secuencia en el cromatógrafo.
- 7.3.10** Una vez finalizada la corrida cromatográfica y creada la curva de calibración dentro del método del cromatógrafo, salve el método con la curva actualizada en el directorio correspondiente de la computadora del equipo con el nombre del método y salve otra copia del método con el nombre de la fecha en que se montó la curva (por ejemplo, 20MARZO2015.m) en el directorio y subdirectorío correspondiente. (ver anexo 03)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 12 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

**7.3.11** Una vez obtenidos los datos de los niveles, introduzca los valores de área del analito y del estándar interno para crear una curva de etanol y congéneres en la hoja de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres" (ver anexo 5). Guarde el nuevo archivo de la curva con la fecha de realización, la fecha introdúzcala en el formato DDMESAAAA, dos números para el día las letras del mes y cuatro números para el año, ejemplo "curva de etanol y congéneres 20MARZO2016 8890". (ver anexo 03)

**7.3.12** Revise que la curva de calibración cumple los criterios de aceptación o rechazo establecidos en el punto 8.1.

**7.3.13** En el caso de los controles montados junto con una curva de calibración para verificar su exactitud, calcule la concentración de estos como lo indica el punto 9.1 de este procedimiento.

**7.3.14** Revise el promedio y la variación de las réplicas de los controles calculados en el punto anterior y verifique que los controles cumplen los criterios de aceptación o rechazo establecidos en el punto 8.2.

**7.3.15** En el caso de los controles utilizados para verificar las corridas de análisis en serie de muestras de etanol y congéneres, calcule la concentración individual de cada vial de control utilizado como lo indica el punto 9.1 de este procedimiento.

**7.3.16** Revise la concentración del control calculado en el punto anterior y verifique que el control cumple los criterios de aceptación o rechazo establecidos en el punto 8.2.

#### **7.4 Procesamiento de muestras reales:**

**7.4.1** Seleccione como funcionario de la unidad de tramite rápido, utilizando la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", los objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis que pueden formar parte de un grupo de muestras de análisis en serie de sustancias volátiles.

Nota 2: La Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS" contiene los casos y objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis. Dicha base de datos se alimenta con los datos de cada caso en el momento que se realiza la apertura de este o posterior al registro de un caso en el SADCF que corresponda a una toma de muestra (en los casos de pacientes muestreados por personal de la sección en el DCF). A partir de la información incluida en esta base de datos, se generan las listas de objetos a incluir en un proceso de análisis en serie de volátiles.

Nota 3: Las muestras para análisis de sustancias volátiles se analizan en grupos de análisis en serie, que varían su número de muestras dependiendo la capacidad de viales de espacio de cabeza de los automuestreadores de los cromatógrafos. En el caso de etanol y congéneres la sección maneja un porcentaje alto de solicitudes mensualmente, por lo que se debe tratar de analizar todas las muestras lo antes posible una vez ingresen al laboratorio, priorizando el análisis de los casos urgentes a la hora de realizar las listas de análisis en serie.

**7.4.2** Seleccione, como funcionario de la unidad de trámite rápido, utilizando la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", la información para generar una lista de objetos pendientes de análisis tipo músculo rojo, para realizar una revisión previa a su análisis. Entregue la lista al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregarlas por el SADCF al funcionario encargado del análisis.

**7.4.3** Como funcionario encargado del análisis revise las muestras de músculo rojo, seleccione las muestras que presentan indicios de putrefacción (características de olor, color o aspecto concordantes con estados putrefactivos) y solicite a otro funcionario que verifique el estado de las muestras. Reporte las muestras que presentan indicios de putrefacción como

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 13 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

muestras insatisfactorias en un registro de análisis en serie del SADCF y además registre la verificación realizada por el otro funcionario.

- 7.4.4** Identifique como encargado de la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", las muestras de músculo rojo que no presentan indicios de putrefacción, como parte de las muestras pendientes de análisis que pueden formar parte de un grupo de muestras de análisis en serie de etanol y congéneres.
- 7.4.5** Seleccione, como funcionario de la unidad de trámite rápido, utilizando la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", la información para generar una lista de objetos a analizar en un proceso de análisis en serie de sustancias volátiles. Utilice esta información de la base de datos para actualizar el Formulario "Orden de viales con muestras y controles en la secuencia de análisis", guarde el archivo del formulario con el nombre de la secuencia y referencia del equipo (ver anexo 03, ejemplo: 28 OCTUBRE 2018 7890).
- 7.4.6** Entregue la lista al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregarlas por el SADCF al funcionario encargado del análisis.
- 7.4.7** Verifique que los controles utilizados para verificar la vigencia de la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo) antes de las corridas rutinarias de análisis en serie de muestras, analizados en el punto 7.3 de este procedimiento se aceptaron.
- 7.4.8** Reciba el grupo de muestras para análisis en serie por medio del SADCF, verifique los números de objeto recibidos contra Formulario "Orden de viales con muestras y controles en la secuencia de análisis" respectivo de la fecha del análisis en serie, creada en el punto 7.4.5 de este procedimiento.
- 7.4.9** Agite las muestras en un agitador de tubos por inversión aproximadamente 10 minutos antes de utilizarlas.
- 7.4.10** Rotule los viales de espacio de cabeza con el número de objeto de la muestra a analizar.
- 7.4.11** Monte las muestras en los viales de espacio de cabeza como lo indica el punto 7.2 de este procedimiento.
- 7.4.12** Programe una secuencia y coloque los viales de espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases en el orden de las muestras y controles a analizar (ver ejemplo en anexo 8). Salve la secuencia con la fecha del análisis y una letra para indicar el orden de las secuencias (por ejemplo, 20MARZO2015A.s).
- 7.4.13** Al programar la secuencia tome en cuenta los siguientes aspectos (ver ejemplo de esquema de orden de secuencias en anexo 08):
- 7.4.13.1** Las muestras de sangre de casos de Infracción a la Ley de Tránsito y las otras muestras provenientes de personas vivas deben analizarse por duplicado desde el inicio.
- 7.4.13.2** En los casos postmortem que presenten muestra de coágulo o solo muestra de humor vítreo deben analizarse por duplicado desde el inicio.
- 7.4.13.3** En los casos postmortem se recomienda (para maximizar recursos) incluir una sola réplica por muestra de sangre en la secuencia en donde se analizan por primera vez. En los casos con resultados positivos debe incluirse dos réplicas de la muestra analizada inicialmente en una secuencia posterior de análisis y además incluir dos réplicas de muestras que ayuden en la interpretación de los resultados (humor vítreo, orina, etc.).
- 7.4.13.4** Verifique que todo caso con un resultado positivo en una sola réplica sea incluido en una secuencia para confirmación, como lo indica el punto anterior.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 14 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

- 7.4.13.5** La secuencia de muestras para análisis de etanol y congéneres debe iniciar con un blanco y un control. Y debe finalizar con un control y un blanco.
- 7.4.13.6** Debe incluir controles distribuidos a lo largo de la secuencia, idealmente se debe incluir un control por cada diez viales de muestras.
- 7.4.13.7** Cuando se analicen muestras de músculo, después de cada réplica debe colocarse un blanco.
- 7.4.14** Seleccione en el cromatógrafo la secuencia programada para el análisis en serie de muestras. El orden de los viales debe ser verificado por otro funcionario distinto al que montó el análisis, dicha verificación debe anotarse en el registro de análisis en serie del SADCF correspondiente a esa secuencia de muestras. La verificación idealmente debe realizarse antes de iniciar la secuencia en el cromatógrafo, pero también puede ser realizada una vez finalizado el análisis, al momento de retirar los viales del automuestreador.
- 7.4.15** Verifique que el equipo tiene las condiciones del método a utilizar y está listo, antes de iniciar la secuencia en el cromatógrafo.
- 7.4.16** Una vez finalizado el análisis de la secuencia de muestras en el cromatógrafo, retire los viales del automuestreador.
- 7.4.17** Realice los cálculos de las muestras y reporte los resultados en el SADCF como lo indican los puntos 9 y 10 de este procedimiento.
- 7.4.18** Al completar el análisis de las muestras, entregue por medio del SADCF las muestras analizadas al encargado de la bodega de indicios.

## 8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados: (Referencias: 3.1, 3.4, 3.6 y 3.7)

### 8.1 Curva de calibración:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Coeficiente de correlación "r" de la curva de calibración	Mínimo 0,995	Repetir la curva de calibración
2	CV% de las réplicas de cada nivel de calibración	Etanol <5% Otros analitos <15% (En el LC <20%)	Repetir la curva de calibración
3	Diferencia entre el valor de concentración certificado o preparado de un nivel de calibración y el valor calculado con la curva de calibración	Etanol <10% (En el LC <20%) Otros analitos <20%	Repetir la curva de calibración

### 8.2 Controles

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Controles que se utilizan para verificar la exactitud de la curva de calibración. Para la valoración de este	Etanol: Si la concentración del control es >1,00 g/L el sesgo relativo debe ser <5%. Si la concentración del control es	- Si uno o más niveles de control se encuentran fuera de los parámetros establecidos debe repetirse el análisis con un nuevo vial de ese material. Si

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 15 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

	<p>tipo de control se utiliza el promedio y CV% de las réplicas analizadas.</p>	<p>&lt;1,00 g/L el sesgo absoluto debe ser &lt;0,05 g/L.</p> <p>Etanol: CV% de las réplicas de los controles debe ser &lt;5%</p> <p>Otros analitos: el sesgo relativo debe ser &lt;15% (En el LC &lt;20%) y el CV% de las réplicas de los controles &lt;15% (En el LC &lt;20%)</p>	<p>el problema persiste realice un estudio de causa efecto para detectar la causa asignable y tratar de eliminarla o minimizarla al máximo para evitar una nueva desviación. Para esto deben revisarse aspectos como el funcionamiento del dilutor, funcionamiento del cromatógrafo de gases, fecha de vencimiento del material de referencia, la presencia de hongos o turbidez en controles preparados, fecha de preparación de los controles, etc. Una vez corregido el problema debe repetirse la curva de calibración si el problema se encontraba en el funcionamiento del dilutor o cromatógrafo de gases.</p>
2	<p>Controles que se utilizan antes de un análisis en serie de muestras para verificar la vigencia de la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo). Para la valoración de los controles cuantitativos se utiliza la concentración calculada individual de cada vial analizado.</p>	<p>Para etanol: Si la concentración del control es &gt;1,00 g/L el sesgo relativo debe ser &lt;5%. Si la concentración del control es &lt;1,00 g/L el sesgo absoluto debe ser &lt;0,05 g/L.</p> <p>Para los otros analitos: el sesgo relativo debe ser &lt;15% (En el LC &lt;20%).</p> <p>- Que en los blancos no se detecte el analito, pero si se detecte el estándar interno</p> <p>- Que en el blanco posterior al nivel más alto del ámbito de</p>	<p>- Si uno o más niveles de controles se encuentran fuera de los parámetros establecidos debe repetirse el análisis con un nuevo vial de ese nivel o niveles de controles. Si el problema persiste realice un estudio de causa efecto para detectar la causa asignable y tratar de eliminarla o minimizarla al máximo para evitar una nueva desviación. Para esto deben revisarse aspectos como el funcionamiento del dilutor, funcionamiento del cromatógrafo de gases, la presencia de hongos o turbidez de los controles, fecha de preparación de los controles, etc. Una vez identificado y corregido el problema debe valorarse realizar una nueva curva de calibración y/o repetirse el análisis de todos los niveles del control para verificar el buen funcionamiento tanto del dilutor como del cromatógrafo de gases</p> <p>- Si el blanco inicial de la secuencia o el blanco posterior al nivel más alto del ámbito de trabajo se obtiene contaminado con el analito, realice la limpieza del sistema neumático del automuestreador (para lo cual prepare y monte una secuencia de 20 viales de espacio de cabeza con 1 mL de agua desionizada y tres con aire, con el método denominado "Limpieza" en el cromatógrafo correspondiente ,</p>

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 16 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

		trabajo no se evidencie arrastre de un analito.	ver anexo 4) y verifique que no se obtiene señal del analito montando una nueva secuencia de verificación.  - Si los blancos persisten contaminados realice un estudio de causa efecto para detectar la causa asignable y tratar de eliminarla o minimizarla al máximo para evitar una nueva desviación.
3	Controles que se utilizan durante un análisis en serie de muestras para verificar la vigencia de la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo). Para la valoración de este tipo de control se utiliza la concentración calculada individual de cada vial analizado.	Etanol: Si la concentración del control es >1,00 g/L el sesgo relativo debe ser <5%. Si la concentración del control es <1,00 g/L el sesgo absoluto debe ser <0,05 g/L.  Otros analitos: el sesgo relativo debe ser <15% (En el LC <20%)	- En una secuencia de muestras, si un control se encuentra fuera de los parámetros establecidos debe repetirse el análisis del grupo de muestras que el control encerraba y validaba. Además, repita el análisis del nivel que falló y si el problema persiste realice un estudio de causa efecto para detectar la causa asignable y tratar de eliminarla o minimizarla al máximo para evitar una nueva desviación. Para esto deben revisarse aspectos como el funcionamiento del dilutor, funcionamiento del cromatógrafo de gases, la presencia de hongos o turbidez de los controles, fecha de preparación de los controles, etc. Una vez identificado y corregido el problema debe valorarse realizar una nueva curva de calibración y/o repetirse el análisis de todos los niveles del control para verificar el buen funcionamiento tanto del dilutor como del cromatógrafo de gases.

