



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Relación Entre Concentración de Monóxido de Carbono Total en Sangre y Porcentaje de Saturación de Carboxihemoglobina por Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas y Espectrofotometría UV/Vis.**

**Erica Sofía Villa Correa**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá, Colombia

2021



# **Relación entre Concentración de Monóxido de Carbono Total en Sangre y Porcentaje de Saturación de Carboxihemoglobina por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas y Espectrofotometría UV/Vis.**

**Erica Sofía Villa Correa**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Toxicología**

Directora:

MSc. Nancy Patiño Reyes

Profesor asociado

Departamento de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

PhD. Vincent Varlet.

Bioquímico Toxicólogo.

Instituto Humano Suizo de Tafonomía Forense, Lausana, Suiza.

Línea de Investigación:

Toxicología del monóxido de carbono

Grupo de Investigación:

Toxicología Analítica

Toxicología ambiental y ocupacional – TOXICAO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá D.C, Colombia

2021





Samuel

*Con amor para mi familia*



## **Agradecimientos**

Reconozco el apoyo recibido por mi directora tesis, Nancy Patiño Reyes, la Coordinadora de la Maestría en Toxicología, Alba Isabel Rodríguez Pulido y mis compañeros de estudio, Oscar David Díaz Fonseca y Karen Cristina Martínez Sierra.

Agradezco a todos mis compañeros y superiores del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, especialmente a Omar Enrique Ocampo Ariza, Quebin Mejía, Grey Correa, Aleida Ochoa, Gustavo Rodríguez, Nydia Franco, Tatiana Jiménez, Miguel Hernández, Axl Giraldo, Ricardo Parra, Andrea Bernal y Patricia Heredia.

Por último y no menos importante, doy gracias al PhD Vincent Varlet, quién desde la distancia, tuvo la mejor disposición para orientarme en este proceso.

# Resumen

## **Relación entre Concentración de Monóxido de Carbono Total en Sangre y Porcentaje de Saturación de Carboxihemoglobina por Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas y Espectrofotometría UV/Vis**

El monóxido de carbono es un gas que causa la muerte de cientos de personas en el mundo cada año. Para el diagnóstico y seguimiento de las intoxicaciones por la exposición a este agente, se usan métodos espectrofotométricos que cuantifican el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina, identificándose limitaciones por interferentes tales como coágulos, lípidos y otros derivados de la hemoglobina. Durante los últimos veinte años, se han desarrollado metodologías analíticas cromatográficas para la determinación de la concentración de monóxido de carbono en muestras de sangre de casos forenses, observándose que estos resultados son más exactos y confiables que los obtenidos por la espectrofotometría ultravioleta-visible. Recientemente, se han adelantado investigaciones con el fin de establecer la concentración de monóxido de carbono total en sangre como nuevo biomarcador y con el objeto de contribuir a la comunidad científica en su construcción, se buscó durante el presente estudio, evaluar su relación con el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina; para ello y con base en publicaciones, se desarrolló y validó un método cromatográfico, el cual se empleó en el análisis de cincuenta y dos muestras de sangre extraídas a treinta y nueve usuarios de ciclo rutas de Bogotá. A su vez, estas muestras también fueron analizadas por espectrofotometría visible. Los parámetros de desempeño del método para la “Determinación de la concentración de monóxido de carbono total” cumplen con los criterios de aceptación para la validación de metodologías bioanalíticas y al analizar los datos en la población objeto de estudio, no se encontró una relación lineal simple entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido total.

**Palabras claves:** Espectrofotometría, carboxihemoglobina, cromatografía de gases, espectrometría de masas, monóxido de carbono.



## Abstract

### **Relation between total blood carbon monoxide and carboxyhemoglobin by gas chromatography – mass spectrometry and UV/Vis spectrophotometry**

Carbon monoxide is a gas that causes the death of hundreds of people in the world every year. For the diagnosis and monitoring of poisonings from exposure to this agent, spectrophotometric methods are used that quantify the percentage of carboxyhemoglobin saturation, identifying limitations by interferences such as clots, lipids and other derivatives of hemoglobin. During the last twenty years, chromatographic analytical methodologies have been developed for the determination of the concentration of carbon monoxide in blood in forensic cases, observing that these results are more accurate and reliable than those obtained by ultraviolet-visible spectrophotometry. Recently, research has been carried out in order to establish the concentration of total carbon monoxide in blood as a new biomarker and in order to contribute to the scientific community in its construction, it was sought during the present study to evaluate its relationship with the percentage of carboxyhemoglobin saturation; For this purpose and based on publications, a chromatographic method was developed and validated, which was used in the analysis of fifty-two blood samples taken from thirty-nine cycle users of Bogotá routes. In turn, these samples were also analyzed by visible spectrophotometry. The performance parameters of the method for the “Determination of the concentration of total carbon monoxide” meet the acceptance criteria for the validation of bioanalytical methodologies and when analyzing the data in the population under study, no simple linear relationship was found between the carboxyhemoglobin saturation percentage and the total monoxide concentration.

**Keywords:** Spectrophotometry, Carboxyhemoglobin, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Carbon Monoxide.

# Tabla de Contenido

	Pág
<b>Resumen</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de Ecuaciones</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Lista de Abreviaturas y Símbolos</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Definición y Planteamiento del Problema</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Justificación</b> .....	<b>3</b>
<b>4 Pregunta de Investigación</b> .....	<b>4</b>
<b>5 Objetivos</b> .....	<b>5</b>
5.1.  Objetivo General.....	5
5.2.  Objetivos Específicos.....	5
<b>6 Antecedentes</b> .....	<b>6</b>
<b>7 Marco Teórico</b> .....	<b>7</b>
7.1.  Toxicocinética y Toxicodinamia del Monóxido de Carbono.....	7
7.2.  La Hemoglobina y sus Derivados.....	9
7.3.  Espectrofotometría UV/VIS.....	10
7.4.  Cromatografía de Gases Acoplada a Automuestreador de Volátiles <i>Headspace</i> y Espectrometría de Masas.....	13
7.4.1.  Método por GC-MS para la Determinación de Monóxido de Carbono.....	16
7.5.  El Monóxido de Carbono en Sangre como Biomarcador de Exposición en el Diagnóstico de Intoxicaciones.....	17
7.6.  Factores que Afectan la Determinación de Monóxido de Carbono en Muestras de Sangre .....	19
7.7.  Validación de Metodologías Bioanalíticas.....	20
7.7.1.  Selectividad .....	20
7.7.2.  Linealidad .....	20
7.7.3.  Límite de Detección .....	21
7.7.4.  Límite de Cuantificación .....	21
7.7.5.  Exactitud .....	21

7.7.6.	Precisión .....	21
<b>8</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>22</b>
8.1.	Tipo de Estudio.....	22
8.2.	Universo y Unidades de Análisis .....	22
8.3.	Criterios de Inclusión .....	22
8.4.	Tamaño de Muestra.....	23
8.5.	Selección de la Muestra.....	24
8.6.	Variables.....	24
8.7.	Estabilidad a Corto Plazo de la Carboxihemoglobina en Muestras de Sangre Total	26
8.8.	Método Espectrofotométrico para la Determinación de Carboxihemoglobina.....	27
8.8.1.	Condiciones del Método.....	27
8.8.2.	Equipos .....	28
8.8.3.	Instrumentos de Medición .....	28
8.8.4.	Materiales de Laboratorio .....	28
8.8.5.	Reactivos .....	28
8.8.6.	Soluciones de Cooximetría .....	28
8.8.7.	Preparación de Soluciones .....	29
8.8.8.	Muestras y Soluciones de Cooximetría .....	29
8.8.9.	Procedimiento para el Tratamiento de Muestras y Soluciones de Cooximetría para la Determinación de COHb.....	29
8.9.	Método Cromatográfico para la Determinación de Monóxido de Carbono Total.....	30
8.9.1.	Condiciones del Método.....	30
8.9.2.	Equipos .....	31
8.9.3.	Instrumentos de Medición .....	31
8.9.4.	Materiales de Laboratorio .....	31
8.9.5.	Reactivos .....	32
8.9.6.	Soluciones de Cooximetría.....	32
8.9.7.	Soluciones de Trabajo.....	32
8.9.8.	Muestras y Soluciones de Cooximetría .....	35

8.9.9.	Procedimiento para el Tratamiento de Muestras, Soluciones de Trabajo y de Cooximetría para la Determinación de COt.....	35
8.9.10.	Tratamiento Estadístico de los Datos para la Evaluación de los Parámetros de Desempeño del Método.....	36
8.9.11.	Soluciones Control .....	46
8.9.12.	Incertidumbre del Método.....	47
8.10.	Consideraciones Éticas.....	47
<b>9</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>48</b>
9.1.	Estabilidad a Corto Plazo de la Carboxihemoglobina por UV/Vis.....	48
9.2.	Validación de la Metodología Analítica para la Determinación de Monóxido de Carbono Total.....	50
9.2.1.	Selectividad.....	50
9.2.2.	Linealidad .....	54
9.2.3.	Límite de Detección.....	63
9.2.4.	Límite de Cuantificación.....	64
9.2.5.	Exactitud.....	65
9.2.6.	Precisión.....	67
9.2.7.	Precisión Intermedia.....	67
9.2.8.	Seguimiento a los Controles .....	70
9.2.9.	Incertidumbre del Método.....	71
9.3.	Tratamiento Estadístico de los Datos para %COHb y COt .....	73
9.3.1.	Identificación de Datos Atípicos .....	73
9.3.2.	Distribución de Probabilidad de las Variables en la Población.....	74
9.4.	Evaluación de la Relación entre el Porcentaje de Saturación de Carboxihemoglobina y la Concentración de Monóxido de Carbono Total en sangre.....	75
9.5.	Caracterización de la Exposición a Monóxido de Carbono en la Población Objeto de Estudio.....	78
<b>10</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>80</b>
<b>11</b>	<b>Limitaciones.....</b>	<b>83</b>
<b>12</b>	<b>Financiación .....</b>	<b>84</b>
<b>13</b>	<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>85</b>