### 8.3 Muestras

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Identificación cualitativa de un analito	- Que se detecte la presencia del analito y del estándar interno en ambas réplicas de la muestra  - Que el valor de tiempo de retención absoluto para los analitos en la muestra no difiera en más de 2% con respecto al tiempo promedio de estos en los controles respectivos utilizados o que el valor de tiempo de retención	- Si el estándar interno no está presente en ambas réplicas de una muestra, el análisis de esta muestra tiene que repetirse.  - Si el estándar interno solo está presente en una de las réplicas y en ambas réplicas no se detecta el analito, puede reportarse el caso como no se detectó por dicho analito.  - Si el estándar interno solo está presente en una de las réplicas y se

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 17 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

		relativo o índice de retención para los analitos en la muestra, no difiera en más de 1 % con respecto al índice de retención promedio de estos en los controles respectivos utilizados.	detecta la presencia de analito en alguna de las réplicas, debe repetirse el análisis.
2	Variabilidad en la cuantificación de las réplicas de una muestra de sangre total, suero y orina.	Etanol: Si la concentración es >1,00 g/L la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 5%. Si la concentración es <1,00 g/L la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 0,05 g/L.  Otros analitos: la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 20%.	Si una muestra presenta una variación mayor a los parámetros establecidos, se debe realizar de nuevo el montaje de la muestra. Si en el segundo montaje vuelve a obtenerse variaciones mayores a lo establecido, se debe buscar otro tubo de la misma muestra, para realizar el montaje. Si aún persisten valores mayores a lo establecido o si no se tiene más tubos de la misma muestra para repetir, debe reportarse el valor de la primera medición realizada indicando en el Dictamen Criminalístico que la muestra presentaba una variabilidad mayor a lo normal.
3	Variabilidad en la cuantificación de las réplicas de una muestra de humor vítreo	Etanol: la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 10%.  Otros analitos: la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 20%.	Si una muestra presenta una variación mayor a los parámetros establecidos, se debe realizar una centrifugación de la muestra (Centrifugue aproximadamente a 9000 rpm por 6 min a 15°C) y realizar de nuevo el montaje de la muestra. Si en el segundo montaje vuelve a dar mayor a lo establecido, debe reportarse el valor de la primera medición realizada indicando en el Dictamen Criminalístico que la muestra presentaba una variabilidad mayor a lo normal.
4	Variabilidad en el valor de área del estándar interno de una muestra	El valor de área del estándar interno de una muestra no debe presentar una variación mayor al 50% del valor promedio de área del estándar interno de los calibradores.	Si el valor no cumple el parámetro establecido respecto al estándar interno en una muestra, el análisis de esa muestra debe repetirse. Si vuelve a ocurrir debe reportarse la muestra como insatisfactoria.
5	Variabilidad en la cuantificación de las réplicas de una muestra de coágulo o músculo	Etanol y otros analitos: la variación entre las réplicas respecto al promedio calculado debe ser menor a 20%.	Si una muestra presenta una variación mayor a los parámetros establecidos, se debe realizar de nuevo el montaje de la muestra. Si en el segundo montaje vuelve a dar mayor a lo establecido, debe reportarse el valor de las mediciones indicando en el Dictamen

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 18 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

		Criminalístico que la muestra presentaba una variabilidad mayor a lo normal.
--	--	--

#### 8.4 Estimación de la etapa cinética y estimación retrospectiva de etanol

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Etapa cinética de etanol identificada como absorción:	- Que se detecte una concentración de etanol en la primera muestra de sangre o aliento menor a la concentración de etanol detectada en la segunda muestra de sangre o aliento	- Si la persona se encuentra en una etapa cinética identificada como absorción, no debe realizar la estimación retrospectiva de etanol y debe indicarlo en el dictamen.
2	Etapa cinética de etanol identificada como eliminación:	- Que el valor de eliminación de etanol se encuentre:  Para sangre entre: 0,10 g/L/h y 0,70 g/L/h  Para aliento entre: 0,0476 mg/L/h y 0,333 mg/L/h	- Solo si la persona se encuentra en una etapa cinética identificada como eliminación es posible realizar la estimación retrospectiva de etanol.
3	Etapa cinética de etanol identificada como "eliminación alta":	- Que el valor de eliminación de etanol se encuentre:  Para sangre mayor a: 0,70 g/L/h  Para aliento mayor a: 0,333 mg/L/h	- Si la persona se encuentra en una etapa cinética identificada como "eliminación alta", no debe realizar la estimación retrospectiva de etanol y debe indicarlo en el dictamen.
4	Etapa cinética de etanol identificada como "indefinida o mixta":	- Que el valor de eliminación de etanol se encuentre:  Para sangre menor a: 0,10 g/L/h  Para aliento menor a: 0,0476 mg/L/h	- Si la persona se encuentra en una etapa cinética identificada como "indefinida o mixta", no debe realizar la estimación retrospectiva de etanol y debe indicarlo en el dictamen.

#### 9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

Nota 4: La cuantificación de analitos volátiles en los controles y en las muestras de origen biológico se realiza por medio de un ajuste de calibración doblemente ponderado. La estimación ponderada de los parámetros de la curva de calibración de la hoja de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres" se realiza utilizando las fórmulas de mínimos cuadrados ponderados mostradas en el anexo 7 y referenciadas en 3.8 y 3.9.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 19 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

### 9.1 Cálculos de controles:

**9.1.1** Realice los cálculos de los controles analizados junto con una curva de calibración para verificar su exactitud o los controles utilizados para verificar las corridas de análisis en serie de muestras de etanol y congéneres en la hoja de cálculo de la curva de calibración creada en el punto 7.3.11 de este procedimiento, de acuerdo con los siguientes pasos:

**9.1.1.1** Una vez obtenidos los datos de las réplicas de los controles analizados, introduzca los valores de área del analito y del estándar interno de cada réplica según corresponda entre las hojas denominadas "Replica 1" a "Réplica 110" de la hoja de cálculo correspondiente.

**9.1.1.2** Introduzca en la hoja de reporte de controles de los casos de etanol y congéneres ("Controles") los datos de identificación de los controles analizados: tipo de control, casa comercial, número de catálogo, lote o fecha de preparación, fecha de análisis, iniciales del funcionario encargado de realizar el análisis, iniciales del funcionario encargado de realizar el cálculo.

**9.1.1.3** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte de cada control de la hoja respectiva de la hoja de cálculo de la curva correspondiente: el Formulario "Cuantificación y reporte de controles" de la hoja "Controles" en el caso de etanol y congéneres; y el Formulario "Cuantificación y reporte de controles (otros volátiles)" de la hoja "Reporte controles" en el caso de otros volátiles.

### 9.2 Cálculos de muestras reales:

**9.2.1** Realice los cálculos de las muestras analizadas en el análisis en serie en la hoja de cálculo de la curva de calibración vigente, creada en el punto 7.3.11 de este procedimiento (ver anexos 03 y 05) de acuerdo con los siguientes pasos:

**9.2.1.1** Una vez obtenidos los datos de las réplicas de las muestras analizadas, introduzca los valores de área del analito y del estándar interno de cada réplica según corresponda entre las hojas denominadas "Replica 1" a "Réplica 110" de la hoja de cálculo.

**9.2.1.2** Introduzca en las hojas de reporte de los casos de etanol y congéneres ("Reporte Ley de tránsito" en los casos de Ley de Tránsito con dos muestras de sangre de horas diferentes o "Reporte 1 muestra" en los demás casos), de la hoja de cálculo respectiva los siguientes datos: tipo de muestra, tipo de tubo (respecto al color del tapón: gris, morado o rojo), número de DCF del caso, número de objeto analizado, fecha de análisis, iniciales del funcionario encargado de realizar el análisis, iniciales del funcionario encargado de realizar el cálculo.

**9.2.1.3** Si el caso es de Ley de Tránsito y requiere cálculo de eliminación o cálculo retrospectivo, introduzca además los valores de fecha y hora de toma de las muestras, fecha y hora del hecho, concentración de etanol obtenida por análisis de alcohol en aliento.

**9.2.1.4** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte de cada caso de la hoja respectiva de la hoja de cálculo de la curva de calibración de la fecha del análisis en serie: el Formulario "Cuantificación y estimación de la incertidumbre (reporte ley de tránsito) de la hoja "Reporte Ley de tránsito", el Formulario "Cuantificación y estimación de la incertidumbre (reporte una muestra)" de la hoja "Reporte 1 muestra", el Formulario "Cuantificación y estimación de la incertidumbre (reporte muestras otros volátiles)" de la hoja "Reporte muestras".

**9.2.1.5** Verifique que la variación de las réplicas de las muestras analizadas se acepta de acuerdo con los criterios expuestos en el punto 8.3 de este procedimiento, sino aplique la corrección indicada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 20 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

- 9.2.1.6** Si el caso requiere cálculo de eliminación o cálculo retrospectivo, imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario "Eliminación y estimación retrospectiva de etanol" de la hoja denominada "Eliminación y retrospectivo" de la hoja de cálculo de la curva respectiva.
- 9.2.1.7** Si el caso presenta un resultado positivo por etanol en humor vítreo, imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario "Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo" de la hoja denominada "Estimación con humor vítreo" de la hoja de cálculo de la curva respectiva.
- 9.2.2** Para casos (ejemplo: ampliaciones u otros) donde los cálculos (estimación de la tasa de eliminación de alcohol, estimación retrospectiva del nivel de alcohol, estimación de consumo de alcohol o del nivel máximo de alcoholemia a partir de un consumo), no se realizaron junto con los cálculos del proceso de análisis de muestras, realice los cálculos utilizando la Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo" de acuerdo con los siguientes pasos:
- 9.2.2.1** Para estimaciones de la tasa de eliminación de alcohol o estimación retrospectiva del nivel de alcohol, introduzca en la hoja "Eliminación, retrospectivo" de la Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo" los siguientes datos: número de DCF del caso, número de objeto de las muestras analizadas, fecha y hora de toma de las muestras, tipo de tubo (respecto al color del tapón: gris, morado o rojo), valor promedio de alcohol en sangre en g/L de cada muestra analizada, valor mínimo y máximo de alcohol en sangre en g/L de la primera muestra de sangre, valor correspondiente de alcohol en sangre en g/L a partir del resultado de alcohol en aliento cercano al hecho (si se aporta) y fecha y hora del hecho (accidente, detención, etc).
- 9.2.2.2** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario "Eliminación y estimación retrospectiva de etanol" de la hoja denominada "Eliminación y retrospectivo" de la hoja de cálculo.
- 9.2.2.3** Para estimaciones de consumo de alcohol o del nivel máximo de alcoholemia a partir de un consumo, introduzca en la hoja "Consumo" de la Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo" los siguientes datos: número de DCF del caso, nombre o autopsia, sexo, peso y altura de la persona, valor de la alcoholemia en g/L o consumo en gramos de alcohol.
- 9.2.2.4** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario "Cálculo de alcoholemia y cantidad total de alcohol en el organismo" de la hoja denominada "Consumo" de la hoja de cálculo.
- 9.2.3** Para casos donde se soliciten cálculos de estimación de la tasa de eliminación de alcohol en aliento o estimación retrospectiva del nivel de alcohol en aliento a partir de resultados de pruebas de alcohol en aliento, realice los cálculos utilizando la Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo alcohol en aliento" de acuerdo con los siguientes pasos:
- 9.2.3.1** Introduzca en la hoja "Eliminación y retrospectivo" de la Hoja de cálculo "Eliminación, retrospectivo y consumo alcohol en aliento" los siguientes datos: número de DCF del caso, fecha y hora de las pruebas de alcohol en aliento, valor de alcohol en aliento en mg/L de cada prueba y fecha y hora del hecho (accidente, detención, etc).
- 9.2.3.2** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario "Eliminación y estimación retrospectiva con pruebas de alcohol en aliento" de la hoja denominada "Eliminación y retrospectivo" de la hoja de cálculo.
- 9.2.4** Para casos (ejemplo: ampliaciones u otros) donde los cálculos de la estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo, no se realizaron junto con los cálculos del proceso de análisis de muestras, realice los cálculos utilizando la Hoja de cálculo

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 21 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

“Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo” de acuerdo con los siguientes pasos:

- 9.2.4.1** Introduzca en la “Hoja1” de la Hoja de cálculo “Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo” los siguientes datos: número de DCF del caso y el valor promedio de alcohol en g/L de la muestra de humor vítreo analizada.
- 9.2.4.2** Imprima o guarde en PDF u otro formato electrónico el registro del formulario de reporte Formulario “Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo” de la hoja de cálculo.

### 9.3 Evaluación de la incertidumbre:

Para la evaluación de la incertidumbre de esta metodología se siguen los lineamientos establecidos en el “Procedimiento Para la Estimación de incertidumbre de los análisis forenses” tal como lo muestra el ejemplo del anexo 7.

La hoja de cálculo “Machote curva de calibración de etanol y congéneres” realiza la estimación de las incertidumbres expandidas de la forma numérica y la forma tradicional de la GUM ejemplificadas en el anexo 7.

En la cuantificación de etanol en matrices líquidas las incertidumbres expandidas obtenidas por la hoja de cálculo corresponden al intervalo con  $k=3,29$   $p=0,999$  normal. En la cuantificación de los congéneres en matrices líquidas las incertidumbres expandidas obtenidas por la hoja de cálculo corresponden al intervalo con  $k=2$   $p=0,9545$  normal. En la cuantificación de etanol y congéneres en matrices sólidas las incertidumbres expandidas obtenidas por la hoja de cálculo corresponden al intervalo con  $k=1,653$   $p=0,9545$  rectangular.

### 10 Reporte de Análisis y Resultados:

- 10.1** Para el reporte de los resultados, tome en cuenta los criterios generales para la identificación y reporte de sustancias indicados en el PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 10.2** En los casos con resultados positivos, no se detectó o muestras putrefactas reporte como tal los resultados en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico tomando en cuenta los siguientes aspectos.
- 10.3** En las muestras líquidas reporte los resultados de las concentraciones detectadas de los diferentes analitos volátiles de forma cuantitativa en g/L. En el caso de muestras sólidas (tipo coágulo o músculo), reporte los resultados de las concentraciones detectadas de los diferentes analitos volátiles de forma cuantitativa en g/kg.
- 10.4** Reporte un resultado como positivo para un analito volátil cuando la concentración calculada supera los límites de decisión establecidos en el siguiente cuadro:

Tipo de analito	Límite de decisión (g/L o g/Kg)	
	Muestras postmortem	Muestras personas vivas
Etanol	0,20	0,10
Congéneres: acetona; isopropanol y metanol	0,10	0,10

- 10.5** Reporte los resultados cuantitativos y su incertidumbre asociada como lo indica el apartado “Reporte de resultados del PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 22 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

**10.6** Si una muestra cuantificada da como resultado un valor mayor al LCS del método, reporte el valor en el dictamen como mayor al LCS. Por ejemplo, si un valor cuantificado de etanol es 5,70 g/L, debe reportarse como mayor a 5,00 g/L.

### 11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- Las muestras deben manipularse con todos los cuidados que requieren las muestras de origen biológico. Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.
- Los tubos con muestras deben transportarse dentro del laboratorio en las gradillas destinadas para este uso.
- Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lávese las manos y deje la gabacha en la entrada de este.
- No abra ningún recipiente con disolventes volátiles fuera de la capilla de extracción de gases.
- Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bio-infeccioso al Jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.
- Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.
- Si ocurre algún derrame importante de disolventes o ácido en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.

### 12 Simbología:

CV% : Coeficiente de variación porcentual

DCF : Departamento de Ciencias Forenses

HS/GC/FID/FID : Cromatografía de gases con espacio de cabeza (head-space) y doble columna y doble detector de ionización de llama

g : Gramos

GC : Cromatografía de gases

g/kg : Gramos por kilogramo

g/L : Gramos por litro

g/L/h : Gramos por litro por hora

GUM : Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida

L : Litro

LC : Límite de cuantificación

LCS : Límite de cuantificación superior

mg/L/h : Miligramos por litro por hora

mL : Mililitro

mm : Milímetro

N/A : No aplica

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 23 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

O.I.J : Organismo de Investigación Judicial  
OQ/PV : Calificación Operacional/Verificación de Rendimiento  
PDF : Formato de Documento Portable  
PON : Procedimiento de Operación Normado  
RAS : Registro de análisis en serie  
rpm : Revoluciones por minuto  
SADCF : Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses  
SCD : Solicitud de cambio documental  
SGC : Sistema de Gestión de Calidad  
TA : Temperatura Ambiente  
TLF : Técnico Laboratorista Forense  
UGC : Unidad de Gestión de Calidad  
uL : Microlitro

### 13 Terminología:

N/A

### 14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos y ejemplos de preparación de disoluciones calibrador y control de analitos volátiles
2	Condiciones de los métodos del dilutor según analito
3	Distribución de métodos cromatográficos, hojas de cálculo, base de datos y archivos según analitos, uso, equipos, ubicaciones en computadora de equipo y servidores.
4	Condiciones de los métodos cromatográficos según analito y cromatógrafo
5	Ejemplos de hojas que componen la hoja de cálculo: "Machote curva de calibración de etanol y congéneres"
6	Fórmulas de regresión y ponderación utilizadas en las hojas de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres" y "Machote curva de calibración de otros volátiles"
7	Ejemplo de estimación de incertidumbre en el análisis de etanol en sangre
8	Ejemplo de esquema de orden de viales de muestras y controles en secuencias de análisis

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 24 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

## ANEXO NÚMERO 1

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y EJEMPLOS DE PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES CALIBRADOR Y CONTROL DE ANALITOS VOLÁTILES

#### Preparación de la disolución de cloro al 0,5%:

1. Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.
2. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro al 0,5%, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

despejando se obtiene:  $(V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$

donde:

(Cd): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V)= Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

3. Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente(V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro al 0,5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL).
4. Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua desionizada necesario para completar el volumen de la disolución de cloro al 0,5% deseado.
5. Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de cloro al 0,5%" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara.
6. Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 1 mes.

Ejemplo: en el siguiente cuadro se presentan ejemplos de algunos volúmenes y concentraciones utilizadas en la preparación de una disolución de cloro al 0,5%:

Concentración deseada	Volumen de la disolución de la concentración deseada	Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada	Volumen de la disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente	Volumen necesario agregar de agua destilada para completar el volumen de la disolución de cloro deseada
(Cd: %)	(Vd: mL)	(Cc: %)	(V: mL)	(mL)
0,5	500	12	21	479
0,5	1000	12	42	958
0,5	500	10	25	475
0,5	1000	10	50	950

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 25 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

**Preparación de la disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5% a 1%:**

1. Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.
2. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro para lavado de aproximadamente 0,5% a 1%, utilizando la siguiente fórmula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

despejando se obtiene:  $(V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$

donde:

(Cd): Concentración deseada, aproximadamente 0,5% a 1%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V): Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

3. Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente (V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5% a 1% (ejemplo: el recipiente puede ser una tina plástica para lavado de 30 L de volumen aproximado, Vd= 30000mL).
4. Adicione agua de grifo hasta aproximadamente la mitad del volumen del recipiente utilizado para contener la disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5% a 1% deseado. En el caso del recipiente plástico para desechos líquidos del dilutor de 1 L o similar adicione agua hasta un cuarto del volumen del recipiente.
5. Prepare esta disolución inmediatamente antes de usar y descártela después de ser utilizada.

Ejemplo: en el siguiente cuadro se presentan ejemplos de algunos volúmenes y concentraciones utilizadas en la preparación de una disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5% a 1%:

Concentración deseada aproximada (Cd: %)	Volumen de la disolución de la concentración deseada (Vd: mL)	Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada (Cc: %)	Volumen de la disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente (V: mL)
0,5	20000	12	750
0,5	30000	12	1250
0,5	20000	10	1000
0,5	30000	10	1500
0,5	2500	12	100
0,5	2500	10	125
0,5	1000	12	42
0,5	1000	10	50

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 26 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

**Preparación de la disolución de estándar interno para etanol y congéneres, n-propanol 0,20 g/L:**

1. Agregue agua desionizada hasta la marca de 24 L del garrafón con llave de dispensado de 50 L utilizado para la preparación de estándar interno.
2. Adicione 6 mL de n-propanol con ayuda de un equipo volumétrico adecuado al volumen a medir.
3. Agite el garrafón manualmente.
4. Con ayuda de la llave de dispensado, trasvase la disolución a botellas plásticas de 125 mL, 250 mL o 500 mL. Tápelas, identifique la disolución y rotule.
5. Almacene en refrigeración (0 a 10°C) hasta su uso. Esta disolución es estable al menos por 6 meses.

**Preparación de disoluciones de un analito volátil o mezclas de analitos volátiles a partir de material de referencia líquido y de pureza conocida**

1. Utilice la siguiente fórmula para calcular los volúmenes necesarios, de un analito o de los diferentes analitos de una mezcla, para preparar una disolución.

$$C_f = \frac{d \times (p/100) \times V_i \times 1000}{V_f}$$

Donde:

C<sub>f</sub> = Concentración final del analito volátil en g/L en la disolución

d = Densidad del material de referencia del analito volátil en kg/L

p = Porcentaje de pureza del material de referencia

V<sub>i</sub> = Volumen agregado del material de referencia del analito volátil

V<sub>f</sub> = Volumen final de la disolución

1. Agregue el disolvente requerido para el analito o grupo de analitos (para etanol y congéneres utilice agua desionizada), a un balón aforado con capacidad igual al volumen (V<sub>f</sub>) requerido de la disolución madre (por ejemplo: 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL u otro), agregue como mínimo la mitad de la capacidad del balón.
2. Utilizando un equipo volumétrico adecuado al volumen a medir, agregue el volumen necesario del material de referencia (V<sub>i</sub>) del analito o grupo de analitos al balón aforado.
3. Afore con el disolvente requerido para el analito o grupo de analitos.
4. Si la disolución preparada es una disolución madre que se utilizara en la preparación de otras disoluciones, no se almacena, se prepara en el momento que se van a utilizar y el sobrante se descarta.
5. En el caso que la disolución preparada sea un nivel de control de etanol y congéneres, trasvase inmediatamente el control preparado a viales de plástico con tapa con capacidad de 1,5 mL o similar, llénelos totalmente y tápelos. Almacene los controles en refrigeración (0 a 10 °C). Estas disoluciones son estables al menos por 3 meses.
6. En el caso que la disolución preparada sea un nivel de una curva de calibración, no se almacena, se prepara en el momento que se va a utilizar y el sobrante se descarta.
7. Si las disoluciones preparadas son niveles de una curva de calibración, utilice un orden aleatorio de preparación (no en forma ascendente o descendente), por ejemplo, para una curva de 7 niveles utilice el siguiente orden 1, 7, 4, 2, 6, 3 y 5.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 27 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

**Preparación de disoluciones de un analito volátil o mezclas de analitos volátiles (intermedias, de trabajo, niveles de curva de calibración o niveles de control) a partir de una disolución inicial preparada y de concentración conocida**

1. Utilice la siguiente fórmula para calcular los volúmenes necesarios de una disolución inicial de un analito o mezcla de analitos de concentración conocida, para preparar una disolución final de concentración y volumen determinada.

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

Donde:

$C_f$  = Concentración final del analito volátil en g/L en la disolución preparada

$V_f$  = Volumen final de la disolución preparada del analito volátil

$C_i$  = Concentración del analito volátil en g/L en la disolución inicial

$V_i$  = Volumen agregado de la disolución inicial del material de referencia del analito volátil

8. Agregue el disolvente requerido para el analito o grupo de analitos (para etanol y congéneres utilice agua desionizada), a un balón aforado con capacidad igual al volumen ( $V_f$ ) requerido de la disolución madre (por ejemplo: 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL u otro), agregue como mínimo la mitad de la capacidad del balón.
9. Utilizando un equipo volumétrico adecuado al volumen a medir, agregue el volumen necesario del material de referencia ( $V_i$ ) del analito o grupo de analitos al balón aforado.
10. Afore con el disolvente requerido para el analito o grupo de analitos.
11. En el caso que la disolución preparada sea una disolución intermedia o de trabajo, normalmente no se almacena, prepare en el momento que se va a utilizar y el sobrante se descarta.
12. En el caso que la disolución preparada sea un nivel de control de etanol y congéneres:
  - Trasvase inmediatamente el control preparado a viales de plástico con tapa con capacidad de 1,5 mL o similar, llénelos totalmente y tápelos. Almacene los controles en refrigeración (0 a 10 °C). Estas disoluciones son estables al menos por 3 meses.
13. En el caso que la disolución preparada sea un nivel de una curva de calibración, no se almacena, se prepara en el momento que se va a utilizar y el sobrante se descarta.
14. Si las disoluciones preparadas son niveles de una curva de calibración, utilice un orden aleatorio de preparación (no en forma ascendente o descendente), por ejemplo, para una curva de 7 niveles utilice el siguiente orden 1, 7, 4, 2, 6, 3 y 5.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 28 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

## ANEXO NÚMERO 2

### Condiciones de los métodos del dilutor según analito

Método del dilutor Hamilton Microlab utilizado en el montaje de muestras, controles o calibradores para el análisis de etanol y congéneres: "ETANOL"

	Auto	Jeringa izquierda 500 uL			Jeringa derecha 100 uL			Tipo de sustancia o destino	
		Ret	Vol--	IZQ--	Vel	Vol--	DERE--		Vel
1	S		Lle	450	1			Estándar interno	
2	S					Asp	50	1	Aire
3						Asp	50	1	Muestra
4			Sur	450	1	Sur	100	1	Vial espacio de cabeza
5	S		Lle	500	1				Estándar interno
6			Sur	500	1				Desecho
7	S		Lle	500	1				Estándar interno
8	S		Sur	500	1				Desecho

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 29 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

### ANEXO NÚMERO 3

**Distribución de métodos cromatográficos, hojas de cálculo, base de datos y archivos según analitos, uso, equipos, ubicaciones en computadora de equipo y servidores.**

Nombre del método	Tipo de analito	Uso	Equipo	Ubicación en computadora del equipo
ETANOL	Etanol y congéneres	Análisis de muestras, controles y calibradores	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
DESCANSO	General	Método de reposo del equipo	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
LIMPIEZA	General	Método de limpieza del equipo	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
ETANOL	Etanol y congéneres	Análisis de muestras, controles y calibradores	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
DESCANSO	General	Método de reposo del equipo	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
LIMPIEZA	General	Método de limpieza del equipo	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS

Tipo de archivo	Equipo	Ubicación en computadora del equipo
secuencia	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\SEQUENCES
datos	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\RESULTS
métodos en uso	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
Respaldo de métodos de etanol y congéneres	GC7890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS\Etanol y congéneres\Año

Tipo de archivo	Equipo	Ubicación en computadora del equipo
secuencia	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\SEQUENCES
datos	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\RESULTS
métodos en uso	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS
Respaldo de métodos de etanol y congéneres	GC8890	C:\CDSProjects\ETANOL\METHODS\Etanol y congéneres\Año

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 30 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

Tipo de archivo	Uso	Ubicación en servidor de toxicología
Hoja de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres", versión actualizada	Sirve de machote para generar curvas de calibración en uso de etanol y congéneres, guardada con la fecha de calibración	H:\reporte\ETANOL\Curvas de calibración\CURVAS EN USO\
Archivos de la curva de etanol y congéneres guardadas por fecha de calibración y vigente	Generar cálculos de controles y muestras de las secuencias de análisis	H:\reporte\ETANOL\Curvas de calibración\CURVAS EN USO\ y en Computadoras de los equipos GC7890 y GC8890 C:\CDSProjects\ETANOL\RESULTS\En cálculo\
Archivo del Registro "Orden de viales con muestras y controles en la secuencia de análisis" guardado con la fecha de montaje de una secuencia en GC, con cálculos pendientes	Verificación de los procesos de cálculos de controles y muestras de las secuencias de esa fecha	H:\reporte\ETANOL\RAS\RESPALDO CALCULO DE RASES\EN CALCULO
Archivo del Registro "Orden de viales con muestras y controles en la secuencia de análisis" guardado con la fecha de montaje de una secuencia en GC, con cálculos reportados	Respaldo de archivos utilizados en verificación de los procesos de cálculos de controles y muestras de las secuencias	H:\reporte\ETANOL\RAS\RESPALDO CALCULO DE RASES\CALCULADOS\AÑO
Archivos de las curva de etanol y congéneres guardada por fecha de calibración y fuera de uso	Respaldo de las curvas de calibración fuera de uso	H:\reporte\ETANOL\Curvas de calibración\CURVAS VIEJAS\Año
Respaldo de Gráficos de control	Respaldo de información, revisión de tendencias y aceptación de controles	H:\Calidad 2.0\14. Aseg. Calidad\Gráficos de control\
Gráficos de control en uso	Revisión de tendencias y aceptación de controles	Computadoras de los equipos GC7890 y GC8890 C:\CDSProjects\ETANOL\RESULTS\En cálculo\
Archivo de la base de datos "Manejo de solicitudes y RAS" (versión actualizada)	Manejo de casos y objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis	H:\reporte\ Base datos manejo de solicitud y RASES MSR\

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 31 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## ANEXO NÚMERO 4

### Condiciones de los métodos cromatográficos según analito y cromatógrafo

#### Acquisition Method Report



#### Method Information

Last Saved As: C:\CDSProjects\ETANOL-Methods\ETANOL.amx  
 Modified: 2019-12-03 10:58:24-06:00  
 Modifier: SLS  
 Created: 2019-12-03 10:58:24-06:00  
 Creator: SLS  
 Description:  
 Version: 2019-1203-1658-24145

#### GC

Module Display Name: Agilent 8890  
 Module Type: GC  
 Order: 1

#### GC Summary

Run Time: 3 min  
 Post Run Time: 0 min

#### Oven

Equilibration Time: 0 min  
 Max Temperature: 260 °C  
 Maximum Temperature Override: Disabled  
 Slow Fan: Disabled

#### Temperature

Setpoint: On  
 (Initial): 40 °C  
 Hold Time: 3 min  
 Post Run: 40 °C

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 32 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front SS Inlet He

Mode: Split  
 Heater: On 250 °C  
 Pressure: On 24.011 psi  
 Total Flow: On 80 mL/min  
 Septum Purge Flow: On 3 mL/min  
 Pre-Run Flow Test: Off  
 Gas Saver: Off  
 Split Ratio: 10 :1  
 Split Flow: 70 mL/min  
 Liner: A Liner has not been selected.