<b>A</b>	<b>Anexo</b>	<b>Datos para la estimación del coeficiente de correlación que fue empleada para el cálculo del tamaño de muestra.....</b>	<b>92</b>
<b>B</b>	<b>Anexo</b>	<b>Aval Comité de Ética.....</b>	<b>95</b>
<b>C</b>	<b>Anexo</b>	<b>Modelo de consentimiento informado.....</b>	<b>97</b>
<b>D</b>	<b>Anexo</b>	<b>Certificado de calificación del espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Electron, modelo Helios gamma....</b>	<b>98</b>
<b>E</b>	<b>Anexo</b>	<b>Certificado de análisis solución de amoníaco 25% lote K49011332.....</b>	<b>100</b>
<b>F</b>	<b>Anexo</b>	<b>Prueba de reducción del ditionito de sodio marca JT. Baker lote 35518.....</b>	<b>102</b>
<b>G</b>	<b>Anexo</b>	<b>Calibradores de Cooximetría RNA Medical® CVC 223</b>	<b>103</b>
<b>H</b>	<b>Anexo</b>	<b>Controles de Cooximetría RNA Medical® QC.....</b>	<b>107</b>
<b>I</b>	<b>Anexo</b>	<b>Inserto de la columna de tamiz molecular HP-Molesieve, Marca Agilent Technologies, N° de parte 19091P-MS4, serie N° USF299826H.....</b>	<b>110</b>
<b>J</b>	<b>Anexo</b>	<b>Certificado de análisis Helio ultra puro 99,9990%, lote N° 02He2003201901.....</b>	<b>111</b>
<b>K</b>	<b>Anexo</b>	<b>Certificado de análisis del ácido fórmico marcado H13COOH al 95%, marca Sigma Aldrich, producto 279404-1G, lote N° MBBB0474V.....</b>	<b>112</b>
<b>L</b>	<b>Anexo</b>	<b>Ácido fórmico (P&gt;88%), marca JT. Baker, N° de producto 0128-05 y lote 0000005643.....</b>	<b>113</b>
<b>M</b>	<b>Anexo</b>	<b>Certificado de análisis ácido sulfúrico grado reactivo 95%-97%, marca Merck, producto N° 1.00732.2500, lote N° K39708932.....</b>	<b>114</b>
<b>N</b>	<b>Anexo</b>	<b>Informe del software R con el tratamiento de los datos para la estabilidad a corto plazo de la COHb</b>	<b>116</b>
<b>O</b>	<b>Anexo</b>	<b>Informe del software R con el tratamiento de los datos para la correlación entre COt y %COHb</b>	<b>123</b>
<b>P</b>	<b>Anexo</b>	<b>Resultados de %COHb y COt en las muestras de sangre analizadas por ambas metodologías.</b>	<b>127</b>
<b>Q</b>	<b>Anexo</b>	<b>Informe Calificación operacional HS-GC-MS</b>	<b>130</b>

## Lista de Figuras

	<b>Pág</b>
<b>Figura 7-1:</b> Estructura de la hemoglobina y el grupo <i>heme</i> .....	9
<b>Figura 7-2:</b> Ley de <i>Beer-Lambert</i> .....	11
<b>Figura 7-3:</b> Espectro de absorción característica de cada derivado de hemoglobina.....	12
<b>Figura 7-4:</b> Vial Headspace.....	13
<b>Figura 7-5:</b> Componentes del espectrómetro de masas.....	14
<b>Figura 7-6:</b> Funcionamiento de un cuadrupolo.....	15
<b>Figura 7-7:</b> Liberación de monóxido de carbono.....	16
<b>Figura 7-8:</b> Patrón de fragmentación del monóxido de carbono $^{12}\text{CO}$ .....	17
<b>Figura 9-1:</b> Gráficos de la variación de la carboxihemoglobina en el tiempo de almacenamiento por anticoagulante.....	49
<b>Figura 9-2:</b> Separación de analitos en la columna de tamiz molecular.....	50
<b>Figura 9-3:</b> Muestra de sangre sin estándar interno ( $\text{H}^{13}\text{COOH}$ ).....	52
<b>Figura 9-4:</b> Cromatogramas para soluciones acuosas y muestras de sangre enriquecidas con etanol y metanol.....	53
<b>Figura 9-5:</b> Gráfico de dispersión - curva de calibración en medio acuoso...	55
<b>Figura 9-6:</b> Gráfico de residuos de la variable $y$ – curvas de calibración en medio acuoso .....	56
<b>Figura 9-7:</b> Uso de rectas de regresión para comparar el medio de preparación de las curvas de calibración.....	62
<b>Figura 9-8:</b> Respuesta cromatográfica para las concentraciones equivalentes a los límites de detección y cuantificación .....	66
<b>Figura 9-9:</b> Concentración de monóxido de carbono total versus porcentaje de saturación de carboxihemoglobina .....	75
<b>Figura 9-10:</b> Concentración de monóxido de carbono total en sangre versus porcentaje de saturación de carboxihemoglobina predicho.....	78

## Lista de Tablas

	Pág.
<b>Tabla 7-1:</b> Síntomas clínicos a los diferentes niveles de porcentajes de saturación de carboxihemoglobina.....	8
<b>Tabla 7-2:</b> Expresiones matemáticas para el cálculo de las concentraciones de los derivados de la hemoglobina.....	10
<b>Tabla 8-1:</b> Consolidado con las muestras seleccionadas.....	24
<b>Tabla 8-2:</b> Conceptualización y operacionalización de las variables del estudio.....	25
<b>Tabla 8-3:</b> Muestras para el estudio de estabilidad de la carboxihemoglobina.....	26
<b>Tabla 8-4:</b> Parámetros del método espectrofotométrico.....	27
<b>Tabla 8-5:</b> Condiciones del Automuestreador de volátiles Headspace, cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas.....	30
<b>Tabla 8-6:</b> Cálculo del coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto.	37
<b>Tabla 8-7:</b> Tratamiento estadístico pruebas de hipótesis para el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto.....	38
<b>Tabla 8-8:</b> Análisis de varianza de la regresión no ponderada.....	39
<b>Tabla 8-9:</b> Test de Cochran.....	40
<b>Tabla 8-10:</b> Análisis de varianza para evaluar la linealidad en regresión ponderada.....	42
<b>Tabla 9-1:</b> Observaciones por tipo de anticoagulante y concentración de carboxihemoglobina .....	48
<b>Tabla 9-2:</b> Tiempos de retención de los iones $m/z$ 28 y 29 en las curvas de calibración realizadas en medio acuoso.....	51
<b>Tabla 9-3:</b> Análisis de varianza efecto del ion $m/z$ 29 proveniente de $^{12}\text{CO}$	53
<b>Tabla 9-4:</b> Curvas de calibración en agua para la determinación de monóxido de carbono.....	54
<b>Tabla 9-5:</b> Prueba de Cochran para varianzas.....	56
<b>Tabla 9-6:</b> Cálculo de la recta de regresión por mínimos cuadrados ponderados.....	57

<b>Tabla 9-7:</b>	Resultado ANOVA recta ponderada.....	58
<b>Tabla 9-8:</b>	Comparación de las rectas ponderada y no ponderada.....	58
<b>Tabla 9-9:</b>	Comparación de las concentraciones obtenidas por ambos métodos de regresión.....	59
<b>Tabla 9-10:</b>	Comparación de los límites de confianza entre los métodos de regresión ponderados y no ponderados.....	60
<b>Tabla 9-11:</b>	Curva de calibración en matriz de glóbulos rojos.....	60
<b>Tabla 9-12:</b>	Análisis de varianza de la regresión – glóbulos rojos .....	61
<b>Tabla 9-13:</b>	Evaluación de la linealidad del método en matriz de glóbulos rojos.	61
<b>Tabla 9-14:</b>	Concentración de monóxido de carbono total en soluciones de Cooximetría.....	62
<b>Tabla 9-15:</b>	Evaluación de la concentración equivalente al límite de detección 0,05 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ .....	64
<b>Tabla 9-16:</b>	Datos para evaluar la precisión y exactitud en la solución equivalente a la concentración del límite de cuantificación 0,10 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ .....	65
<b>Tabla 9-17:</b>	Exactitud del método cromatográfico.....	66
<b>Tabla 9-18:</b>	Precisión del método cromatográfico en términos de repetibilidad.	67
<b>Tabla 9-19:</b>	Precisión intermedia del método cromatográfico.....	68
<b>Tabla 9-20:</b>	ANOVA para evaluar la precisión intermedia.....	68
<b>Tabla 9-21:</b>	Coefficiente de variación entre las muestras de sangre.....	69
<b>Tabla 9-22:</b>	Análisis de varianza para evaluar la precisión intermedia en las muestras.....	69
<b>Tabla 9-23:</b>	Límites de concentración para las soluciones control.....	70
<b>Tabla 9-24:</b>	Seguimiento de los controles.....	70
<b>Tabla 9-25:</b>	Resumen de los parámetros evaluador y los resultados obtenidos durante la validación del método para la determinación de COt por HS-GC-MS.....	72
<b>Tabla 9-26:</b>	Identificación de datos atípicos.....	74
<b>Tabla 9-27:</b>	Prueba de normalidad de los datos.....	74
<b>Tabla 9-28:</b>	Eficacia del modelo de predicción .....	77



## Lista de Ecuaciones

	<b>Pág.</b>
<b>Ecuación 8-1:</b> Cálculo del tamaño de muestra.....	23
<b>Ecuación 8-2:</b> ponderación $w_i$ .....	41
<b>Ecuación 8-3:</b> Pendiente ponderada.....	41
<b>Ecuación 8-4:</b> Ordenada en el origen ponderada.....	41
<b>Ecuación 8-5:</b> Desviación estándar de $y$ de la regresión ponderada.....	42
<b>Ecuación 8-6:</b> Desviación estándar de un valor $x$ estimado utilizando la recta de regresión ponderada.....	43
<b>Ecuación 8-7:</b> Estimación límite de detección.....	43
<b>Ecuación 8-8:</b> Estimación límite de cuantificación .....	44
<b>Ecuación 9-1:</b> Predicción %COHb .....	77

## Lista de Abreviaturas y Símbolos

Abreviatura o símbolo	Término
<i>a</i>	Intercepto de la regresión.
<i>A</i>	Absorbancia.
ANOVA	Análisis de varianza.
$\infty$	Alpha, nivel de significancia.
<i>b</i>	Pendiente de la regresión.
<i>c</i>	Concentración de la solución en mg/mL para el cálculo del
<i>C</i>	Concentración de la solución (espectrofotometría).
CO o $^{12}\text{CO}$	Monóxido de carbono.
$^{13}\text{CO}$	Monóxido de carbono marcado.
<i>CM</i>	Cuadrados Medios.
<i>COHb</i>	Carboxihemoglobina.
<i>%COHb</i>	Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina.
<i>COt</i>	Concentración de Monóxido de carbono total.
<i>CV</i> o <i>%CV</i>	Coefficiente de variación (%).
$\epsilon$	Coefficiente molar de extinción.
<i>F</i>	Estadístico F de Fisher.
<i>GC</i>	Cromatografía de gases.
<i>H<sup>12</sup>COOH</i>	Ácido fórmico.
<i>H<sup>13</sup>COOH</i>	Ácido fórmico marcado con carbono trece.
<i>Hb</i>	Hemoglobina.
<i>I<sub>o</sub></i>	Luz incidente.
<i>I<sub>t</sub></i>	Luz transmitida.
<i>k</i>	Factor de cobertura o número de concentraciones trabajadas en la curva de calibración.
<i>L</i>	Longitud de la cubeta (espectrofotometría).
<i>log<sub>10</sub></i>	Logaritmo decimal.
<i>LOD</i>	Límite de detección.
<i>LOQ</i>	Límite de cuantificación.
<i>m/z</i>	Relación masa carga.