### Column

Column Outlet Pressure: 0 psi

### Column #1

Column Information: J&W 123-9134: 2500.64531  
 DB-ALC1:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.8 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Front Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 24.011 psi  
 Flow: 7 mL/min  
 Average Velocity: 80.36 cm/sec  
 Holdup Time: 0.6222 min  
 Control Mode: Constant Flow

### Flow

Setpoint: On  
 (Initial): 7 mL/min  
 Post Run: 0.002834 mL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 33 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Column #2

Column Information: Agilent 123-9234  
 DB-ALC2:  
 Temperature Range: 20 °C—260 °C (280 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.2 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Back Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 24.011 psi  
 Flow: 7.1068 mL/min  
 Average Velocity: 80.971 cm/sec  
 Holdup Time: 0.61751 min  
 Control Mode: Constant Pressure

### Pressure

Setpoint: On  
 (Initial): 24.011 psi  
 Post Run: 0.035291 psi

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 34 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Test: Off  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5 min

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 35 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Back Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Test: Off  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5333333333 min

### Detector Evaluation

Perform Detector Evaluation Test: Off  
 Signal Selected: No Signal Selected  
 Checkout Sample: NONE

### Signals

#### Signal #1: Front Signal

Description: Front Signal  
 Details: Front Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 36 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Vial and Loop Settings:

Vial Size: 20  
Vial Shaking: OFF  
Fill Mode: Pressure  
Fill Pressure: 15 psi  
Fill Time: 0.2  
Loop Fill Mode: Custom  
Loop Ramp Rate: 20 psi/min  
Loop Final Pressure: 10 psi  
Loop Equilibration Time: 0.05

### Carrier Settings:

Carrier Control Mode: GC controls Carrier

### Advanced Settings:

Extraction Mode: Single Extraction  
Vent After Extraction: OFF  
Post Injection Purge: Default, 100 mL/min for 1 min  
Acceptable Leak Check: Default, 0.2mL/min

### Sequence Actions:

Vial Missing:: Skip  
Wrong Vial Size: Continue  
Leak Detected: Continue  
System Not Ready: Continue

### Method Properties

Instrument Technique: Gas Chromatography

### Schema version

Schema version: 2.3

### Audit Trail

Audit trail not printed

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 37 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report



### Method Information

Last Saved As: C:\CDSProjects\ETANOL-Methods\ETANOL.amx  
 Modified: 2019-12-17 14:20:45-06:00  
 Modifier: Marco Antonio Martinez Esquivel  
 Created: 2019-12-03 10:58:24-06:00  
 Creator: SLS  
 Description:  
 Version: 2019-1217-2020-45874

### GC

Module Display Name: Agilent 7890A  
 Module Type: GC  
 Order: 1

### GC Summary

Run Time: 3 min  
 Post Run Time: 0 min

### Oven

Equilibration Time: 0 min  
 Max Temperature: 260 °C  
 Maximum Temperature Override: Disabled  
 Slow Fan: Disabled

### Temperature

Setpoint: On  
 (Initial): 40 °C  
 Hold Time: 3 min  
 Post Run: 40 °C

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 38 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front SS Inlet He

Mode: Split  
 Heater: On 250 °C  
 Pressure: On 24.011 psi  
 Total Flow: On 80 mL/min  
 Septum Purge Flow: On 3 mL/min  
 Gas Saver: Off  
 Split Ratio: 10 :1  
 Split Flow: 70 mL/min  
 Liner: A Liner has not been selected.

### Column

Column Outlet Pressure: 0 psi

### Column #1

Column Information: J&W 123-9134: 2500.64531  
 DB-ALC1:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.8 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Front Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 24.011 psi  
 Flow: 7 mL/min  
 Average Velocity: 80.36 cm/sec  
 Holdup Time: 0.6222 min  
 Control Mode: Constant Flow

### Flow

Setpoint: On  
 (Initial): 7 mL/min  
 Post Run: 0.002834 mL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 39 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Column #2

Column Information: Agilent 123-9234  
 DB-ALC2:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.2 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Back Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 24.011 psi  
 Flow: 7.1068 mL/min  
 Average Velocity: 80.971 cm/sec  
 Holdup Time: 0.61751 min  
 Control Mode: Constant Pressure

### Pressure

Setpoint: On  
 (Initial): 24.011 psi  
 Post Run: 0.035291 psi

### Front Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On

### Back Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 40 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

**Acquisition Method Report**



**PCM C**

PCM C He

**Pressure**

Setpoint: On  
 (Initial): 60 psi  
 Post Run: 0 psi

Aux PCM C He

: \*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*

**Pressure**

Setpoint: Off  
 (Initial): 10 psi  
 Post Run: 0 psi

**Signals**

**Signal #1: Front Signal**

Description: Front Signal  
 Details: Front Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

**Signal #2: Back Signal**

Description: Back Signal  
 Details: Back Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

**Signal #3:**

Description: None

**Signal #4:**

Description: None

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 41 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Agilent 7697A

Module Display Name: 7697A  
Module Type: Headspace Sampler  
Order: 1

#### Temperature Settings:

Oven Temperature: 50 °C  
Loop Temperature: 50 °C  
Transfer Line Temperature: 50 °C

#### Timing Settings:

Vial Equilibration: 15.00 min  
Injection Duration: 0.15 min  
GC Cycle Time: 4.00 min

#### Vial and Loop Settings:

Vial Size: 20  
Vial Shaking: OFF  
Fill Mode: Pressure  
Fill Pressure: 15 psi  
Fill Time: 0.2  
Loop Fill Mode: Custom  
Loop Ramp Rate: 20 psi/min  
Loop Final Pressure: 10 psi  
Loop Equilibration Time: 0.05

#### Carrier Settings:

Carrier Control Mode: GC controls Carrier

#### Advanced Settings:

Extraction Mode: Single Extraction  
Vent After Extraction: OFF  
Post Injection Purge: Default, 100 mL/min for 1 min  
Acceptable Leak Check: Default, 0.2mL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 42 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

## Acquisition Method Report



### Sequence Actions:

Vial Missing::	Skip
Wrong Vial Size:	Continue
Leak Detected:	Continue
System Not Ready:	Continue

### Method Properties

Instrument Technique: Gas Chromatography

### Schema version

Schema version: 2.3

### Audit Trail

Audit trail not printed

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 43 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Method Report



Agilent Technologies

Data Analysis Method: ETANOL.pmx  
 Path: C:\CDSP\Projects\ETANOL\Methods

### Method Information

Last Saved As: C:\CDSP\Projects\ETANOL\Methods\ETANOL.pmx  
 Modified: 2020-07-22 07:39:44-06:00  
 Modifier: AQV  
 Created: 2020-01-10 16:30:51-06:00  
 Creator: SLS  
 Description: Cuantificación de etanol y congenes  
 Version: 2020-0722-1339-44071  
 Type: GC/LC Quantitative

### Method Parameters

#### Signals

##### Blank Subtraction

Blank subtraction: None  
 Used blank: Defined in sequence  
 Specific blank path:  
 Specific blank:  
 Subtract blank if data rates are different: No  
 Signal matching mode: Perform blank subtraction if signal names match

##### Signal alignment

Use delay: Yes  
 Detector: FID1  
 RT: 0.000 min  
 Delay: 0.000 min

##### Signal alignment

Use delay: Yes  
 Detector: FID2  
 RT: 0.000 min  
 Delay: 0.000 min

##### Chromatogram Smoothing

Smoothing algorithm: None  
 Number of points: 5  
 Number of passes: 1

### ChemStation integrator

#### ChemStation integrator parameters

Tangent skim mode: Standard  
 Baseline correction: Advanced  
 Front peak skim height ratio: 0.00  
 Tail peak skim height ratio: 0.00  
 Skim valley ratio: 20.00  
 Peak to valley ratio: 500.00

#### Initial timed events

Row ID	Use	Time (min)	Event	Value
1	Yes	0.000	Slope sensitivity	1
2	Yes	0.000	Peak width	0.02
3	Yes	0.000	Area reject	1
4	Yes	0.000	Height reject	1.7
5	Yes	0.000	Shoulders mode	Off
6	Yes	0.000	Area% reject	0

#### ChemStation integrator parameters FID1A

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 44 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Method Report



### Initial timed events

Row ID	Use	Time (min)	Event	Value
1	Yes	0.000	Slope sensitivity	10
2	Yes	0.000	Peak width	0.01
3	Yes	0.000	Area reject	1
4	Yes	0.000	Height reject	0.2
5	Yes	0.000	Shoulders mode	Off
6	Yes	0.000	Area% reject	0

### Timed events

Row ID	Use	Time (min)	Event	Value
1	Yes	0.000	Integration	Off
2	Yes	0.800	Integration	On

### ChemStation integrator parameters FID2B

#### Initial timed events

Row ID	Use	Time (min)	Event	Value
1	Yes	0.000	Slope sensitivity	10
2	Yes	0.000	Peak width	0.01
3	Yes	0.000	Area reject	1
4	Yes	0.000	Height reject	0.2
5	Yes	0.000	Shoulders mode	Off
6	Yes	0.000	Area% reject	0

#### Timed events

Row ID	Use	Time (min)	Event	Value
1	Yes	0.000	Integration	Off
2	Yes	0.800	Integration	On

### Compound parameters

Include ISTD Amount:	No	Is normalized:	No
Level count:	9	ISTD method:	Yes
Use time references:	No	Use relative retention time:	Yes
Norm amount:	100.0 percent	Response factor calculation mode:	Response per amount
Use individual points:	No	Concentration calculation:	Amount * Multipliers * Dil. factor
Calculate mass %:	No	Qualifier count:	2
Qualifier RT Window:	0.010 min	Qualifier response window:	20.0 percent
Response Window Type:	Relative		

## Method Report



Agilent Technologies

### Expected compounds

Row ID	Name	Exp. RT (min)	Amount unit	Concentration unit
1	metanol 1	0.977		g/L
2	metanol 2	0.987		g/L
3	etanol 1	1.246		g/L
4	etanol 2	1.253		g/L
5	acetona 2	1.391		g/L
6	isopropanol 2	1.479		g/L
7	isopropanol 1	1.530		g/L
8	acetona 1	1.860		g/L
9	n-propanol 1	2.085		g/L
10	n-propanol 2	2.207		g/L

Row ID	Multiplier	Role	Associated RRT reference	Relative retention time
1	1.00000	None	n-propanol 1	0.469
2	1.00000	None	n-propanol 2	0.447
3	1.00000	None	n-propanol 1	0.598
4	1.00000	None	n-propanol 2	0.568
5	1.00000	None	n-propanol 2	0.630
6	1.00000	None	n-propanol 2	0.670
7	1.00000	None	n-propanol 1	0.734
8	1.00000	None	n-propanol 1	0.892
9	1.00000			1.000
10	1.00000			1.000

Row ID	UV spectrum	MS reference spectrum	Sensitivity	Calibration amounts
1	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
2	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
3	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000, 5.00000
4	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000, 5.00000
5	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
6	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
7	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
8	No	No	50	0.02000, 0.05000, 0.10000, 0.25000, 0.50000, 1.00000, 2.00000, 4.00000
9	No	No	50	

**Method Report** 

Row ID	UV spectrum	MS reference spectrum	Sensitivity	Calibration amounts
10	No	No	50	
Row ID	Digits per level	Calibration curve	Manual factor	Weighting method
1	9			None
2	9			None
3	9			None
4	9			None
5	9			None
6	9			None
7	9			None
8	9			None
9	9		1.000000000	None
10	9		1.000000000	None
Row ID	Curve model	Mode	Response	Origin
1	Linear	Curve	Area	Ignore
2	Linear	Curve	Area	Ignore
3	Linear	Curve	Area	Ignore
4	Linear	Curve	Area	Ignore
5	Linear	Curve	Area	Ignore
6	Linear	Curve	Area	Ignore
7	Linear	Curve	Area	Ignore
8	Linear	Curve	Area	Ignore
9	Linear	Manual factor	Area	Include
10	Linear	Manual factor	Area	Include
Row ID	Associated ISTD	ISTD amount	Ref. correction	Curve reference
1	n-propanol 1		1.00000	
2	n-propanol 2		1.00000	
3	n-propanol 1		1.00000	
4	n-propanol 2		1.00000	
5	n-propanol 2		1.00000	
6	n-propanol 2		1.00000	
7	n-propanol 1		1.00000	
8	n-propanol 1		1.00000	
9		0.200	1.00000	
10		0.200	1.00000	
Row ID	Factor	Associated time ref.	Signal	Absolute RT window (min)
1	1.000		FID1A	0.000
2	1.000		FID2B	0.000
3	1.000		FID1A	0.000

P-DC. \_\_\_\_\_  
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

**Method Report** 

Row ID	Factor	Associated time ref.	Signal	Absolute RT window (min)
4	1.000		FID2B	0.000
5	1.000		FID2B	0.000
6	1.000		FID2B	0.000
7	1.000		FID1A	0.000
8	1.000		FID1A	0.000
9	1.000		FID1A	0.000
10	1.000		FID2B	0.000

Row ID	Relative RT window (percent)	Peak match	RT update	RT update factor (percent)
1	1.000	Closest	Never	50.000
2	1.000	Closest	Never	50.000
3	1.000	Closest	Never	50.000
4	1.000	Closest	Never	50.000
5	1.000	Closest	Never	50.000
6	1.000	Closest	Never	50.000
7	1.000	Closest	Never	50.000
8	1.000	Closest	Never	50.000
9	1.000	Closest	Never	50.000
10	1.000	Closest	Never	50.000

Row ID	Response Window Type
1	Relative
2	Relative
3	Relative
4	Relative
5	Relative
6	Relative
7	Relative
8	Relative
9	Relative
10	Relative

**System Suitability**

EP:	No	Column performance:	None
JP:	No	USP:	No
Signal to noise:	None	Noise calculation:	P2P
Use blank reference for noise:	on blank	Calculate noise before or after peak:	before peak start
Range mode for Noise Selection:	Automatic	Noise range end time:	0.60
Noise range start time:	0.50	Noise range relative end time:	0.40
Noise range relative start time:	0.00	Name:	

## Method Report

Overwrite column parameters: No  
 Particle size:  
 Length \*:  
 Diameter:  
 Dead volume:  
 Serial number:  
 Void time \*:  
 Particle size unit:  $\mu\text{m}$   
 Column length unit: m

### Custom calculations

Last imported file:  
 Created by:  
 Last modified by:  
 File version:  
 Embedded file: No  
 Creation date:  
 Last modified date:  
 Custom calculations file:

### Reporting parameters

From time:  
 From response:  
 To time:  
 To response:

### General reporting parameters

#### Reporting general parameter

Report template: Reporte etanol individual.rdl  
 Do create file: Yes  
 Do copy reports: No  
 Do print: No  
 Printer name:

#### Report file list

Row ID	Report file type
1	pdf

#### Reporting general parameter

Report template: Reporte etanol compilado.rdl  
 Do create file: Yes  
 Copy report location: Storage  
 Do print: No  
 Printer name:  
 Report copy folder: C:\CDSProjects\ETANOL\Results\En calculo

#### Report file list

Row ID	Report file type
1	pdf
2	xlsx

### Calibration curves

#### Calibration curves modification dates

Row ID	Compound	Modification date
1	acetona 1	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
2	acetona 2	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
3	etanol 1	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 49 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Method Report



Agilent Technologies

Row ID	Compound	Modification date
4	etanol 2	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
5	isopropanol 1	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
6	isopropanol 2	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
7	metanol 1	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
8	metanol 2	22-Jul-20 7:25:38 AM (GMT-06:00)
9	n-propanol 1	
10	n-propanol 2	

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 50 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report



### Method Information

Last Saved As: C:\CDSProjects\ETANOL\Methods\DESCANSO.amx  
 Modified: 2019-08-13 14:07:17-06:00  
 Modifier: ORGOMA  
 Created: 2019-08-13 13:50:50-06:00  
 Creator: ORGOMA  
 Description:  
 Version: 2019-0813-2007-17892

### GC

Module Display Name: Agilent 8890  
 Module Type: GC  
 Order: 1

### GC Summary

Run Time: 3 min  
 Post Run Time: 0 min

### Oven

Equilibration Time: 0 min  
 Max Temperature: 260 °C  
 Maximum Temperature Override: Disabled  
 Slow Fan: Disabled

### Temperature

Setpoint: On  
 (Initial): 40 °C  
 Hold Time: 3 min  
 Post Run: 40 °C

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 51 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front SS Inlet He

Mode: Split  
 Heater: On 150 °C  
 Pressure: On 7 psi  
 Total Flow: On 7.1719 mL/min  
 Septum Purge Flow: On 3 mL/min  
 Pre-Run Flow Test: Off  
 Gas Saver: On 20 After 2 min mL/min  
 Split Ratio: 2 :1  
 Split Flow: 2.7813 mL/min  
 Liner: A Liner has not been selected.

### Column

Column Outlet Pressure: 0 psi

### Column #1

Column Information: J&W 123-9134: 2500.64531  
 DB-ALC1:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.8 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Front Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 7 psi  
 Flow: 1.3906 mL/min  
 Average Velocity: 24.701 cm/sec  
 Holdup Time: 2.0242 min  
 Control Mode: Constant Flow

### Flow

Setpoint: On  
 (Initial): 1.3906 mL/min  
 Post Run: 0.0056693 mL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 52 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Column #2

Column Information: J&W 123-9234: 2500.64588  
 DB-ALC2:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.2 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Back Detector FID  
 (Initial): 40 °C  
 Pressure: 7 psi  
 Flow: 1.4119 mL/min  
 Average Velocity: 24.889 cm/sec  
 Holdup Time: 2.0089 min  
 Control Mode: Constant Pressure

### Pressure

Setpoint: On  
 (Initial): 7 psi  
 Post Run: 0.035291 psi

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 53 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 125 °C  
 H2 Flow: Off  
 Air Flow: Off  
 Makeup Flow: Off  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: Off  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Test: Off  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5 min

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 54 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Back Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 125 °C  
 H2 Flow: Off  
 Air Flow: Off  
 Makeup Flow: Off  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: Off  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Off  
 Test:  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5333333333 min

### Detector Evaluation

Perform Detector Evaluation Off  
 Test:  
 Signal Selected: No Signal Selected  
 Checkout Sample: NONE

### Signals

#### Signal #1: Front Signal

Description: Front Signal  
 Details: Front Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 55 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Signal #2: Back Signal

Description: Back Signal  
 Details: Back Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

### Signal #3:

Description: None

### Signal #4:

Description: None

### Signal #5:

Description: None

### Signal #6:

Description: None

### Signal #7:

Description: None

### Signal #8:

Description: None

### Agilent 7697A

Module Display Name: 7697A  
 Module Type: Headspace Sampler  
 Order: 1

### Temperature Settings:

Oven Temperature: OFF °C  
 Loop Temperature: OFF °C  
 Transfer Line Temperature: OFF °C

### Timing Settings:

Vial Equilibration: 15.00 min  
 Injection Duration: 0.15 min  
 GC Cycle Time: 4.00 min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 56 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Vial and Loop Settings:

Vial Size: 20  
Vial Shaking: OFF  
Fill Mode: Pressure  
Fill Pressure: 15 psi  
Fill Time: 0.2  
Loop Fill Mode: Custom  
Loop Ramp Rate: 20 psi/min  
Loop Final Pressure: 10 psi  
Loop Equilibration Time: 0.05

### Carrier Settings:

Carrier Control Mode: GC controls Carrier

### Advanced Settings:

Extraction Mode: Single Extraction  
Vent After Extraction: OFF  
Post Injection Purge: Default, 100 mL/min for 1 min  
Acceptable Leak Check: Default, 0.2mL/min

### Sequence Actions:

Vial Missing:: Skip  
Wrong Vial Size: Continue  
Leak Detected: Continue  
System Not Ready: Continue

### Method Properties

Instrument Technique: Gas Chromatography

### Schema version

Schema version: 2.3

### Audit Trail

Audit trail not printed

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 57 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report



### Method Information

Last Saved As: C:\CDSProjects\ETANOL-Methods\LIMPIEZA.amx  
 Modified: 2020-01-08 14:57:55-06:00  
 Modifier: MME  
 Created: 2020-01-08 14:57:55-06:00  
 Creator: MME  
 Description:  
 Version: 2020-0108-2057-55431

### Method Properties

Instrument Technique: Gas Chromatography

### Schema version

Schema version: 2.3

### GC

Module Display Name: Agilent 8890  
 Module Type: GC  
 Order: 1

### GC Summary

Run Time: 1.5 min  
 Post Run Time: 0 min

### Oven

Equilibration Time: 0 min  
 Max Temperature: 260 °C  
 Maximum Temperature Override: Disabled  
 Slow Fan: Disabled

### Temperature

Setpoint: On  
 (Initial): 150 °C  
 Hold Time: 1.5 min  
 Post Run: 150 °C

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 58 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Front SS Inlet He

Mode: Split  
 Heater: On 250 °C  
 Pressure: On 8.1 psi  
 Total Flow: On 403.9 mL/min  
 Septum Purge Flow: On 3 mL/min  
 Pre-Run Flow Test: Off  
 Gas Saver: Off  
 Split Ratio: 400 :1  
 Split Flow: 399.9 mL/min  
 Liner: A Liner has not been selected.

### Column

Column Outlet Pressure: 0 psi

### Column #1

Column Information: J&W 123-9134: 2500.64531  
 DB-ALC1:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.8 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Front Detector FID  
 (Initial): 150 °C  
 Pressure: 8.1 psi  
 Flow: 0.99975 mL/min  
 Average Velocity: 23.218 cm/sec  
 Holdup Time: 2.1535 min  
 Control Mode: Constant Flow

### Flow

Setpoint: On  
 (Initial): 0.99975 mL/min  
 Post Run: 0.99975 mL/min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 59 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Column #2

Column Information: J&W 123-9234: 2500.64588  
 DB-ALC2:  
 Temperature Range: -60 °C—260 °C (260 °C)  
 Dimensions: 30 m x 320 µm x 1.2 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Back Detector FID  
 (Initial): 150 °C  
 Pressure: 8.1 psi  
 Flow: 1.015 mL/min  
 Average Velocity: 23.394 cm/sec  
 Holdup Time: 2.1373 min  
 Control Mode: Constant Pressure

### Pressure

Setpoint: On  
 (Initial): 8.1 psi  
 Post Run: 0.035291 psi

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 60 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report



### Front Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Test: Off  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5 min

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 61 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Back Detector FID

Makeup: He  
 Heater: On 300 °C  
 H2 Flow: On 40 mL/min  
 Air Flow: On 400 mL/min  
 Makeup Flow: On 25 mL/min  
 Carrier Gas Flow Correction: Constant Makeup and Fuel Flow  
 Flame: On  
 Blank Evaluation Setpoints:  
 Perform Blank Evaluation Test: Off  
 Initial Baseline Minimum: 2 pA  
 Initial Baseline Maximum: 20 pA  
 Initial Baseline Noise: 0.3 pA  
 Final Baseline Minimum: 2 pA  
 Final Baseline Maximum: 40 pA  
 Final Baseline Noise: 0.6 pA  
 Total Peak Area: 100 pA\*sec  
 Maximum Peak Height: 3 pA  
 Time Window Start: 0 min  
 Time Window End: 0.5333333333 min

### Detector Evaluation

Perform Detector Evaluation Test: Off  
 Signal Selected: No Signal Selected  
 Checkout Sample: NONE

### Signals

#### Signal #1: Front Signal

Description: Front Signal  
 Details: Front Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 62 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Signal #2: Back Signal

Description: Back Signal  
 Details: Back Signal (FID)  
 Save: On  
 Data Rate: 20 Hz

### Signal #3:

Description: None

### Signal #4:

Description: None

### Signal #5:

Description: None

### Signal #6:

Description: None

### Signal #7:

Description: None

### Signal #8:

Description: None

### Agilent 7697A

Module Display Name: 7697A  
 Module Type: Headspace Sampler  
 Order: 1

### Temperature Settings:

Oven Temperature: 125 °C  
 Loop Temperature: 140 °C  
 Transfer Line Temperature: 150 °C

### Timing Settings:

Vial Equilibration: 7.00 min  
 Injection Duration: 0.15 min  
 GC Cycle Time: 2.50 min

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 63 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

## Acquisition Method Report

Agilent  
**OpenLAB**

### Vial and Loop Settings:

Vial Size: 20  
Vial Shaking: OFF  
Fill Mode: Pressure  
Fill Pressure: 15 psi  
Fill Time: 0.2  
Loop Fill Mode: Custom  
Loop Ramp Rate: 20 psi/min  
Loop Final Pressure: 10 psi  
Loop Equilibration Time: 0.05

### Carrier Settings:

Carrier Control Mode: GC controls Carrier

### Advanced Settings:

Extraction Mode: Single Extraction  
Vent After Extraction: OFF  
Post Injection Purge: Default, 100 mL/min for 1 min  
Acceptable Leak Check: Default, 0.2mL/min

### Sequence Actions:

Vial Missing:: Skip  
Wrong Vial Size: Continue  
Leak Detected: Continue  
System Not Ready: Continue

### Audit Trail

Audit trail not printed

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 64 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

### ANEXO NÚMERO 5

Ejemplos de hojas que componen la hoja de cálculo: "Machote curva de calibración de etanol y congéneres"