<b>Abreviatura o símbolo</b>	<b>Término</b>
<i>MS</i>	Espectrometría de masas.
<i>NH<sub>4</sub>OH</i>	Solución de amoníaco.
<i>O<sub>2</sub></i>	Oxígeno.
<i>r</i>	Coefficiente de correlación.
<i>R<sup>2</sup></i>	Coefficiente de determinación.
<i>%R</i>	Porcentaje de recuperación.
<i>S</i>	Desviación estándar de una muestra.
<i>S<sup>2</sup></i>	Varianza de la muestra.
<i>S<sup>2</sup><sub>k</sub></i>	Varianza de un grupo de determinaciones.
<i>S<sub>a</sub></i>	Desviación estándar del intercepto.
<i>S<sub>b</sub></i>	Desviación estándar de la pendiente de la recta de la regresión.
<i>S<sub>c</sub></i>	Suma de cuadrados.
<i>Scr</i>	Suma de cuadrados para la regresión.
<i>Scec</i>	Suma de cuadrado entre concentraciones.
<i>Scep</i>	Suma de cuadrados del error puro.
<i>Scdl</i>	Suma de cuadrados de la linealidad.
<i>S<sub>xo</sub></i>	Desviación estándar del valor de <i>x</i> estimado utilizando la recta de regresión.
<i>S<sub>xow</sub></i>	Desviación estándar del valor de <i>x</i> estimado utilizando la recta de regresión ponderada.
<i>S<sub>xx</sub></i>	Desviación estándar de la linealidad.
<i>S<sub>xy</sub></i>	Desviación estándar de la regresión.
<i>S<sub>y/x</sub></i>	Desviación estándar de los residuos de <i>y</i> .
<i>S<sub>(y/x) w</sub></i>	Desviación estándar de los residuos de <i>y</i> de la recta de regresión ponderada.
<i>t</i>	Estadístico para la prueba <i>t student</i> .
<i>T</i>	Transmitancia.
<i>%T</i>	Porcentaje de transmitancia.
<i>UV/VIS</i>	Espectrofotometría Ultravioleta visible.
<i>W<sub>i</sub></i>	Peso dado a un punto de la recta de regresión.
$\bar{x}$	Media aritmética de una muestra.
<i>x<sub>i</sub></i>	Cada valor de la variable <i>x</i>

---

<b>Abreviatura o símbolo</b>	<b>Término</b>
$x_o$	Valor de $x$ estimado utilizando la recta de regresión.
$\bar{x}_w$	Media aritmética de los valores de $x$ ponderados.
$\bar{y}$	Media de los valores de $y$
$\hat{y}$	Valores de $y$ estimados por la recta de regresión.
$y_i$	Cada valor de la variable $y$
$\bar{y}_w$	Media aritmética de los valores de $y$ ponderados.
$W_i$	Peso dado a un punto de la recta de regresión.
$\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$	Micromol de monóxido de carbono por mililitro.
$\mu\text{mol }^{13}\text{CO/mL}$	Micromol de monóxido de carbono marcado por mililitro.
UV/VIS	Espectrofotometría Ultravioleta visible.

# 1.Introducción

El monóxido de carbono es un gas producto de la combustión incompleta de sustancias orgánicas (1), cuya estructura química, conformada por un átomo de carbono y un átomo de oxígeno(2), fue dilucidada por *Cruickshank* en el año 1800 (3).

En 1912, se propuso como mecanismo de toxicidad, la hipoxia tisular secundaria a la alteración del transporte de oxígeno y aunque no es el único mecanismo conocido hoy en día, contrarrestarlo es la base de los tratamientos clínicos actuales (3).

El monóxido de carbono es el más abundante de los contaminantes de la atmósfera inferior (4) y entre sus fuentes de emisión se encuentran los vehículos automotores, los procesos industriales e incendios forestales; además, el número de casos de intoxicación por este agente en los hogares ha aumentado por el uso de gasodomésticos (1).

A nivel mundial, el monóxido de carbono es conocido por su potencial tóxico y se ha determinado como responsable de un gran número de intoxicaciones y muertes tanto accidentales como intencionales (5,6), y Colombia no ha sido ajeno a esta realidad ya que, entre los años 2015 y 2019, se reportaron un total de 4527 casos de intoxicaciones fatales y no fatales por CO y otros gases (7).

## 2. Definición y Planteamiento del Problema

Para el diagnóstico y seguimiento de las intoxicaciones por monóxido de carbono se ha empleado tradicionalmente la carboxihemoglobina tanto como biomarcador de exposición de alta especificidad como biomarcador de efecto precoz (1).

Hasta la fecha, la carboxihemoglobina ha sido de gran relevancia científica, pues su determinación fue la base para el desarrollo de diversas metodologías analíticas, tanto cualitativas como cuantitativas (8), y el diseño de equipos biomédicos entre ellos los CO-Oxímetros automatizados y los CO-Oxímetros de pulso.

Aunque el efecto más evidente de la intoxicación aguda por monóxido de carbono se deriva de la reducción de la capacidad de la hemoglobina en el transporte del oxígeno, la descarga de este en los tejidos y la posterior inhibición de la respiración celular, se ha planteado en las últimas décadas que, en exposiciones crónicas, la concentración de monóxido de carbono total podría evidenciar con mayor exactitud, el potencial deletéreo en este tipo de intoxicaciones en otros órganos y tejidos (8–10).

Ante esta necesidad, a nivel internacional, la comunidad científica ha desarrollado métodos que permiten cuantificar la concentración de monóxido de carbono total por cromatografía de gases acoplada a detector selectivo de masas (11–13). Sin embargo, en Colombia aún no se cuenta con una metodología cromatográfica que pueda ser utilizada como herramienta diagnóstica en casos en los que se requiera la determinación de este biomarcador.

### **3. Justificación**

Con el fin de brindar a la comunidad médico-científica de nuestro país una metodología acorde con el estado del arte en la determinación de biomarcadores, indicadores de intoxicación aguda y crónica por CO, este trabajo tiene por finalidad el desarrollo y validación inicial de una metodología por cromatografía de gases acoplada a detector selectivo de masas que tenga la capacidad de determinar, cuantitativamente, la carga completa de monóxido de carbono responsable de los efectos deletéreos de exposiciones a corto y largo plazo a concentraciones ambientales, al dar razón, tanto de la concentración de CO disuelto como del CO unido a la hemoglobina (COHb) (11).

## **4.Pregunta de Investigación**

¿Cuál es la relación entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total?



## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo General

Establecer la relación entre la concentración de monóxido de carbono total y el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina por cromatografía de gases-espectrometría de masas y espectrofotometría UV/VIS.

### 5.2. Objetivos Específicos

Validar el método y los parámetros de desempeño para la determinación de monóxido de carbono total en sangre empleando la cromatografía de gases con Automuestreador de volátiles *Headspace* y espectrometría de masas.

Determinar el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina en sangre total por espectrofotometría UV/VIS.

Determinar la concentración de monóxido de carbono en sangre total por cromatografía de gases masas – espectrometría de masas.

Evaluar la estabilidad de la carboxihemoglobina en muestras de sangre total.

## 6. Antecedentes.

Los retos que imponen las características propias de muestras *postmortem* en el área de toxicología forense han permitido el estudio de la carboxihemoglobina a partir de métodos espectrofotométricos y cromatográficos y con ello, la estimación de la correlación de este biomarcador con ambas técnicas analíticas. Walch et al y Hao et al concluyeron que existe una relación lineal simple positiva en el rango de concentración comprendido entre 0% y 90 %COHb con unos valores para el coeficiente de correlación (r) de 0,917 (p-valor<0,0001) y 0,9995, respectivamente. Dos aspectos relevantes de estos estudios fueron el tipo de detector del método cromatográfico y el origen de las muestras de sangre. En el estudio realizado por Walch et al, se aplicó una metodología por cromatografía de gases acoplada a automuestreador de volátiles *-Headspace-* y detector de ionización de llama (HS-GC-FID) en muestras de sangre total *postmortem* y en la investigación de Hao et al, la técnica fue HS-GC-MS en muestras de sangre total frescas dopadas con monóxido de carbono (14,15).

Por otra parte, durante el desarrollo del biomarcador Monóxido de Carbono Total, Oliverio et al determinaron que, entre 10% y 50% COHb existe una relación lineal moderada ( $R^2= 0,68$ ; p-valor< 2,2e-16) entre el monóxido de carbono total en sangre (por HS-GC-MS) y el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina COHb (empleando CO-oxímetro automatizado) (10).

## 7. Marco Teórico

### 7.1. Toxicocinética y Toxicodinamia del Monóxido de Carbono

Cuando el monóxido de carbono es inhalado, pasa a la circulación sanguínea por intercambio gaseoso en los alvéolos y se une reversiblemente a la hemoglobina, desplazando al oxígeno ya que su afinidad por ésta es 220 veces mayor (14).

Aunque la mayor parte del monóxido de carbono absorbido se encuentra unido a proteínas tanto en la sangre como a nivel tisular (16), una pequeña cantidad permanece en estado libre en la sangre (17), el 1% es metabolizado a dióxido de carbono y el resto se elimina intacto por la respiración (16).

Además del monóxido de carbono captado del ambiente, el cuerpo tiene la capacidad de producirlo durante el catabolismo de las proteínas (18) y se cree que desempeña un rol importante en procesos antiinflamatorios y anti apoptóticos (19); es así como en personas sanas sin hábito de tabaquismo y exposición aparente a este, se van a detectar valores menores del 1,0 %COHb; además, condiciones como la anemia hemolítica hace que en personas que la padecen, se encuentren valores elevados de carboxihemoglobina (20). Desde otra perspectiva, existen diferencias en la concentración de carboxihemoglobina entre hombre y mujeres, y en estas últimas, la concentración es mayor cuando se está en la fase lútea del ciclo menstrual (18) y en gestación por acción de la hormona progesterona principalmente.

El principal mecanismo de toxicidad descrito es la hipoxia celular generalizada. Conforme se fue investigando en el área se descubrió que, además, el monóxido de carbono afecta la cadena respiratoria mitocondrial agravando la hipoxia generalizada, produce peroxidación lipídica promoviendo la desmielinización de las neuronas, inhibe la síntesis de adenosina trifosfato aumentando la fracción de radicales libres y promueve la generación de grupos sulfatidos, predisponiendo a la aparición de encefalopatía (1).

Los signos y síntomas de la intoxicación aguda por monóxido de carbono van desde dolor de cabeza leve hasta falla cardio respiratoria, coma y muerte (ver **Tabla 7-1**).

**Tabla 7-1:** Síntomas clínicos a los diferentes niveles de porcentajes de saturación de carboxihemoglobina.

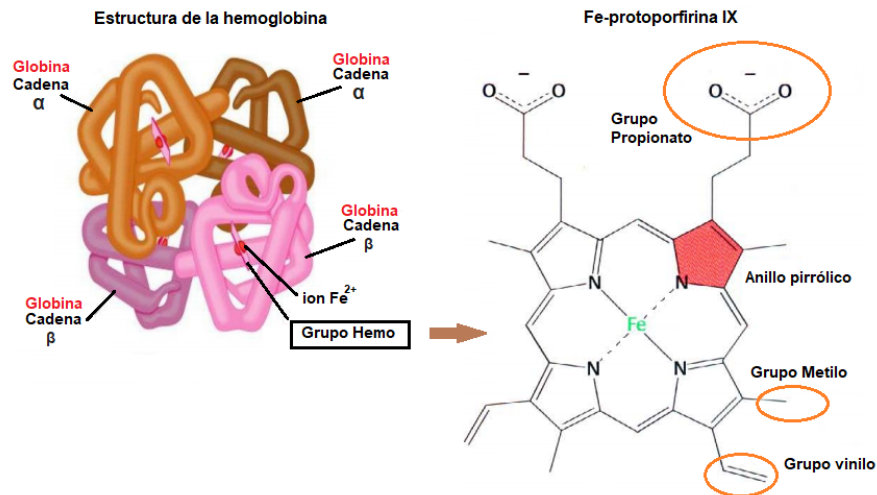
De 0 a 10 %COHb	No se presentan.
De 10 a 20 %COHb	Asintomático o dolores leves de cabeza.
De 20 a 30 %COHb	Mareos, desmayos, dolores de cabeza severos, náuseas y debilidad muscular.
De 30 a 40 %COHb	Dolores de cabeza severos, mareos, visión nublada, náuseas, vómito y colapso.
De 40 a 50 %COHb	Como lo descrito anteriormente con aumento en la frecuencia cardiaca y respiratoria. Mayor posibilidad de colapso y síncope.
De 50 a 60 %COHb	Colapso, coma con convulsiones intermitentes, respiración de Cheyne-Stokes.
De 60 a 70 %COHb	Coma con convulsiones intermitentes, depresión cardiaca y respiratoria; posiblemente muerte.
De 70 a 80 %COHb	Pulso débil y respiración lenta. Falla cardiaca y respiratoria. Muerte.