 <p><b>ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL</b>  <b>DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE CIENCIAS FORENSES</b>  <b>SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA</b></p>	
<i>Estimación del intervalo de alcohol en sangre a partir de un resultado en humor vítreo</i>	
DCF del caso: #N/D	
Datos obtenidos con: Hoja de cálculo: Machote curva de calibración de etanol y congéneres. Código: H-DCF-ECT-TOX-15, versión Nº 8.	
La literatura científica propone la siguiente fórmula para poder estimar una concentración de alcohol en sangre en g/L (CAS) a partir de una concentración de alcohol en humor vítreo en g/L (CAHV):	
$CAS = 0,0303 + (0,852 \cdot CAHV)$	
Esta estimación presenta un intervalo de incertidumbre por lo que recomiendan además de obtener el valor promedio de la estimación un intervalo de confianza al 95% de confianza, utilizando la siguiente formula:	
$\text{Intervalo de confianza al 95\%} = \pm 0,019 \cdot \sqrt{[7157272 + (CAHV - 189,7)^2]}$	
Introduzca el valor promedio obtenido de la concentración de alcohol en humor vítreo en g/L CAHV (g/L): N SD	Estimación promedio de alcohol en sangre (g/L): a
	Intervalo de confianza al 95% en sangre (g/L): a
<b>Referencias:</b> -Pounder, D.J. and Jones A.W. Post-Mortem Alcohol – Aspects of Interpretation. In Forensic Issues in Alcohol Testing. CRC Press. USA, 2008. Pág: 70. -Garriot, J. Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens. Lawyers and Judges Publishing, Inc., USA, 2009. Pág: 222.	
Código: P-DCF-ECT-TOX-023-R5 Versión Nº 1, emitida y aprobada por Jefatura de Sección	
Página 1 de 1	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 65 de 99
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	 <b>ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL</b> <b>DEPARTAMENTO DE LABORATORIOS DE CIENCIAS FORENSES</b> <b>SECCIÓN DE TOXICOLOGÍA</b> <i>CUANTIFICACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE (reporte una muestra)</i>								
2									
3									
4	<b>Análito:</b>	<b>Etanol y congéneres</b>				<b>Fecha de análisis:</b>	<b>#N/D</b>		
5	<b>Análisis / Reporte:</b>	<b>AQV</b>				<b>Equipo:</b>	<b>HS-GC-FID/FID 3 PJ725304</b>		
6									
7	<i>Datos de la muestra</i>								
8	<b>DCF:</b>	<b>#N/D</b>			<b>N.º de objeto</b>	<b>#N/D</b>			
9	<b>Tipo de muestra:</b>	<b>sangre periférica</b>			<b>Tipo de soporte:</b>	<b>tubo tapón color morado</b>			
10									
11	<b>Datos obtenidos con:</b>	<i>Hoja de cálculo: Machote curva de calibración de etanol y congéneres. Código: H-DCF-ECT-TOX-15, versión N.º 8.</i>							
12	<b>Fecha de curva:</b>								
13	0. enero 1900	ETANOL	ACETONA	ISOPROPANOL	METANOL				
14	Intercepto (b)	-0,00130	-0,0002	0,00033	0,00034				
15	Pendiente (m)	0,3205	1,4136	0,58527	0,17102				
16	Coefficiente de correlación r	0,99995	1,0000	0,99999	0,99999				
17									
18	<b>RACION (g/L) E INCERTIDUMBRE ASOCIADA</b> <i>(etanol [normal; k=3,29; p=0,999] / congéneres [normal; k=1,3])</i>								
19		<b>ETANOL</b>		<b>ACETONA</b>		<b>ISOPROPANOL</b>		<b>METANOL</b>	
20	<b>Réplicas</b>	<b>Detector 1</b>	<b>Detector 2</b>	<b>Detector 1</b>	<b>Detector 2</b>	<b>Detector 1</b>	<b>Detector 2</b>	<b>Detector 1</b>	<b>Detector 2</b>
21	área de anólito	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
22	área estándar interno	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
23	Réplica 1 (Aa/Aci)								
24	Réplica 1 (Aa/Aci)								
25	área de anólito	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
26	área estándar interno	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
27	Réplica 2 (Aa/Aci)								
28	Réplica 2 (Aa/Aci)								
29	Promedio Yo								
30	RSD%								
31	Promedio Xo	NSD		NSD		NSD		NSD	
32	u(x)								
33	<b>U(x)</b>								
34	U(x)%								
35	<b>Valor obtenido</b>	<b>NSD</b>		<b>NSD</b>		<b>NSD</b>		<b>NSD</b>	
36	<b>Intervalo obtenido</b>								
37	<b>Valor a reportar</b>	<b>NSD</b>		<b>NSD</b>		<b>NSD</b>		<b>NSD</b>	
38									
39		Criterio de aceptación de réplicas de la muestra (diferencia entre réplicas y el promedio)							
40		absoluta (g/L)	relativa (%)	absoluta (g/L)	relativa (%)	absoluta (g/L)	relativa (%)	absoluta (g/L)	relativa (%)
41	Mayor diferencia	0,0000	0,00	0,0000	0,00	0,0000	0,00	0,0000	0,00
42	<b>Valoración</b>	<b>Aceptado</b>		<b>Aceptado</b>		<b>Aceptado</b>		<b>Aceptado</b>	
43									
44	<b>Código: P-DCF-ECT-TOX-023-R2</b>								
45	<b>Versión N.º 2, emitida y aprobada por Jefatura de Sección</b>								
46	<b>Página 1 de 1</b>								
47									

DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID

P-DCF-ECT-TOX-023

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL (HS-GC-FID/FID 8890)													Fecha:	
Tipo de estándar de la curva: MRC patrón: CERILLIANT(Aqueous Alcohol Standard, Standard for Toxicological and Forensic Chemistry)														
Datos del MRC patrón		Nivel	Variable independiente (g/L)						Variable dependiente					
Código: interno / catálogo	Lote	n(x)	x <sub>i</sub>	u(x)	u(x)	u(x)%	n(y)	y <sub>i</sub>	s(y)	CV%(y)	u(y)	u(y)%	u(x)%/u(y)%	
E-19-MIX-N11/A-127-C1	FN06121803	1	1	0.1000	0.0006	0.00030	0.30	3	0.03073	0.0002405	0.78	0.000139	0.45	0.66
E-18-N2/E-056	FN03241604	2	1	0.2000	0.0007	0.00035	0.18	3	0.06213	0.0002356	0.38	0.00014	0.22	0.80
E-19-MIX-N3/E-127-C2	FN06121804	3	1	0.2500	0.0010	0.00050	0.20	3	0.07747	0.0006656	0.86	0.00038	0.50	0.40
E-18-N4/E-045	FN12181501	4	1	0.4000	0.0014	0.00070	0.18	3	0.12609	0.0001662	0.13	0.00010	0.08	2.30
E-19-MIX-N5/A-127-C3	FN06121805	5	1	0.5000	0.0028	0.00140	0.28	3	0.15663	0.0011185	0.71	0.00046	0.41	0.68
E-18-N6/E-030	FN04171701	6	1	0.8000	0.0028	0.0014	0.18	3	0.25302	0.0001864	0.07	0.00011	0.04	4.12
E-19-MIX-N7/A-127-C4	FN06121806	7	1	1.0000	0.0060	0.0030	0.30	3	0.31677	0.0016340	0.52	0.00094	0.30	1.01
E-19-MIX-N9/A-127-C5	FN06121807	8	1	2.0000	0.011	0.0055	0.28	3	0.63790	0.0011342	0.18	0.0007	0.10	2.68
E-19-MIX-N10/A-127-C6	FN06121808	9	1	4.000	0.022	0.0110	0.28	3	1.27513	0.0057814	0.45	0.0033	0.26	1.05
E-18-N11/E-053	FN08031602	10	1	5.0000	0.018	0.0090	0.18	3	1.61869	0.0003962	0.02	0.0002	0.01	12.74

**K=2, 95%:**

Datos del ajuste centrado		Datos del ajuste		Selección tipo de ponderación entre y o x,y	
Parámetro	Valor	Parámetro	valor	x,y	
m <sub>0</sub>	0.3205	Intercepto (b)	-0.00190		
s(m <sub>0</sub> )	0.0011	Pendiente (m)	0.3205		
b <sub>0</sub>	0.07899	Coefficiente de correlación (r)	0.99995		
s(b <sub>0</sub> )	0.00031	Desviación del intercepto s(b)	0.00042		
Promedio Xw	0.25	Desviación de la pendiente s(m)	0.0011		

Variedad total del método	x ≥ 0.25 g/L	x < 0.25 g/L
MRC (RMS sesgo%)	1.69	2.5
Grados de libertad efectivos (Vefec):	163	59
Datos totales utilizados:	164	60
MRC (RMS CV%)	0.91	1.44
Grados de libertad efectivos (Vefec):	98	33
Datos totales utilizados:	99	34

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETANOL (HS-GC-FID/FID 8890)											
Nivel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Repeticiones	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Concentración g/L (X)	0.10	0.20	0.25	0.40	0.50	0.80	1.00	2.00	4.00	5.00	
Área de analito (Aa)	4,4137	8,6884	10,9528	17,6382	22,3094	35,7919	44,6846	90,5756	181,2527	229,1816	
	4,8136	9,7823	12,1237	19,6985	24,7671	39,5884	49,6954	100,8372	200,6130	255,2891	
	4,2897	8,9018	10,9766	17,8735	22,0564	35,9781	45,5638	91,4128	183,4839	230,8297	
	4,8556	10,0010	12,3742	19,9254	24,8564	39,8893	50,7530	101,3821	203,7850	257,1627	
	4,4602	8,9695	11,1902	18,2720	22,4693	35,9781	45,8849	93,5971	184,2814	231,0071	
	5,0038	9,9668	12,6074	20,0180	25,1730	39,8893	50,9657	103,8862	204,5779	254,8931	
Área de estándar interno (Aei)	141,9066	142,0773	142,9252	140,8539	141,8688	141,9898	141,8145	142,8928	143,5493	142,2779	
	157,0791	156,3690	157,7343	155,6222	157,0935	156,1411	157,9025	157,3005	157,1715	157,0330	
	142,8014	144,3580	142,6219	142,5682	142,9662	142,6207	143,5365	143,8568	144,4152	142,9469	
	157,2999	158,9910	158,1571	156,9889	158,8886	157,0460	159,3671	158,7428	158,3868	158,4714	
	145,1618	144,1679	144,4800	144,2185	143,8100	142,6207	144,0885	146,9067	144,7723	142,3272	
	161,3654	158,6024	160,2653	159,2017	159,4077	157,0460	161,0464	162,0047	158,8770	157,8299	

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 67 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

### ANEXO NÚMERO 6

Fórmulas de regresión y ponderación utilizadas en las hojas de cálculo "Machote curva de calibración de etanol y congéneres", referenciadas Miller-Miller en 3.8 y Spiridonov en 3.9

Fórmulas de la regresión lineal ponderada en "y" (Miller-Miller)		
$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}}$	$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n}$	$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n}$
$m_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}$	$b_w = \bar{y}_w - m_w \bar{x}_w$	
$r = \frac{\sum_i \{w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)\}}{\sqrt{[\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2][\sum_i w_i (y_i - \bar{y}_w)^2]}}$		
$\hat{y}_i = m_w x_i + b_w$	$SRC = \sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$	
$s_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$		
$s_m = \frac{s_{(y/x)w}}{\sqrt{\sum_i w_i x_i^2 - \sum_i w_i (\bar{x}_w^2)}}$		
$s_b = s_{(y/x)w} \sqrt{\frac{\sum_i w_i x_i^2}{n(\sum_i w_i x_i^2 - \sum_i w_i (\bar{x}_w^2))}}$		

**Fórmulas de la regresión lineal ponderada en "x;y" (Spiridonov)**

$$u_{yi} = \frac{s_{yi}}{\sqrt{n_i}} \Rightarrow u_{yi}^2 = \frac{s_{yi}^2}{n}$$

$$w_i = \frac{1}{u_{yi}^2 + m^2 u_{xi}^2} / \sum_i \left( \frac{1}{u_{yi}^2 + m^2 u_{xi}^2} \right) \Rightarrow \text{ponderación en "x; y"}$$

donde  $\Rightarrow m = \text{primer estimado de la pendiente}$

$$w_i = \frac{1}{u_{yi}^2} / \sum_i \frac{1}{u_{yi}^2} \Rightarrow \text{ponderación en "y"}$$

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{\sum_i w_i} \Rightarrow \bar{x}_w = \sum_i w_i x_i$$

$$\sum_i w_i = 1$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{\sum_i w_i} \Rightarrow \bar{y}_w = \sum_i w_i y_i$$

$$m_w = \frac{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w) y_i}{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2} \quad b_w = \bar{y}_w - m_w \bar{x}_w$$

$$r = \frac{\sum_i \{w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)\}}{\sqrt{[\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2][\sum_i w_i (y_i - \bar{y}_w)^2]}}$$

$$\hat{y}_i = m_w x_i + b_w \quad SRC = \sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$$s_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$s_m = \frac{s_{(y/x)w}}{\sqrt{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}} \quad s_b = s_{(y/x)w} \sqrt{\frac{1}{\sum_i w_i} + \frac{\bar{x}_w^2}{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}}$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 69 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

## ANEXO NÚMERO 7

### Ejemplo de estimación de incertidumbre en el análisis de etanol en sangre

#### Antecedentes:

-El análisis de sustancias volátiles (etanol, metanol, isopropanol y acetona) en sangre en sangre realizado en la Sección de Toxicología, se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases con doble detector FID y con un automuestreador de head-space.

-La cuantificación se realiza por medio de una curva de calibración que cuenta con al menos 5 niveles de concentración, que se analizan al menos por triplicado en dos detectores. El análisis de las muestras se realiza por duplicado en dos detectores (4 datos base y dos promedios de interpolación).

-Los estándares o niveles de calibración son disoluciones con concentraciones certificadas (MRC) de etanol y congéneres (metanol, isopropanol y acetona). Los MRC no son alterados previo a su uso. Con ayuda de un dilutor automático se coloca un volumen de cada nivel y de una disolución de estándar interno en un vial de head-space (50 uL de cada nivel y 450 uL de la disolución de estándar interno) y se sella para su análisis en el HS-GC-FID/FID. Los estándares se montan como mínimo por triplicado para las curvas de calibración. El mismo procedimiento se utiliza para preparar las muestras de sangre, las cuales se montan por duplicado. Se reporta la concentración del analito en gramos por litro (g/L) encontrada en cada muestra.

-La cuantificación de analitos volátiles en los controles y en las muestras de origen biológico se realiza por medio de un ajuste de calibración lineal doblemente ponderado.