Fuente: (21)

## 7.2. La Hemoglobina y sus Derivados

La hemoglobina es la proteína responsable del transporte de oxígeno y está conformada por cuatro subunidades proteicas llamadas globina y cuatro grupos hemo (22). El grupo hemo está constituido por un compuesto orgánico conocido con el nombre protoporfirina el cual tiene un átomo de hierro en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en su núcleo (**Figura 7-1**) (23).

**Figura 7-1:** Estructura de la hemoglobina y el grupo *heme*.



Fuente: Adaptado de (23,24)

La exposición a algunos agentes químicos, generan cambios en la estructura de la hemoglobina dando paso a la formación de sus derivados, entre ellos, la oxihemoglobina, la metahemoglobina, la carboxihemoglobina y la sulfohemoglobina. Tanto la deoxihemoglobina como la oxihemoglobina determinan la capacidad de transporte de oxígeno en el organismo y como sus nombres lo indican, la deoxihemoglobina no está unida al oxígeno mientras que la oxihemoglobina, si lo está. Los otros derivados de la hemoglobina se conocen con el nombre de dishemoglobinas ya que no tienen la capacidad de transportar el oxígeno. La metahemoglobina se forma cuando el hierro del grupo hemo se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ . La carboxihemoglobina y la sulfohemoglobina se forman por la unión del grupo hemo con el monóxido de carbono y grupos sulfuro, respectivamente. La concentración de los derivados de la hemoglobina se expresa con relación a la

concentración de hemoglobina total (**Tabla 7-2**), es así como en una misma muestra, la suma de la fracción de todos los pigmentos de hemoglobina será 100% (22).

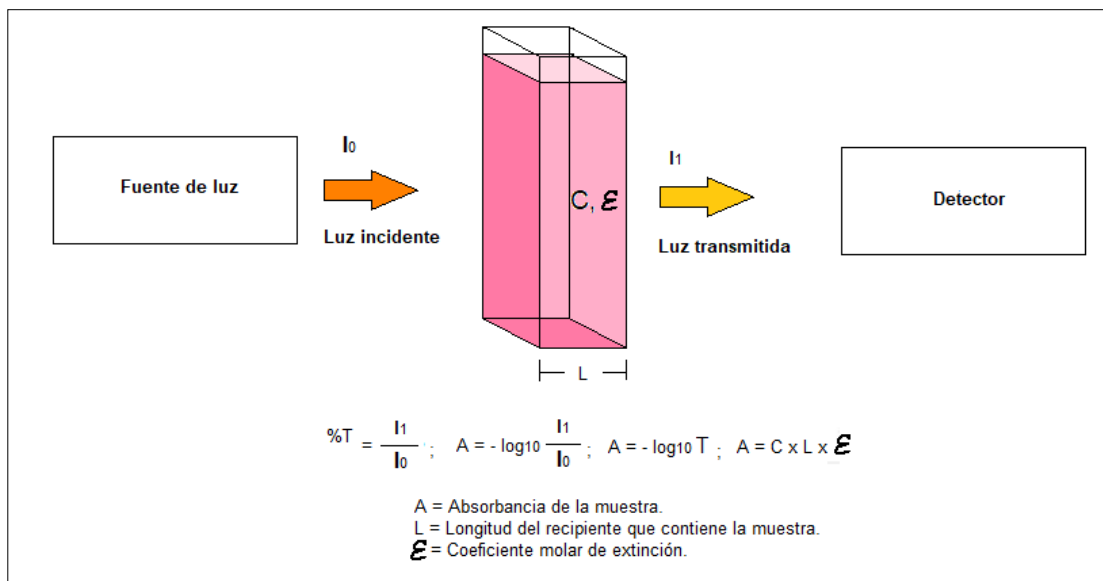
**Tabla 7-2:** Expresiones matemáticas para el cálculo de las concentraciones de los derivados de la hemoglobina.

Fracción de la hemoglobina	Expresión matemática
Deoxihemoglobina	Fracción de Deoxihemoglobina = $\frac{\text{Concentración Deoxihemoglobina}}{\text{Concentración de hemoglobina total}} \times 100 \%$
Oxihemoglobina	Fracción de Oxihemoglobina = $\frac{\text{Concentración Oxihemoglobina}}{\text{Concentración de hemoglobina total}} \times 100 \%$
Metahemoglobina	Fracción de Metahemoglobina = $\frac{\text{Concentración Metahemoglobina}}{\text{Concentración de hemoglobina total}} \times 100 \%$
Carboxihemoglobina	Fracción de Carboxihemoglobina = $\frac{\text{Concentración Carboxihemoglobina}}{\text{Concentración de hemoglobina total}} \times 100 \%$
Sulfohemoglobina	Fracción de Sulfohemoglobina = $\frac{\text{Concentración Sulfohemoglobina}}{\text{Concentración de hemoglobina total}} \times 100 \%$

Fuente: (22)

### 7.3. Espectrofotometría UV/VIS

Tradicionalmente, la cuantificación de los derivados de la hemoglobina se realiza empleando métodos espectrofotométricos. La espectrofotometría es una técnica que emplea la luz para medir la concentración de compuestos químicos. Su fundamento se basa en la capacidad que tienen las moléculas para absorber radiaciones electromagnéticas en un medio, cuando se hace pasar a través de ellas, un haz de luz a determinada longitud de onda. Este fenómeno óptico se explica a partir de la ley de *Beer-Lambert* y las unidades de medida son la transmitancia y la absorbancia. La transmitancia de un compuesto en una muestra se determina a partir del cociente entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector después de atravesar la muestra y la cantidad de luz que incidió sobre ella. La absorbancia indica la cantidad de luz absorbida por el mismo compuesto en la muestra y es directamente proporcional a su concentración, a la distancia que recorre la luz por la solución y a la constante de absorptividad molar para dicho compuesto, conocida como coeficiente molar de extinción (**Figura 7-2**)(25,26).

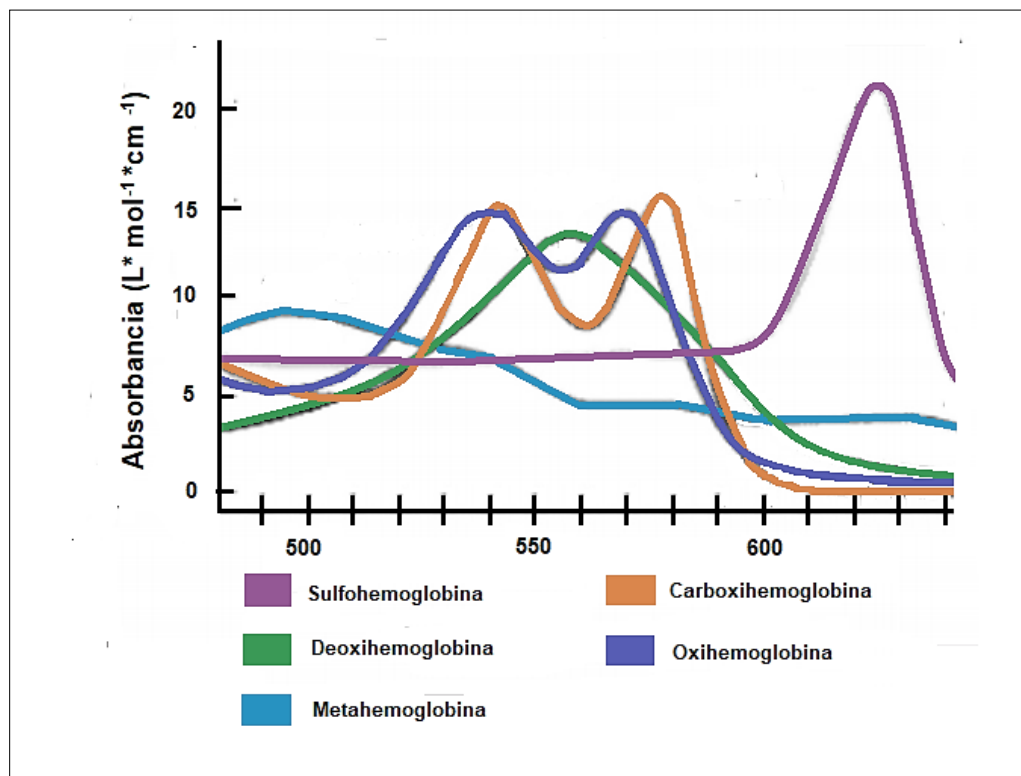
**Figura 7-2:** Ley de Beer-Lambert.

Fuente: Adaptado de (25,26).

Al tener cada molécula determinados estados de excitación que la distinguen de otras, la espectrofotometría se convierte en un instrumento con gran valor para la caracterización de compuestos químicos.

De acuerdo con la literatura, los métodos espectrofotométricos presentan varias limitaciones (27), asociadas ya sea, a la metodología analítica o a las características propias de las muestras. En relación con la metodología analítica, se debe evaluar minuciosamente la capacidad del método para identificar y cuantificar la concentración de carboxihemoglobina en una matriz en las que se encuentren otros derivados de hemoglobina, los cuales tienen espectros de absorción similares (**Figura 7-3**) (22). En lo referente a las características propias de las muestras, la presencia de lípidos y coágulos son interferentes en el análisis y la exposición a agentes físicos como el fuego o a condiciones ambientales, pueden iniciar un proceso de cambio en los componentes de la sangre que también interfieren en la determinación de carboxihemoglobina (degradación de la hemoglobina, formación de metahemoglobina y sulfohemoglobina) (28).

Figura 7-3: Espectro de absorción característica de cada derivado de hemoglobina.



Fuente: Adaptado de (22)

Para evitar la interferencia de los derivados de hemoglobina en la determinación de carboxihemoglobina, se emplean agentes reductores como el ditionito de sodio.

El método espectrofotométrico empleado para la determinación de carboxihemoglobina durante la presente investigación fue desarrollado por el Grupo de Toxicología Forense de la Dirección Regional Bogotá del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, y se basa en la estimación de la absorción de la carboxihemoglobina a 540 nm y de la hemoglobina reducida a 555 nm (29).

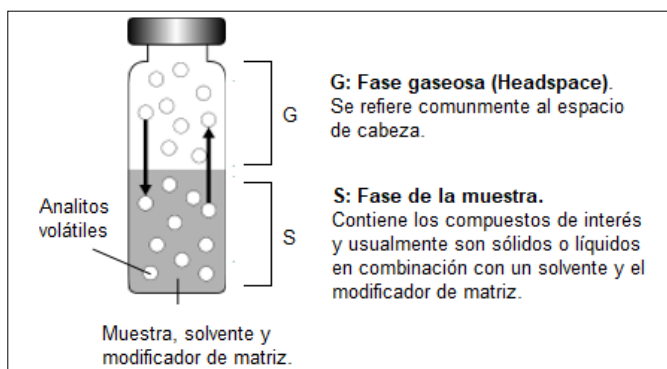


## 7.4. Cromatografía de Gases Acoplada a Automuestreador de volátiles *Headspace* y Espectrometría de masas

La cromatografía es una potente técnica de separación creada por *Mikhail Tswett*, la cual reúne diversos métodos que separan, identifican y determinan los analitos en matrices complejas. Para que el proceso de separación se efectúe, se requiere de una fase móvil en la cual, se disuelve la muestra y de una fase estacionaria o columna, cuyas propiedades hace que los analitos de la muestra se retengan en diferentes grados; es así, como los fuertemente retenidos tendrán una velocidad menor a través de la columna y los débilmente retenidos, se moverán con mayor rapidez, haciendo que, los componentes se separen en diferentes zonas, las cuales podrán ser analizadas en forma cualitativa y cuantitativa (25).