-Ejemplo de valores de mediciones de los estándares por quintuplicado de una curva de calibración de etanol:

Cuadro I. Datos del análisis de los estándares de calibración

Nivel	Variable independiente (g/L)					Variable dependiente					
	n(x <sub>i</sub> )	x <sub>i</sub>	U(x <sub>i</sub> )	u(x <sub>i</sub> )	u(x <sub>i</sub> )%	n(y <sub>i</sub> )	y <sub>i</sub>	s(y <sub>i</sub> )	CV%(y <sub>i</sub> )	u(y <sub>i</sub> )	u(y <sub>i</sub> )%
1	1	0,1000	0,0006	0,00030	0,30	5	0,02963	0,0001020	0,34	0,000046	0,15
2	1	0,2500	0,0014	0,00070	0,28	5	0,07577	0,0005124	0,68	0,00023	0,30
3	1	0,5000	0,0028	0,0014	0,28	5	0,15337	0,0008467	0,55	0,00038	0,25
4	1	1,0000	0,0060	0,0030	0,30	5	0,30877	0,0011838	0,38	0,00053	0,17
5	1	2,0000	0,0110	0,0055	0,28	5	0,62214	0,0046446	0,75	0,0021	0,33
6	1	4,0000	0,0220	0,011	0,28	5	1,24361	0,0067721	0,54	0,0030	0,24
7	1	5,0000	0,0194	0,0097	0,19	5	1,56861	0,0069833	0,45	0,0031	0,20
			K=2; 95%								

donde:

n(x <sub>i</sub> )	número de datos del nivel de la variable x	n(y <sub>i</sub> )	número de datos del nivel de la variable y
x <sub>i</sub>	valor del nivel de la variable x	y <sub>i</sub>	valor del nivel de la variable y
U(x <sub>i</sub> )	incertidumbre expandida del valor de x	s(y <sub>i</sub> )	desviación estandar del valor de y
u(x <sub>i</sub> )	incertidumbre combinada del valor de x	CV%(y <sub>i</sub> )	coeficiente de variación del valor de y
u(x <sub>i</sub> )%	incertidumbre porcentual del valor de x	u(y <sub>i</sub> )	incertidumbre combinada del valor de y
		u(y <sub>i</sub> )%	incertidumbre porcentual del valor de y

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 70 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

-El aseguramiento de la calidad de la medición se realiza mediante el uso de muestras de control de calidad en matriz y en agua. Estas incluyen controles en sangre en concentraciones baja, media y alta (Material de referencia: disoluciones de etanol y congéneres en matriz de sangre total humana, Medidrug Ethanol VB-plus para Toxicología Forense. Además, se utilizan MRC inalterados en concentraciones baja, media y alta (obtenidos de un proveedor diferente al de los CRM utilizados como calibradores o del mismo proveedor, pero de un número de catálogo y lote diferente). Al igual que con los MRC utilizados como calibradores, los utilizados como muestras de control de calidad no se modifican antes de su uso.

### **Proceso de estimación de incertidumbre:**

1. Definición de mensurando: Concentración de analito volátil (etanol, metanol, isopropanol y acetona) en gramos por litro ( g/L ), en muestras de sangre tomadas en tubos de capacidad variable con preservante (fluoruro de sodio) y anticoagulante (oxalato de potasio o EDTA), obtenida por la interpolación en el ajuste de calibración (obtenido con las lecturas de respuestas de 7 niveles de concentración por quintuplicado, entre 0,10 g/L y 5,00 g/L; con materiales de referencia certificados), del valor promedio de las respuestas relativas de áreas de pico cromatográfico, obtenidas por duplicado (con n-propanol como estándar interno) en el análisis con un instrumento HS-GC-FID/FID verificado (OQ-PV: Operational Qualification-Performance Verification), siguiendo el Procedimiento para la determinación cualitativa y cuantitativa de sustancias volátiles en matrices biológicas por HS-GC-FID/FID.

2. La función de medición es:

$$C_m = C_{ob} \cdot F_{mt}$$

Donde:

Cob = concentración de analito (en g/L), obtenido a partir de la interpolación en la curva

Cm = concentración de analito en la muestra de sangre en g/L

Fmt = factor por la variación total del método con valor de 1.

La función medición de Cob es:

$$C_{ob} = \frac{A_r - b_0}{m_0} + X_{wp}$$

Donde:

Ar = Área relativa = Ae/Aei

Ae = área de analito

Aei = área estándar interno

b<sub>0</sub> = intercepto de la curva de calibración del ajuste "suspendido" en el eje x

m<sub>0</sub> = pendiente de la curva de calibración del ajuste "suspendido" en el eje x

Cob = concentración de analito (en g/L), obtenido a partir de la interpolación en la curva

X<sub>wp</sub> = promedio de X ponderado utilizado en el ajuste "suspendido" en el eje x

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 71 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

La concentración de analito es interpolada de una curva de calibración de la forma  $Y = m_0(X - X_{wp}) + b_0$  que relaciona el área relativa (variable dependiente) resultante de la razón área de analito (Ae) entre área de estándar interno (Aei) con la concentración del analito de los estándares de calibración (variable independiente).

### 3. Lista de fuentes de incertidumbre:

#### A- Concentración obtenida a partir de la interpolación en la curva:

A1- El área relativa tiene falta de repetibilidad, cuantificada por la desviación estándar de la muestra compuesta de cuatro áreas relativas, las cuales corresponden a un duplicado de inyección con doble detector. (Utilizado para evaluar el efecto de la matriz del caso específico)

A2- El parámetro b (intercepto), tiene la dispersión del ajuste lineal.

A3- El parámetro m (pendiente), tiene la dispersión del ajuste lineal.

A4- Se utiliza un ajuste "suspendido" en el eje x, para no valorar la correlación de los parámetros m y b del ajuste lineal como una fuente. Tanto el parámetro b como el m tienen una dispersión relacionada con los residuales cuadrados del ajuste. Además, el parámetro b depende del número de niveles de calibración, mientras que el m además depende del intervalo de respuestas del instrumento.

#### B- Variación total del método:

B1- Reproducibilidad del proceso de medición: cuantificada por la variabilidad en la medición de las muestras control en sangre.

B2- Los estándares o niveles de la curva de calibración: evaluados con la incertidumbre del certificado para el valor de referencia utilizado.

B3- Equipo de medición de volumen (dilutor): evaluada por la tolerancia utilizada para el equipo en los procesos de verificaciones intermedias entre calibraciones.

B4- Sesgo de la medición: si el sesgo se considera dentro de control, se utilizará la incertidumbre del certificado para el valor de referencia utilizado de los controles de calidad o MRC como una incertidumbre por corrección nula.

### 4. Cuantificar la variabilidad de cada fuente:

A1- Variabilidad de las áreas relativas: se obtiene de la dispersión de un promedio de dos promedios (señal de dos detectores), la desviación estándar de los promedios de las réplicas se divide entre raíz de dos, para obtener la incertidumbre estándar del promedio de promedios con una distribución normal (ver desviación estándar e incertidumbre estándar de las réplicas de una muestra en el cuadro II. La incertidumbre estándar se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$u_{yi} = \frac{s_{yi}}{\sqrt{n_{yi}}}$$

Donde:

$s_{yi}$  = desviación estándar de las réplicas de una muestra

$n_{yi}$  = número de las réplicas de una muestra

$u_{yi}$  = incertidumbre estándar de las réplicas de una muestra

-Los valores del resultado del análisis por duplicado de una muestra de sangre utilizada como ejemplo para la estimación de su incertidumbre son los siguientes:

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 72 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

Cuadro II. Datos del análisis de una muestra

	Detector	Ae	Aei	Ae/Aei	Ar (promedios)		s	u(y)	u(y)%
Réplica 1	FID1	107,867	171,764	0,62800	0,62907	0,62936	0,00041	0,00029	0,05
	FID2	105,626	167,624	0,63014					
Replica 2	FID1	102,214	162,538	0,62886	0,62965				
	FID2	100,109	158,792	0,63044					

Donde:

$A_r$  = Área relativa =  $A_e/A_{ei}$

$A_e$  = área de analito

$A_{ei}$  = área estándar interno

$s$  = desviación estándar de las réplicas

A2 y A3- Elaboración del ajuste de calibración: la curva de calibración ponderada para la cuantificación de analito en muestras de sangre se realiza con los datos que se muestran en el cuadro I y para ello se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\text{Incertidumbre de los valores de } y \quad u_{yi} = \frac{s_{yi}}{\sqrt{n_i}} \Rightarrow u_{yi}^2 = \frac{s_{yi}^2}{n}$$

$$\text{Valor del peso (con ponderación en } x,y; \text{ donde } w=\text{al peso}) \quad w_i = \frac{1}{u_{yi}^2 + m^2 u_{xi}^2} / \sum_i \left( \frac{1}{u_{yi}^2 + m^2 u_{xi}^2} \right)$$

Donde  $m$  = primer estimado de la pendiente

$$\text{Valor de peso (con ponderación en } y; \text{ donde } w=\text{al peso}) \quad w_i = \frac{1}{u_{yi}^2} / \sum_i \frac{1}{u_{yi}^2}$$

$$\sum_i w_i = 1$$

$$\text{Valor de } X \text{ promedio ponderado } \bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{\sum_i w_i} \Rightarrow \bar{x}_w = \sum_i w_i x_i$$

$$\text{Valor de } Y \text{ promedio ponderado } \bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{\sum_i w_i} \Rightarrow \bar{y}_w = \sum_i w_i y_i$$

$$\text{Pendiente (m)} = m_w = \frac{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w) y_i}{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}$$

$$\text{Intersección (b)} = b_w = \bar{y}_w - m_w \bar{x}_w$$

$$\text{Coeficiente de correlación } r(x,y) \quad r = \frac{\sum_i \{w_i (x_i - \bar{x}_w) (y_i - \bar{y}_w)\}}{\sqrt{[\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2][\sum_i w_i (y_i - \bar{y}_w)^2]}}$$

$$\text{Valor de } y \text{ modelo } \hat{y}_i = m_w x_i + b_w$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 73 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

Suma de residuales ponderados al cuadrado (SRC):  $SRC = \sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$

Varianza de los residuales ( $V_{rw}$ ) =  $\frac{SRC}{n-2}$ , n: cantidad de datos independientes

Desvío estándar de los residuales ponderados ( $S_{RW}$ ) =  $\sqrt{V_{rw}}$

Desvío estándar del error ( $S_E$ ) =  $S_{RW}$   $s_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$

Desviación estándar de la pendiente ( $s_m$ )  $s_m = \frac{s_{(y/x)w}}{\sqrt{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}}$

Desvío estándar del intercepto ( $s_b$ )  $s_b = s_{(y/x)w} \sqrt{\frac{1}{\sum_i w_i} + \frac{\bar{x}_w^2}{\sum_i w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}}$

Las dispersiones del intercepto y de la pendiente del ajuste son sus incertidumbres estándar con una distribución normal. Los resultados de los cálculos de los parámetros de ajuste con sus incertidumbres se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro IV. Datos del ajuste de calibración suspendido o centrado en X

Datos del ajuste centrado	
Parámetro	Valor
$m_0$	0,31171
$s(m_0)$	0,00088
$b_0$	0,04181
$s(b_0)$	0,00017
Promedio $X_w$	0,1394

B1- Reproducibilidad del proceso de medición: Como estimador de la variabilidad en la medición de las muestras control en sangre se utilizó el coeficiente de variación porcentual (CV%) o desviación estándar relativa (RSD%) de 276 datos de controles en sangre (Material de referencia Medidrug) en tres niveles de concentración analizados entre setiembre de 2020 a junio de 2022.

Nivel de control	Catálogo	datos	Promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)	RSD% intradía	RSD% interdía	RSD% total
Control MRC(S) 80	ALC VB 080	80	0,796	0,011	0,51	1,33	1,43
Control MRC(S) 200	ALC VB 200	104	2,002	0,019	0,45	0,94	1,05
Control MRC(S) 400	ALC VB 400	92	4,090	0,038	0,44	0,92	1,02

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 74 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

B2- Los estándares o niveles de la curva de calibración: evaluada con la mayor incertidumbre porcentual indicada en el certificado para los niveles de la curva de calibración. Para la curva se utiliza MRC marca Cerrilliant.

Nivel	Calibrador con incertidumbre mayor					
	$x_i$	$U(x_i)$	$u(x_i)$	$u(x_i)\%$	$U(x_i)\%$	K; 95,45%
1	0,1000	0,0006	0,0003	0,30	0,60	2

B3- Equipo de medición de volumen (dilutor): evaluada por la tolerancia utilizada para el equipo en los procesos de verificaciones intermedias entre calibraciones. El dilutor utilizado es un equipo calibrado y para verificar su funcionamiento se somete a verificaciones intermedias, utilizando como criterio de aceptación las tolerancias indicadas en el manual del fabricante. Para estimar esta fuente se utiliza la tolerancia más alta para los volúmenes utilizados en el proceso.

Dilutor Hamilton series 600	
Volumen utilizado	Tolerancia %
50 uL	1,2
450 uL	1

B4- Sesgo de la medición: Como estimador del sesgo en la medición se utilizó 380 datos de controles (Material de referencia certificado LGC y Cerrilliant) en tres niveles de concentración analizados entre setiembre de 2020 a junio de 2022.

Nivel de control	datos	Certificado (g/L)	$U(k:2, 95)$	$U\%$	Promedio (g/L)	Desviación estándar	RSD%	sesgo%
Control MRC 30	109	0,3000	0,0013	0,43	0,2968	0,0037	1,25	-1,05
Control MRC 100	141	1,000	0,004	0,40	0,9985	0,0096	0,96	-0,15
Control MRC 400	130	4,0000	0,0176	0,44	4,018	0,051	1,28	0,46

5. Estimación de concentración de la muestra y su incertidumbre combinada: se realiza la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$x_0 = \frac{y_0 - b_0}{m_0} + X_{wp}$$

Donde:

$x_0$ : es el valor obtenido de etanol para la muestra de sangre a partir de la interpolación en la curva, equivale a C(g/L) en la función de medición.

$y_0$ : es el área relativa promedio del promedio de las dos réplicas en los dos detectores para la muestra.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 75 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

Sustituyendo:

$$x_0 = \left( \frac{0,62936 - 0,04181}{0,31171} \right) + 0,1394 = 2,024 \text{ g/L}$$

La incertidumbre combinada para el valor  $x_0$  interpolado, de acuerdo con la fórmula general de combinación de incertidumbre, se obtiene a partir de la expresión general:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \cdot u_i^2}$$

Específicamente, en este caso se tiene que:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\left[ \frac{1}{m} \cdot u(y_0) \right]^2 + \left[ \frac{-1}{m} \cdot u(b) \right]^2 + \left[ \frac{-(y_0 - b)}{m^2} \cdot u(m) \right]^2}$$

En la ecuación anterior el primer término corresponde al componente de incertidumbre por repetibilidad del área relativa, el segundo al componente por el parámetro del intercepto de la curva de calibración y el tercero al parámetro de la pendiente de la curva de calibración.