La cromatografía de gases acoplada a Automuestreador de volátiles *Headspace* es una técnica relativamente sencilla, empleada principalmente para el análisis de compuestos orgánicos volátiles de matrices complejas con presencia de otros compuestos de alto peso molecular y material no volátil que, pueden permanecer en el sistema cromatográfico y resultar en un ensayo analítico deficiente. Para el muestreo por espacio de cabeza (*Headspace* en inglés), la muestra se prepara en un vial, en el cual, también se adicionan un modificante de la matriz y un solvente. Los compuestos orgánicos volátiles de la matriz son extraídos de los componentes no volátiles y aislados en el espacio de cabeza del vial; luego, se toma una porción de los analitos en fase gaseosa presentes en el espacio de cabeza y estos son liberados al sistema cromatográfico para su respectiva separación (**Figura 7-4**) (30).

**Figura 7-4:** Vial *Headspace*.

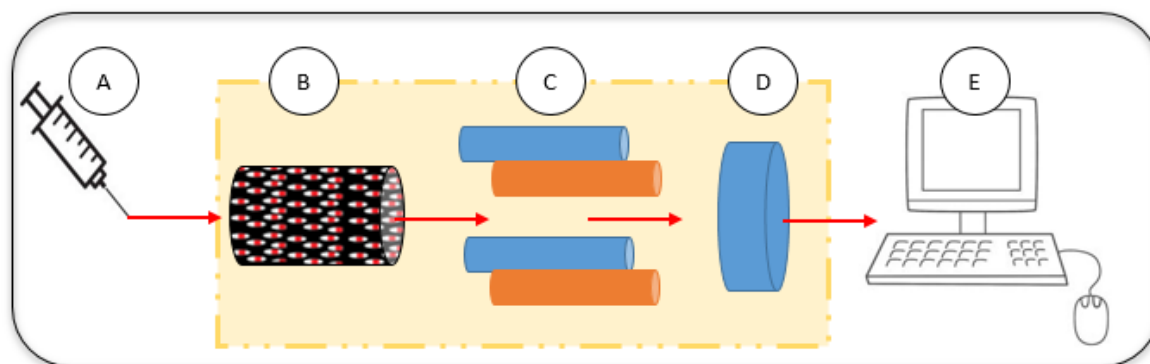


Fuente (30)

Luego de la separación de los analitos por la columna, estos viajan al espectrómetro de masas, equipo que permite la identificación y cuantificación de los compuestos de interés después de ionizarlos y ordenarlos por su relación masa carga ( $m/z$ ) (25,26).

Los componentes básicos del espectrómetro de masas son el puerto de entrada de la muestra, la fuente de ionización, el analizador de masas, el detector y la unidad para el procesamiento de datos (**Figura 7-5**).

**Figura 7-5:** Componentes del espectrómetro de masas.



A. Puerto de entrada de la muestra. B. Fuente de Ionización. C. Analizador de masas. D. Detector. E. Unidad para el procesamiento de datos.

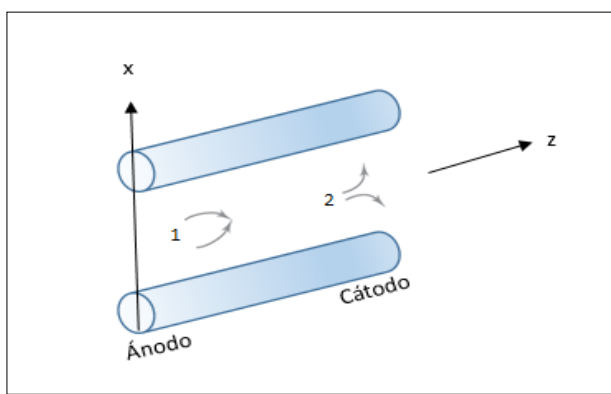
Fuente (26).

Cuando la muestra ingresa en el equipo, esta es ionizada a partir de técnicas entre las que se encuentra, la ionización por impacto de electrones. Esta emplea una fuente de electrones conocida como filamento, sobre la cual se aplica un potencial eléctrico de 70 eV que hace que, los electrones que se encuentran en su superficie se carguen muy energéticamente, abandonando el filamento y moviéndose en el espacio, en donde colisionan con las moléculas y como producto, estas pierden un electrón, quedando cargadas positivamente y dando lugar a la formación del Ion molecular. Por otra parte, como la energía de colisión es muy alta, la molécula se desestabiliza y se fragmenta en un patrón característico que es reproducible. El producto de la ionización es un flujo de iones positivos acelerados hacia el analizador de masas (25).

El analizador de masas no es más que un instrumento que separa los iones de acuerdo con su relación masa-carga en un campo magnético. El analizador de masas más empleado es el cuadrupolo, el cual contiene de 4 a 8 barras conectadas eléctricamente, la

mitad de ellas al ánodo y las otras al cátodo de una fuente variable de cadmio. Además, a cada segmento de barras, se le aplica voltaje variable de corriente alterna. Los iones son acelerados entre las barras gracias a una diferencia de potencial causado por las variaciones de corriente alterna y continua, y solo los iones con una relación de  $m/z$  entre un rango seleccionado, llegan al detector mientras que los otros se convierten en moléculas neutras al chocar con las barras (**Figura 7-6**) (25).

**Figura 7-6:** Funcionamiento de un cuadrupolo.



Fuente (25).

Cuando los iones salen del analizador de masas, estos son detectados por un instrumento conocido con el nombre de transductor de iones el cual convierte la intensidad de los iones en señal eléctrica para ser procesada por un software (25).

En todo momento, la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector debe operar en vacío para evitar la colisión entre los iones (26), (25).

Las señales eléctricas se convierten en un espectro de masas y este corresponde a un barrido completo de las masas de los iones y fragmentación de los analitos presentes en la muestra (26)

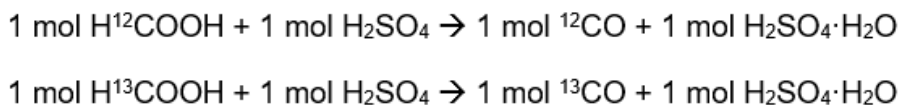
El espectrómetro de masas opera bajo dos modalidades, la primera de ellas se conoce como *full-scan* y es empleada, principalmente, para la identificación cualitativa de sustancias de interés en una muestra (*screening*) (26).

La segunda modalidad es el monitoreo de ion seleccionado o SIM por su nombre en inglés, la cual da la opción de seleccionar masas específicas entre periodos de tiempo estimados en la misma corrida, obligando a que el sistema invierta más recursos en el monitoreo de esos iones. El SIM es empleado especialmente para la cuantificación de analitos (26).

#### **7.4.1. Método por GC-MS para la Determinación de Monóxido de Carbono**

En los métodos propuestos en las publicaciones de referencia (10,28,31), se preparan curvas de calibración con soluciones acuosas de ácido fórmico empleando un estándar interno de ácido fórmico marcado con carbono trece ( $^{13}\text{C}$ ). Estas soluciones reaccionan con ácido sulfúrico para formar el monóxido de carbono con los isótopos  $^{12}\text{CO}$  y  $^{13}\text{CO}$  (**Figura 7-7**).

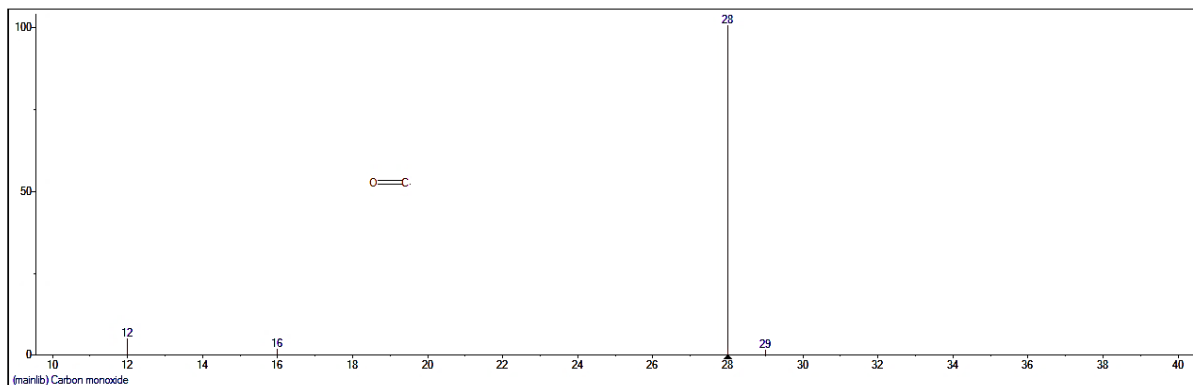
**Figura 7-7:** Liberación de monóxido de carbono.



Fuente: Elaboración propia.

Al ser el monóxido de carbono un gas, este se libera en el espacio de cabeza del vial y luego, se toma una muestra de este "aire" y se inyecta en el cromatógrafo de gases en donde pasa por una columna de tamiz molecular que separa al oxígeno, nitrógeno, monóxido de carbono y metano.

En la biblioteca de espectros de masas Nist MS Search 2.3, se indica que el patrón de fragmentación molecular para el monóxido de carbono ( $^{12}\text{CO}$ ) comprende los iones con relación masa/ carga ( $m/z$ ) 28, 12, 16, y 29 cuyas abundancias relativas son 99,9 %, 4,7%, 1,7% y 1,2%, respectivamente (**Figura 7-8**).

**Figura 7-8:** Patrón de fragmentación del monóxido de carbono  $^{12}\text{CO}$ 

Fuente: Librería de espectros de masas Nist MS Search 2.3.

Como el ion ( $m/z$ ) 28 es el de mayor abundancia, se emplea para identificar el monóxido de carbono  $^{12}\text{CO}$ . Adicionalmente, como el monóxido de carbono formado con el isótopo  $^{13}\text{C}$  tiene un peso molecular de 29 y su fragmentación sigue el mismo patrón que su isótopo  $^{12}\text{CO}$ , se emplea el ion  $m/z$  29 para su identificación.

La respuesta instrumental se mide con la relación de las áreas de las señales cromatográficas para estos iones ( $m/z$   $^{28}/^{29}$ ).

## 7.5. El Monóxido de Carbono en Sangre como Biomarcador de Exposición en el Diagnóstico de Intoxicaciones

A nivel fisiológico, se pueden determinar en la sangre, tres tipos de monóxido de carbono, el CO unido a la hemoglobina, el CO libre y como resultado de la suma de estos dos, el CO total (COt). Se conoce como CO libre a las moléculas de CO disueltas en la sangre que no se encuentran unidas a la hemoglobina.

Durante la historia, el CO unido a la hemoglobina se ha medido indirectamente por métodos espectrofotométricos que determinan la concentración de carboxihemoglobina, pero por las limitaciones de esta técnica, diversos investigadores han desarrollado metodologías analíticas basadas en los principios de la cromatografía de gases acoplada a múltiples detectores, entre ellos el detector selectivo de masas, y han logrado estimar

teóricamente, el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina partiendo de la concentración de CO unido a la hemoglobina (12,15,31).

Dependiendo del rango de concentraciones que se establezca en la metodología bioanalítica para determinar el CO, con el mismo método se podría hallar tanto la concentración de CO como la concentración de COt (10). A nivel experimental, para determinar la concentración de CO, las muestras se someten a un proceso de burbujeo con nitrógeno gaseoso y de esta forma se eliminan las moléculas de CO libre (11).

Con relación a los avances realizados en el análisis de muestras clínicas, se determinó el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono en muestras de sangre de quince conductores de carro sin aparente exposición a este agente. Las muestras fueron extraídas de vaso periférico, recolectadas en recipientes con fluoruro de sodio, procurando dejar el menor espacio de cabeza posible, y almacenadas en condiciones de baja temperatura hasta su posterior análisis. En esta investigación, se estimó que los valores promedio para ambos biomarcadores son 3,49 %COHb  $\pm$  2,90 %COHb y 0,29  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$   $\pm$  0,24  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , respectivamente (31).

En otra publicación, se determinó el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de COt en muestras de sangre total de trece voluntarios los cuales fueron expuestos, bajo condiciones controladas, a monóxido de carbono. A los voluntarios se les extrajo una y dos muestras de sangre antes y después de la exposición a CO, respectivamente. En el artículo no se indicó cual fue el tipo de recipiente en el cual se recolectaron las muestras (tipo de conservante o anticoagulante) ni las condiciones de almacenamiento, pero sí se informó que estas fueron analizadas por triplicado dentro de las primeras cuarenta y ocho horas después de su recolección. Con respecto a los resultados obtenidos, se deduce que, para porcentajes de saturación de carboxihemoglobina entre 0,0%COHb y 16,0 %COHb se esperarían concentraciones de monóxido de carbono total hasta de 6,0  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (10).

Hasta diciembre de 2019, ninguna de las publicaciones mencionó explícitamente si existía o no, una correlación entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total, por ello, para tener una referencia con relación al tamaño de la muestra, se calculó el coeficiente de correlación con los datos disponibles para la concentración de CO y se estimó que este era 0,74 (ver Anexo A).

En enero de 2020, se publicó un artículo en la revista de *Forensic Science International*, titulado “*New strategy for carbon monoxide poisoning diagnosis: Carboxyhemoglobin (COHb) vs Total Blood Carbon Monoxide (TBCO)*” en el cual se estimó que entre %COHb y COt existe una correlación positiva moderada con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,68 (13).

## **7.6. Factores que Afectan la Determinación de Monóxido de Carbono en Muestras de Sangre**

La pérdida de carboxihemoglobina está asociada directamente con su concentración inicial en la muestra, el tipo de conservante, el volumen de espacio de cabeza y la temperatura de almacenamiento (32–35).

*Oliverio et al.* en su publicación más reciente, evaluaron la influencia del tipo de anticoagulante, volumen de espacio de cabeza, condiciones de almacenamiento y tiempo en espera de los análisis (por ambas técnicas analíticas), durante 28 días sobre 2376 muestras de sangre con porcentajes de saturación en todo el rango de concentración y encontraron que, para garantizar la estabilidad de la carboxihemoglobina, la muestra debe ser recolectada en un tubo con EDTA como anticoagulante, el volumen de espacio de cabeza debe ser lo menor posible y si no se puede analizar de inmediato, la temperatura de almacenamiento debe ser bajo cero ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (13).

En cuanto al monóxido de carbono total, se encontró que este presentó un comportamiento más estable, aunque el tipo de conservante y la temperatura de almacenamiento a temperatura ambiente ( $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) influyen en su estabilidad, pero en menor proporción en comparación con la carboxihemoglobina. Se atribuye esta diferencia entre biomarcadores a que los métodos ópticos son susceptibles a los cambios que se presenta en la sangre por la degradación de sus componentes sanguíneos y la liberación de monóxido de carbono desde la molécula de hemoglobina (13).

## 7.7. Validación de Metodologías Bioanalíticas

Para los laboratorios clínicos, toxicológicos o forenses, la validación de metodologías bioanalíticas es una actividad fundamental en el aseguramiento de la calidad de los resultados.

La validación, de acuerdo con el Vocabulario Internacional de Metrología, se define como la “Verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto” siendo verificación la “Aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” (36).

De acuerdo con el grado de implementación de un método en el laboratorio, la validación puede ser completa cuando se requiere o se desea ofrecer un nuevo análisis, parcial para realizar mejoras a un método ya validado o cruzada, cuando este ya fue validado en otro equipo y se compara la respuesta con la obtenida, en el equipo actual. Adicionalmente, validar un método cuantitativo exige la evaluación de un número mayor de parámetros en comparación con un método cualitativo.

En general, los parámetros de desempeño a evaluar durante la validación de la metodología bioanalítica para la determinación de monóxido de carbono total son selectividad, linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

### 7.7.1. *Selectividad*

Este parámetro está relacionado con la habilidad del método para identificar inequívocamente, el analito de interés cuando se encuentra en una muestra con otros compuestos(37).

### 7.7.2. *Linealidad*

Hace referencia a la capacidad del método para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad del analito de interés en un rango de concentración definido. Para su determinación, la relación lineal puede ser evaluada a partir de la valoración de por lo menos 5 niveles de concentración con tres réplicas por nivel; y su análisis estadístico incluye las pruebas de hipótesis para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de



correlación (38), un análisis de varianza o la estimación del coeficiente de variación de los factores de respuesta (39).

### **7.7.3. Límite de detección**

Corresponde a la mínima concentración de un analito que se puede detectar en una muestra, pero no, necesariamente, cuantificar (39).

### **7.7.4. Límite de cuantificación**

Este parámetro corresponde a la mínima concentración de un analito que se puede cuantificar en una muestra con precisión y exactitud (39).

### **7.7.5. Exactitud**

La exactitud expresa que tan próximo está un valor obtenido experimentalmente del que se acepta como verdadero. Para metodologías bioanalíticas, la exactitud se define en términos porcentaje de recuperación de una muestra con relación a la cantidad de analito adicionada. Para determinar la recuperación, se valoran como mínimo, 3 puntos de concentración con 3 réplicas por cada uno de ellos (37).

### **7.7.6. Precisión**

Corresponde al grado de dispersión de los datos y se expresa en porcentaje de coeficiente de variación. Hay tres tipos de precisión, la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad hace referencia a la dispersión que se obtiene tras realizar el ensayo bajo las mismas condiciones (intra-ensayo); en la precisión intermedia, se evalúan los datos obtenidos cuando hay variación en las condiciones (se conoce como intra-laboratorio y las variables pueden ser: día, analista, equipo) y finalmente, en la reproducibilidad, se analizan los datos obtenidos por diferentes laboratorios tras efectuar el ensayo sobre la misma muestra homogénea (37).

## **8. Materiales y Métodos**

### **8.1. Tipo de Estudio**

El presente es un estudio experimental de laboratorio cuyo objetivo fue determinar la relación entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total en muestras de sangre.

### **8.2. Universo y Unidades de Análisis**

Para este estudio se determinó que el universo son los 48 ciclistas que participaron durante los recorridos enmarcados en el desarrollo de la investigación “Impacto de la contaminación producto del tráfico vehicular sobre los niveles de carboxihemoglobina y la respuesta respiratoria aguda en ciclistas urbanos de la universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá” liderado por Oscar David Díaz Fonseca de la Maestría en Toxicología.

Las unidades de análisis corresponden a las 169 muestras de sangre extraídas a los ciclistas que, en el marco de la investigación mencionada anteriormente, realizaron el recorrido desde y hacia las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, uno de ellos, en un día con alto flujo vehicular y el otro, en un día festivo. De las 169 unidades de análisis, 31 se extrajeron de mujeres y 138 de hombres.

### **8.3. Criterios de Inclusión**

Se establecieron como criterios de inclusión que los ciclistas hubiesen participado en los recorridos enmarcados dentro de la investigación “Impacto de la contaminación producto del tráfico vehicular sobre los niveles de carboxihemoglobina [...]”, que sus edades estuvieran entre los 18 años y 60 años y finalmente, que aceptaran participar voluntariamente en la presente investigación firmando el formato de consentimiento informado.

Debido a que las 169 muestras recibidas en el laboratorio provenientes de la investigación “Impacto de la contaminación producto del tráfico vehicular sobre los niveles de carboxihemoglobina [...]” fueron extraídas a voluntarios que cumplieron los criterios de aceptación definidos, estas se incluyeron en su totalidad como unidades de análisis.

## 8.4. Tamaño de Muestra

Para calcular el tamaño de muestra idóneo para determinar la significancia del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total, se empleó la **Ecuación (8-1)**.

Con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, los valores  $Z_{1-\alpha/2}$  y  $Z_{1-\beta}$  corresponden a 1,96 y 0,84 respectivamente (40). El valor  $r$  es la magnitud de la correlación que se desea detectar y debido que, al momento de calcular el tamaño de la muestra, no se contaba con un dato determinado experimentalmente, este se estimó con base a los resultados de publicaciones recientes y su valor teórico fue 0,74 (ver Anexo A).

$$n = \left[ \frac{Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left[ \frac{1+r}{1-r} \right]} \right]^2 + 3 \quad \rightarrow \quad n = \left[ \frac{1,96 + 0,84}{\frac{1}{2} \ln \left[ \frac{1+0,74}{1-0,74} \right]} \right]^2 + 3 = 11,7 \approx 12 \quad (8-1)$$

Entonces, al realizar el cálculo se concluyó que, como mínimo, se deben analizar 12 muestras de sangre por ambas metodologías bioanalíticas para determinar con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, el coeficiente de correlación lineal entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total.

Por tiempo y costos, se analizaron 52 muestras de sangre por ambas metodologías bioanalíticas.

## 8.5. Selección de la Muestra

A cada una de las muestras de sangre se le asignó un número del 1 al 169 de acuerdo con el orden en el que se recibieron en el laboratorio y luego, para la selección de aquellas que se analizarían por HS-GC-MS, se realizó un muestreo aleatorio simple empleando la función en Excel “+ALEATORIO.ENTRE(1;169)”.

Al concluir con este procedimiento, se escogieron las muestras identificadas con los números que se enseñan en la **Tabla 8-1**.

**Tabla 8-1:** Consolidado con las muestras seleccionadas.

N° de muestra	N° de muestra	N° de muestra	N° de muestra
1	63	104	117
6	72	105	118
9	75	106	120
21	77	107	121
22	80	108	125
24	84	109	126
25	95	110	131
38	96	111	135
40	97	112	145
41	100	113	153
49	101	114	167
55	102	115	168
62	103	116	169

Fuente: Elaboración propia.

## 8.6. Variables

Las variables que se emplearon para la caracterización de la exposición al monóxido de carbono en la población objeto de estudio fueron sexo, edad, hábito de tabaquismo,

porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y concentración de monóxido de carbono total. La conceptualización y operacionalización de estas, se encuentra en la **Tabla 8-2**.