Sustituyendo los datos derivados de la regresión ponderada y del área relativa promedio del promedio de las dos réplicas en los dos detectores para la muestra (valor promedio y desviación estándar de la media), se tiene:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\left[ \frac{1}{0,31171} \cdot 0,00029 \right]^2 + \left[ \frac{-1}{0,31171} \cdot 0,00017 \right]^2 + \left[ \frac{-(0,62936 - 0,04181)}{0,31171^2} \cdot 0,00088 \right]^2}$$

$$u_c(x_0) = \sqrt{0,000000865 + 0,000000297 + 0,000283}$$

$$u_c(x_0) = 0,0054 \text{ g/L} \quad u_c(x_0)\% = 0,27 \%$$

La incertidumbre anterior solo contempla las fuentes por la interpolación en la curva de calibración, pero el método también tiene otras fuentes valoradas en la variación total del método. La siguiente fórmula integra todas las fuentes:

$$C_m = C_{ob} \cdot F_{mt}$$

Donde:

$C_m$  = concentración de etanol en la muestra de sangre en g/L

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01

Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 76 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

$C_{ob}$  = concentración obtenida en la interpolación en g/L

$F_{mt}$  = factor por la variación total del método con valor de 1.

Por lo que la incertidumbre combinando las incertidumbres porcentuales provenientes de la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada y de la variabilidad total del método presentaría la siguiente fórmula:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[u(C_{ob})\%]^2 + [u_c(F_{mt})\%]^2}$$

$$u_c(F_{mt})\% = \sqrt{[RSD_t\%]^2 + [u\%(calibradores)]^2 + [u\%(Dilutor)]^2 + [u\%(controles)]^2}$$

$$u_c(F_{mt})\% = \sqrt{[1,43]^2 + [0,30]^2 + [0,69]^2 + [0,22]^2}$$

$$u_c(F_{mt})\% = 1,63\%$$

Sustituyendo obtenemos:

$$u_c(C_m)\% = \sqrt{[0,27\%]^2 + [1,63\%]^2}$$

$$u_c(C_m)\% = 1,65\%$$

$$u_c(C_m) = 1,65\% \text{ de } 2,024 \text{ g/L}$$

$$u_c(C_m) = 0,034 \text{ g/L}$$

$$U(C_m) = u_c(C_m) * k = 0,033 \text{ g/L} * 3,29 = 0,11 \text{ g/L}$$

A continuación se presenta el cuadro con los resultados del cálculo numérico de la incertidumbre combinada  $u_c(C_m(g/L))$  y la expandida  $U(C_m(g/L))$ , el resumen de los aportes de las diferentes componentes de la incertidumbre de la concentración de etanol en la muestra ( $C_m$ ) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 77 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID		P-DCF-ECT-TOX-023

Variable	Variables de entrada				Resultados		residual	Cifras de redondeo	(residual) <sup>2</sup>	Cifras de redondeo	C (valor) Aporte %	
	Valor	u(variable)	máximo	mínimo	máximo	mínimo					c(valor)	Aporte %
Ar	0,629359	0,000293	0,629652	0,629066	2,025218	2,023339	9,39E-04	9	8,83E-07	20	3,21	2,98
b <sub>0</sub>	0,04181	0,00017	0,04198	0,04165	2,023748	2,024809	-5,31E-04	9	2,81E-07	20	-3,21	0,95
m <sub>0</sub>	0,31171	0,00088	0,312595	0,310831	2,018962	2,029626	-5,33E-03	9	2,84E-05	20	-6,05	96,07
(C <sub>ob</sub> )	2,0243	u (C <sub>ob</sub> )	0,0054	u% (C <sub>ob</sub> )	0,27	v eff	5	Σ: 2,96E-05				

(C <sub>m</sub> )		t de Student		z normal		Componente				
(C <sub>m</sub> )	2,024	ρ:	0,999	ρ:	0,999	Componente	Veff	u%	(u%) <sup>2</sup>	Aporte %
u (C <sub>m</sub> )	0,033	K:	3,36	K:	3,29	u% (C <sub>ob</sub> )	5	0,27	0,072	2,64
u% (C <sub>m</sub> )	1,65	U (C <sub>m</sub> )	0,11	U (C <sub>m</sub> )	0,11	u% (F <sub>mt</sub> )	134	1,63	2,663	97,36
v eff	139	U% (C <sub>m</sub> )	5,56	U% (C <sub>m</sub> )	5,44	(C <sub>m</sub> )	139	Σ: 2,74		

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes de la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra (C<sub>m</sub>) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

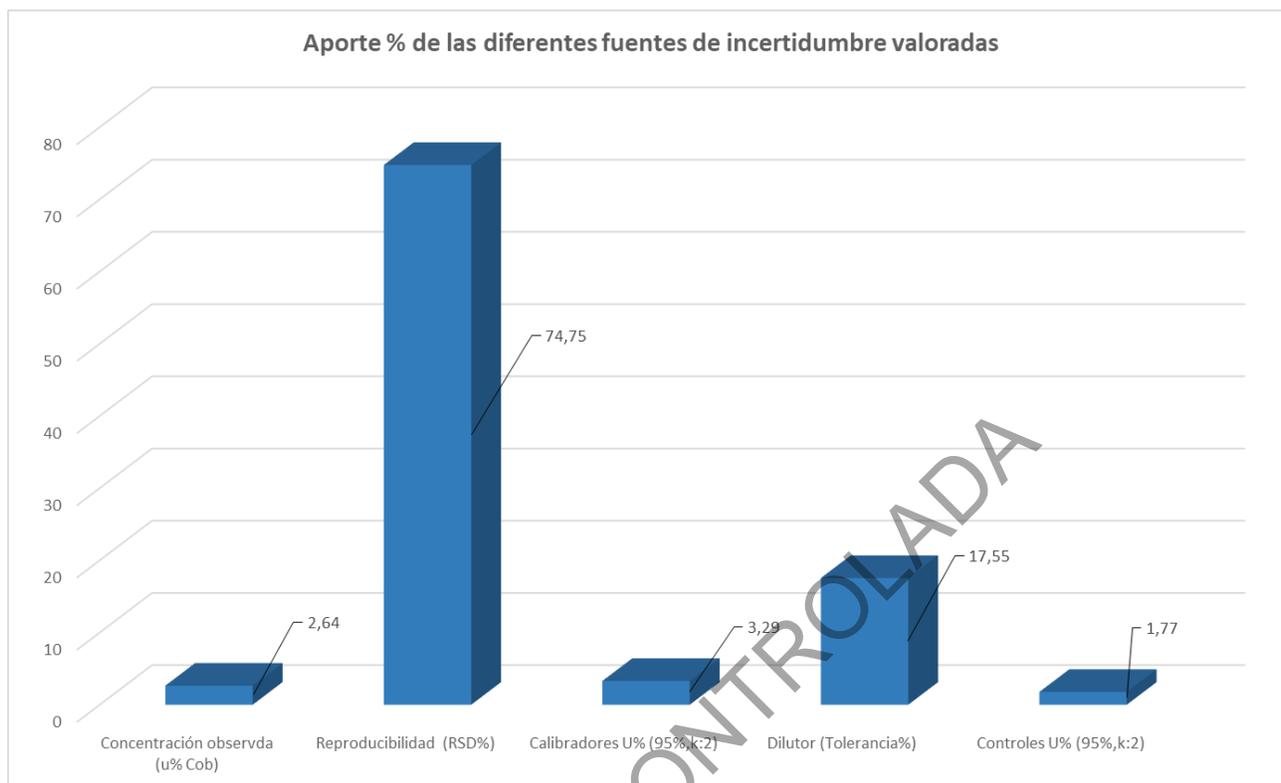
Fuente de Incertidumbre	Tipo	RSD, U o tolerancia (%)	Modelo de distribución	Divisor	Incertidumbre estándar	Veff
Concentración observada (U% Cob) (95%,k:2)	A	0,54	Normal	2	0,27	5

Fuente de Incertidumbre Fmt	Tipo	RSD, U o tolerancia (%)	Modelo de distribución	Divisor	Incertidumbre estándar	Veff	
Reproducibilidad (RSD%)	A	1,43	Normal	1	1,43	79	
Calibradores U% (95%,k:2)	B	0,6	Normal	2	0,30	10000	
Dilutor (Tolerancia%)	B	1,20	rectangular	1,73	0,69	10000	
Controles U% (95%,k:2)	B	0,44	Normal	2	0,22	10000	
					(uc%)F <sub>mt</sub>	1,63	134

Componente	Veff	u%	(u%) <sup>2</sup>	Aporte %
Concentración observada (u% Cob)	5	0,27	0,0722	2,64
Variación total del metodo (F <sub>mt</sub> )	134	1,63	2,6633	97,36
Veff (C <sub>m</sub> ): 139		Σ: 2,74		
		(uc%)C <sub>m</sub> 1,65		

Componente	Veff	u%	(u%) <sup>2</sup>	Aporte %
Concentración observada (u% Cob)	5	0,27	0,0722	2,64
Reproducibilidad (RSD%)	79	1,43	2,0449	74,75
Calibradores U% (95%,k:2)	10000	0,30	0,09	3,29
Dilutor (Tolerancia%)	10000	0,69	0,48	17,55
Controles U% (95%,k:2)	10000	0,22	0,0484	1,77
Veff (C <sub>m</sub> ): 139		Σ: 2,74		
		(uc%) <sup>2</sup> 1,65		

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 78 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	



6. Se elige para el caso en particular como probabilidad de cobertura un 0,999 (99,9%, valor elegido por el criterio de "indubio pro reo", para determinar el límite de comparación con la legislación respectiva).

7. Se cumple el teorema del límite central, por cuanto todas las fuentes de incertidumbre tienen distribuciones normales o se asumen en el tratamiento como normales (por los supuestos del análisis de regresión). Como los grados de libertad efectivos calculados con la fórmula de Welch-Satterwaite, son altos (139), se utiliza como factor de cobertura un valor z normal, correspondiente con una probabilidad de cobertura de 99,9%, el cual es 3,29.

8. Informe de la concentración y su incertidumbre:

$$C = (2,02 \pm 0,11) \text{ g/L } (k = 3,29; p = 0,999; \text{normal})$$

De acuerdo con el resultado anterior, el valor verdadero de la concentración del etanol en sangre se encontrará con una probabilidad del 99,9%, dentro del intervalo normal que está delimitado por los valores de concentración entre 1,91 g/L y 2,13 g/L, con estimador estadístico de tendencia central en 2,02 g/L.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 15	PAGINA: 79 de 79
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE SUSTANCIAS VOLÁTILES EN MATRICES BIOLÓGICAS POR HS-GC-FID/FID	P-DCF-ECT-TOX-023	

### ANEXO NÚMERO 8

Ejemplo de esquema de orden de viales de muestras y controles en secuencias de análisis

Secuencia A: verificación		Secuencia B: Esquema de montaje de muestras, blancos y controles					
Opción con tres niveles de control		Vial	Tipo de inyección	Vial	Tipo de inyección	Vial	Tipo de inyección
1	Blanco	1	Blanco	37	M32	73	M65
2	Control N1 (LA)	2	Control bajo, medio o alto	38	M33	74	M66
3	Control N5 (arrastre LCS)	3	M1	39	M34	75	M67
4	Blanco	4	M2	40	M35	76	M68
5	Control bajo	5	M3	41	M36	77	M69
6	Control medio	6	M4	42	M37	78	M70
7	Control alto	7	M5	43	M38	79	Control bajo, medio o alto
Secuencia A: verificación		8	M6	44	M39	80	M71
Opción con dos niveles de control		9	M7	45	M40	81	M72
1	Blanco	10	M8	46	Control bajo, medio o alto	82	M73
2	Control N1 (LA)	11	M9	47	M41	83	M74
3	Control N5 (arrastre LCS)	12	M10	48	M42	84	M75
4	Blanco	13	Control bajo, medio o alto	49	M43	85	M76
5	Control bajo, medio o alto	14	M11	50	M44	86	M77
6	Control bajo, medio o alto	15	M12	51	M45	87	M78
Secuencia A: verificación		16	M13	52	M46	88	M79
Opción con un nivel de control		17	M14	53	M47	89	M80
1	Blanco	18	M15	54	M48	90	Control bajo, medio o alto
2	Control N1 (LA)	19	M16	55	M49	91	M81
3	Control N5 (arrastre LCS)	20	M17	56	M50	92	M82
4	Blanco	21	M18	57	Control bajo, medio o alto	93	M83
5	Control bajo, medio o alto	22	M19	58	M51	94	M84
Secuencia A: verificación		23	M20	59	M52	95	M85
Opción con dos niveles de control		24	Control bajo, medio o alto	60	M53	96	M86
1	Blanco	25	M21	61	M54	97	M87
2	Control N1 (LA)	26	M22	62	M55	98	M88
3	Control N5 (arrastre LCS)	27	M23	63	M56	99	M89
4	Blanco	28	M24	64	M57	100	M90
5	Control bajo, medio o alto	29	M25	65	M58	101	Control bajo, medio o alto
Secuencia A: verificación		30	M26	66	M59	102	M91
Opción con un nivel de control		31	M27	67	M60	103	M92
1	Blanco	32	M28	68	Control bajo, medio o alto	104	M93
2	Control N1 (LA)	33	M29	69	M61	105	M94
3	Control N5 (arrastre LCS)	34	M30	70	M62	106	M95
4	Blanco	35	Control bajo, medio o alto	71	M63	107	Control bajo, medio o alto
5	Control bajo, medio o alto	36	M31	72	M64	108	Blanco

Nombre de control o blanco	Observaciones del control o blanco utilizado
Control N1 (LA)	Control nivel 1 de etanol y congéneres, usado de forma cualitativo para verificar la sensibilidad del equipo en el límite administrativo (LA) o de decisión del análisis
Control bajo	Control con un nivel bajo de etanol o congéneres, usado para verificar la cuantificación realizada con la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo)
Control medio	Control con un nivel medio de etanol o congéneres, usado para verificar la cuantificación realizada con la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo)
Control alto	Control con un nivel alto de etanol o congéneres, usado para verificar la cuantificación realizada con la curva de calibración y el buen funcionamiento de los equipos (dilutor y cromatógrafo)
Control N5 (arrastre LCS)	Control nivel 5 de etanol y congéneres, usado de forma cualitativo para verificar el arrastre en concentraciones del límite de cuantificación superior (LCS) o nivel más alto del ámbito de trabajo
Blanco	Blanco utilizado para evidenciar ausencia de arrastre en el equipo al inicio o al final de una secuencia de muestras (compuesto de: 50 uL agua + 450 uL estándar interno)
M1 a M95	Muestras reales de las diferentes matrices por analizar