**Tabla 8-2:** Conceptualización y operacionalización de las variables del estudio.

Variable		Conceptualización	Operacionalización
Persona	Sexo	Carácter orgánico que distingue a los machos de las hembras al momento de nacer.	Femenino. Masculino.
	Edad	Años cumplidos que tiene un individuo al momento del estudio.	Desde los 18 años hasta los 60 años.
	Hábito de consumo de tabaco.	Consumo de tabaco o cigarrillo.	<b>No fumador:</b> No fuma cigarrillos. <b>Fumador leve:</b> consume menos de 5 cigarrillos diarios (41). <b>Fumador moderado:</b> de 6 a 15 cigarrillos diarios (41). <b>Fumador severo:</b> más de 16 cigarrillos por día (41)
	Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina en sangre total.	Nivel de carboxihemoglobina en sangre determinado por UV/VIS.	Todo el rango de valores de porcentaje saturación de carboxihemoglobina.
	Concentración de monóxido de carbono total en sangre.	Nivel de monóxido de carbono en sangre determinado por GC-MS	Entre 0,0 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ y 2,99 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Fuente: Elaboración propia.

## 8.7. Estabilidad a Corto Plazo de la Carboxihemoglobina en Muestras de Sangre Total.

Se recolectó sangre total en cuatro tubos al vacío con los anticoagulantes ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato de sodio y heparina sódica, respectivamente. Luego, la sangre recolectada en tres de los cuatro tubos (por anticoagulante), fue saturada por burbujeo con monóxido de carbono generado *in situ*, hasta alcanzar concentraciones entre 10% y 20%, entre 21% y 49% y mayores o iguales que 50% ( $\geq 50\%$ ) (ver **Tabla 8-3**).

Las muestras se almacenaron en condiciones de refrigeración (entre 2°C y 8°C) durante dieciséis días y la concentración de carboxihemoglobina fue determinada por espectrofotometría visible los días 0, 1, 2, 4, 6 y 16. Finalmente, para evaluar si el tiempo afecta la concentración de carboxihemoglobina, se realizó un análisis de varianza con una confianza del 95%; las hipótesis a contrastar fueron “no hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración de carboxihemoglobina con respecto al tiempo de almacenamiento ( $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 \dots = \alpha_n$ )” y “hay diferencias significativas en la concentración de carboxihemoglobina con respecto al tiempo de almacenamiento ( $H_1: \alpha_1 \neq \alpha_2 \dots \neq \alpha_n$ )”. Los datos fueron procesados en Excel y se complementó con el software estadístico R versión 4.0.3 (42).

**Tabla 8-3:** Muestras para el estudio de estabilidad de la carboxihemoglobina

Anticoagulante	Tubo	Concentración de carboxihemoglobina inicial (día cero)
EDTA	N°1	6 %
	N°2	14 %
	N°3	34 %
	N°4	36 %
Citrato de sodio	N°1	7 %
	N°2	13 %
	N°3	36 %
	N°4	46 %
Heparina sódica	N°1	5 %
	N°2	13 %
	N°3	36 %
	N°4	57 %

Fuente: Elaboración propia.

## 8.8. Método Espectrofotométrico para la Determinación de Carboxihemoglobina

### 8.8.1. Condiciones del método

Para la determinación del porcentaje de saturación de carboxihemoglobina se empleó una metodología analítica en la cual se realiza un tratamiento de la muestra con ditionito de sodio para reducir los derivados de hemoglobina presentes, excepto la carboxihemoglobina. Después se determina la concentración de carboxihemoglobina a partir de la relación de las absorbancias obtenidas a 540 nm y 555 nm. En la **Tabla 8-4** se presentan los parámetros de este método.

**Tabla 8-4:** Parámetros del método espectrofotométrico.

Parámetro	Resultado experimental
Ecuación de la recta	<b><math>y = 0,0037 x + 0,8045</math></b> Donde $y$ es el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y $x$ es la relación de absorbancias a 540 nm y 555 nm.
Límite de detección	0,36 %COHb
Límite de cuantificación	1,21 %COHb
Rango de cuantificación	1,21 %COHb – 66,30 %COHb
Estabilidad de la carboxihemoglobina en muestras de sangre total recolectadas en tubos con EDTA, heparina de sodio y citrato de sodio.	16 días en condiciones de refrigeración (entre 2 °C y 8 °C)
Tiempo de reducción	No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la concentración del porcentaje de saturación de carboxihemoglobina determinada entre los 3 minutos y 20 minutos después de la adición del agente reductor.

Fuente: (43).

### **8.8.2. Equipos**

- Espectrofotómetro UV/Vis marca Thermo Electron, modelo Helios Alfa serie 114504 con calificación vigente realizada el 2019-01-21; N° de certificado DE-509 de Innovatek con celdas de Cuarzo.
- Nevera de refrigeración.
- Termómetro digital.

### **8.8.3. Instrumentos de medición**

- Micropipeta marca Brand Transferpette ® S de 10 µL a 100 µL.
- Micropipeta marca Brand Transferpette ® S 100 µL a 1000 µL.

### **8.8.4. Materiales de laboratorio**

- Tubos al vacío tapa lila marca PUTH® Vacumine, lote 1806061A, fecha de vencimiento 2019-11.
- Balones volumétricos de vidrio con tapón, clase A, marca Glassco ® con capacidad de 5 mL.
- Balones volumétricos de vidrio con tapón, clase A, marca Glassco ® con capacidad de 10 mL.
- Balones volumétricos de vidrio con tapón, clase A, marca Brand ® con capacidad de 100 mL
- Puntas para micropipetas sin filtro marca Plastibrand ® para capacidad de 200 µL y 1000 µL.
- Jeringas hipodérmicas de 3 mL.

### **8.8.5. Reactivos**

- Solución de amoníaco (pureza  $\geq 25\%$ ) marca Merck, lote 49011332 con fecha de vencimiento 2022-04-30.
- Ditionito de sodio grado reactivo marca JT Baker, N° de lote 35518.

### **8.8.6. Soluciones de cooximetría**

- Kit de soluciones calibradoras marca RNA medical CVC 223 CO-Oximeter Calibration Verification Controls lote 822334 con fecha de expiración 2019-12.



- Kit de controles de carboxihemoglobina marca RNA Medical QC 253 lote 848840 con fecha de expiración 2019-12.

### **8.8.7. Preparación de soluciones**

Una solución de amoniaco 0,60% se preparó todos los días como diluyente de la muestra.

### **8.8.8. Muestras y soluciones de cooximetría**

Las muestras se recolectaron en tubos al vacío con EDTA como anticoagulante (tapa lila por convención internacional), procurando dejar el menor espacio de cabeza posible y se almacenaron en condiciones de refrigeración (entre 2 °C y 8 °C) hasta completar el estudio.

Las ampollas con las soluciones de cooximetría fueron almacenadas en condiciones de refrigeración y solo se abrieron hasta su análisis.

### **8.8.9. Procedimiento para el tratamiento de muestras y soluciones de cooximetría para la determinación de COHb**

Para la preparación de la muestra y las soluciones de cooximetría, en un tubo de ensayo se adicionó:

- 5,00 mL de NH<sub>4</sub>OH 0,60%.
- 0,05 mL de muestra o solución calibradora/control.
- Aproximadamente 70,00 mg de ditionito de sodio.

Se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos. Culinado el tiempo, se determinó la absorbancia de cada muestra a 540 nm y 555 nm.

## 8.9. Método Cromatográfico para la Determinación de Monóxido de Carbono Total

### 8.9.1. Condiciones del método

Con base en publicaciones recientes, se validó un método por cromatografía de gases acoplada a Automuestreador de volátiles *Headspace* y espectrometría de masas para la determinación de monóxido de carbono en muestras de sangre total (**Tabla 8-5**).

**Tabla 8-5:** Condiciones del Automuestreador de volátiles *Headspace*, cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas.

Parámetros del Automuestreador de volátiles <i>Headspace</i> .	
Gas de presurización del vial	Helio
Temperatura del horno	90°C
Tiempo de equilibrio del vial	60 min
Temperatura de la línea de transferencia	160 °C
Parámetros del cromatógrafo de gases.	
Puerto de inyección.	
Temperatura	160 °C
Tipo de inyección	Split
Relación	1:1
Horno	
Temperatura	50°C
Tiempo	17,5 minutos
Columna analítica	
Flujo	1,3 mL/min
Parámetros del espectrómetro de masas.	
Temperatura de la línea de transferencia al MSD	280°C
Tipo de ionización.	Impacto de electrones.
Energía de colisión	70,0 eV
Tipo de adquisición	SIM/scan
Iones monitoreados ( $m/z$ )	28 y 29

Fuente: Elaboración propia.

### 8.9.2. Equipos

- Cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 7890B, serie CN17383001 con columna cromatográfica de tamiz molecular HP Plot – Molesieve marca Agilent Technologies número de parte 19091P-MS4, serial N° USF299826H. MassHunter GC/MS Acquisition B.07.06.2704.  
MussHunter Workstation Software Qualitative Analysis Navigator Versión B.08.00  
MSD ChemStation F01.03.2357.
- Automuestreador de volátiles *Headspace* marca Agilent Technologies, modelo 7697A, serie CN17410047.
- Espectrómetro de masas marca Agilent Technologies, modelo 5977B, serie US1746M042.  
Informe de calificación del cromatógrafo de gases acoplado a automuestreador de masas y espectrómetro de masas N° KH8427 de 2019-05-03.
- Vórtex, marca LB PRO, modelo MX-S con mantenimiento vigente.
- Nevera para refrigeración marca REVCO, modelo RPR 1204A20 con mantenimiento vigente.
- Cabina extractora de gases y vapores marca INGEAIRE, modelo CABINET-AIR con mantenimiento vigente.

### 8.9.3. Instrumentos de medición

- Micropipeta marca Socorex ®, modelo Acura 825, con capacidad entre 5 µL y 50 µL, serie 19102055 certificado de calibración N° 162-958-VOL-18 de 2018-10-30.
- Micropipeta marca Brand Transferpette ® S de 10 µL a 100 µL, serie 06N03996 certificado de calibración N° 162-963-VOL-18 de 2018-10-31.
- Micropipeta marca Brand Transferpette ® S de 100 µL a 1000 µL, serie 03N53884, certificado de calibración N° 162-961-VOL-18 de 2018-11-01.
- Termómetro digital marca CONTROL COMPANY, modelo 4227.
- Termohigrómetro digital marca AMPROBE, modelo TR300.

### 8.9.4. Material de laboratorio

- Balones volumétricos de vidrio con tapón, clase A, marca Glassco ® con capacidad de 10 mL.

- Balones volumétricos de vidrio con tapón, clase A, marca Glassco ® con capacidad de 100 mL.
- Puntas para micropipetas sin filtro marca Plastibrand ® para capacidad de 200 µL y 1000 µL.
- Viales de vidrio para *Headspace* con capacidad para 10 mL, tipo 1 con boca de agrafe de 20 mm.
- Tapones de 20 mm, en caucho bromo-butilo gris, para viales con boca agrafe de 20 mm.
- Agrafes de aluminio de 20 mm, color plateado, con abertura superior de 9.5 mm de diámetro, de fácil grafado y desgrafado.

#### **8.9.5. Reactivos**

- Ácido fórmico marcado con carbono trece  $H^{13}COOH$  (P>95%) marca Aldrich, lote MBBB0474V.
- Ácido fórmico (P>88%) marca Merck, número de producto 0128-05, lote 0000005463.
- Ácido sulfúrico 95%-97% marca Merck, número de producto 1.00372.2500, lote K39708932.
- Helio ultra puro 99,9990%, 6 m<sup>3</sup>, lote N° 02He2003201901.
- Bolsa de glóbulos rojos pobres en leucocitos, N° de unidad 662449, donado por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e innovación en Salud.

#### **8.9.6. Soluciones de cooximetría**

- Kit de soluciones calibradoras marca RNA medical CVC 223 CO-Oximeter Calibration Verification Controls lote 822334 con fecha de expiración 2019-12.
- Kit de controles de carboxihemoglobina marca RNA Medical QC 253 lote 848840 con fecha de expiración 2019-12.

#### **8.9.7. Soluciones de trabajo**

Con el fin de evitar la degradación de las soluciones de trabajo, estas fueron preparadas los días en los que se realizó su respectiva valoración.

- **Estándar interno.**

Diariamente, se preparó una solución acuosa de ácido fórmico marcado con carbono trece  $\text{H}^{13}\text{COOH}$  de concentración equivalente a  $0,26 \mu\text{mol } ^{13}\text{CO/mL}$ .

- **Selectividad.**

Blancos de aire sin frente de solventes.

Soluciones de ácido fórmico equivalentes a  $1 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  sin estándar interno ni frente de solventes.

Soluciones de ácido fórmico equivalentes a  $1 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  con estándar interno, pero sin frente de solventes.

Blancos de aire con frente de solventes.

Soluciones de ácido fórmico equivalentes a  $1 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  sin estándar interno, pero con frente de solventes.

Soluciones de ácido fórmico equivalentes a  $1 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  con estándar interno y frente de solventes.

Sangre total (extraída en un tubo al vacío con EDTA con concentración de carboxihemoglobina menor que 10%) sin estándar interno.

Sangre total con estándar interno.

Solución de ácido fórmico marcado con carbono trece a una concentración equivalente a  $0,26 \mu\text{mol } ^{13}\text{CO/mL}$  (estándar interno).

Soluciones acuosas de etanol, metanol y cianuro con concentraciones equivalentes a 150 mg de etanol/100 mL, 150 mg de metanol/100 mL y 10  $\mu\text{g}$  de cianuro/mL.

Muestras de sangre total enriquecidas con etanol, metanol y cianuro con concentraciones equivalentes a 150 mg de etanol/100 mL, 150 mg de metanol/100 mL y 10  $\mu\text{g}$  de cianuro/mL.

- **Curva de calibración – sistema.**

En tres días diferentes, se prepararon cinco soluciones acuosas de ácido fórmico ( $\text{H}^{12}\text{COOH}$ ) equivalentes a  $0,10 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ ,  $0,25 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ ,  $0,51 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ ,  $1,01 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  y  $2,99 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ .

Adicionalmente, se usó agua desionizada para un nivel de concentración de  $0,00 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ .

- **Blanco de glóbulos rojos pobres en leucocitos.**

Se empleó como blanco de glóbulos rojos, una solución de glóbulos rojos diluida con agua 50:50. El porcentaje de saturación de carboxihemoglobina para esta solución fue menor del 5 %COHb.

- **Curva de calibración – método.**

En una matriz de glóbulos rojos pobres en leucocitos, se prepararon cinco soluciones de ácido fórmico ( $H^{12}COOH$ ) con concentraciones equivalentes a 0,10  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,25  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,51  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 1,01  $\mu mol^{12}CO/mL$  y 2,99  $\mu mol^{12}CO/mL$ .

Adicionalmente se empleó el blanco de glóbulos rojos para el nivel de concentración de 0,00  $\mu mol^{12}CO/mL$ .

- **Límites de detección y cuantificación.**

Los límites de detección y cuantificación se calcularon con base a la desviación estándar del intercepto y la pendiente de la curva de calibración y luego, se prepararon soluciones diluidas de ácido fórmico equivalentes a 0,25  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,10  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,05  $\mu mol^{12}CO/mL$  y 0,025  $\mu mol^{12}CO/mL$  para evaluar la respuesta cromatográfica.

- **Evaluación de la precisión (repetibilidad).**

Se prepararon soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,10  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,25  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,36  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,51  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,85  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 1,01  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 1,94  $\mu mol^{12}CO/mL$  y 2,99  $\mu mol^{12}CO/mL$ .

- **Evaluación de la precisión intermedia.**

En dos días diferente, dos analistas prepararon y valoraron soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,25  $\mu mol^{12}CO/mL$ .

- **Evaluación de la exactitud en términos de porcentaje de recuperación.**

Se prepararon soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,36  $\mu mol^{12}CO/mL$ , 0,85  $\mu mol^{12}CO/mL$  y 1,94  $\mu mol^{12}CO/mL$ .

- **Soluciones control para el ensayo.**

Los días en los que se realizaron corridas analíticas para determinar la concentración de monóxido de carbono total en muestras de sangre o en las soluciones de Cooximetría, se analizó un juego de controles compuesto por soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,36  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,85  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 1,94  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

### **8.9.8. Muestras y soluciones de cooximetría.**

Para la determinación de monóxido de carbono total, las muestras fueron almacenadas bajo condiciones de refrigeración (2°C-8°C) y los contenedores no fueron abiertos sino hasta la realización del ensayo para COt.

Las soluciones de cooximetría vienen en ampollas y fueron almacenadas en condiciones de refrigeración hasta su apertura, la cual se realizó el día del análisis.

Previo a la realización del ensayo para la determinación de monóxido de carbono total, las muestras y soluciones de cooximetría se retiraron de la nevera y se dejaron a temperatura ambiente por lo menos, durante una hora. Después, se agitaron suavemente con el fin de garantizar la homogeneidad de sus componentes.

### **8.9.9. Procedimiento para el tratamiento de muestras, soluciones de trabajo y de cooximetría para la determinación de COt**

En un vial de vidrio de 10,00 mL, adicionar:

- 0,01 mL de la solución de estándar interno ( $\text{H}^{13}\text{COOH}$ ).
- 0,01 mL de la respectiva solución de ácido fórmico ( $\text{H}^{12}\text{COOH}$ ) o muestra.
- 0,30 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Sellar rápidamente el vial.
- Agitar vigorosamente el vial en vórtex durante dos minutos.

### **8.9.10. Tratamiento estadístico de los datos para la evaluación de los parámetros de desempeño del método**

- **Selectividad.**

Se evaluaron los parámetros tiempo de retención en minutos y patrón de fragmentación de los compuestos volátiles etanol, metanol y cianuro.

Se estableció como criterio de aceptación que los analitos volátiles no presentaran señales cromatográficas en el tiempo de interés y fragmentación diferenciable del CO (etanol, metanol, cianuro)

Adicionalmente, para evaluar si la respuesta del ion  $m/z$  29 proveniente de la muestra afectó la relación de áreas (ion  $^{28}/_{29}$ ), se realizó un análisis de varianza de un factor con una confianza del 95%.

- **Linealidad.**

En tres días diferentes, se realizaron 3 curvas de calibración (1 curva por día) con soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,10  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,25  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,51  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 1,01  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 2,99  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Adicionalmente, se empleó agua para la concentración equivalente a 0,00  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  con el fin de evaluar la respuesta cuando no está presente el analito en la solución y establecer un punto de comparación con la curva que se preparó en matriz biológica (solución de glóbulos rojos pobres en leucocitos).

Los datos usados para el análisis estadístico fueron las concentraciones de monóxido de carbono total de cada solución de referencia en  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (variable  $x$ ) y la respuesta del instrumento expresada en relación de áreas para las señales  $m/z$  28 y 29 (variable  $y$ ).

- Método de mínimos cuadrados (no ponderados).

Para determinar si los datos presentan una regresión lineal simple, se calculó el valor de la media de la variable  $x$  representada por  $\bar{x}$  y el valor de la media de la variable  $y$  representada por  $\bar{y}$ ; la diferencia de cada valor  $x$  con respecto a  $\bar{x}$ ,  $(x_i - \bar{x})$ ; la diferencia de cada valor  $y$  con respecto a  $\bar{y}$ ,  $(y_i - \bar{y})$ ; la potencia elevada al cuadrado de ambas diferencias



$(x_i - \bar{x})^2$  y  $(y_i - \bar{y})^2$  y el producto de  $(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$ . Con base en estos valores, se estimó la ecuación de la recta que más se ajusta para los datos de las curvas de calibración y su respectivo coeficiente de correlación. Adicionalmente, se estimó la desviación estándar de los residuos de  $y$  ( $S_{y/x}$ ), la desviación estándar de la pendiente ( $S_b$ ) y la desviación estándar del intercepto ( $S_a$ ). En la **Tabla 8-6** se presentan las ecuaciones para realizar estos cálculos.

**Tabla 8-6:** Cálculo del coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto.

Coeficiente de correlación (r)	$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$
Pendiente (b)	$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$
Intercepto (a)	$a = \bar{y} - b\bar{x}$
$S_{y/x}$	$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$
$S_b$	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$
$S_a$	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$

Fuente (44)

- Pruebas estadísticas para determinar si hay regresión lineal entre las variables (datos de la recta no ponderada).

Prueba *t student* para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación (recta no ponderada)

Se realizaron pruebas de contraste de hipótesis para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación, aplicando pruebas de *t student* con los criterios de aceptación que se indican en la **Tabla 8-7**.

**Tabla 8-7:** Tratamiento estadístico pruebas de hipótesis para el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto.

Pruebas Hipótesis	Hipótesis nula	Estimativo	Criterios de aceptación
Coefficiente de correlación (r)	No hay regresión	$t_r = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	- $r > 0,900$ . - $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}} (0,05; n-2)$
Intercepto (a)	$a = 0$	$t_a = \frac{a}{S_a}$	- $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}} (0,05; n-2)$
Pendiente (b)	$b = 0$	$t_b = \frac{b}{S_b}$	- $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}} (0,05; n-2)$

n: número de datos.  
 $r^2$ : Coeficiente de determinación.  
 $S_a$ : desviación estándar del intercepto.  
 $S_b$ : desviación estándar de la pendiente.

Fuente (39,44)

Análisis de varianza de la regresión no ponderada.

Para determinar si entre las variables concentración de monóxido de carbono total en  $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y la respuesta instrumental hay una buena correlación y no se presenta desvío de la linealidad, se realizó un análisis de varianza de la regresión utilizando el estadístico *F Fisher*. En la **Tabla 8-8** se muestran las ecuaciones, las hipótesis y los criterios de aceptación que fueron empleados para el análisis de varianza

**Tabla 8-8:** Análisis de varianza de la regresión no ponderada.

Desviación estándar de la linealidad	$S_{xx} = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}$				
Desviación estándar de la regresión	$S_{xy} = \frac{\sum xy - (\sum x \sum y)}{n}$				
Suma de cuadrados para la regresión	$SC_r = \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}$				
Suma de cuadrados del error puro	$SC_{ep} = \sum y^2 - \frac{\sum \sum (y_j)^2}{m}$				
Suma de cuadrados para el desvío de la linealidad	$SC_{dl} = SC_{ec} - SC_r$				
Suma de cuadrados entre concentraciones	$SC_{ec} = \frac{\sum \sum (y_j)^2}{m} - \frac{(\sum \sum y)^2}{n}$				
k	Concentraciones trabajadas.				
m	Número de réplicas				
n	Número total de determinaciones $n = m \cdot k$				
Hipótesis de la regresión.					
Hipótesis nula: No hay diferencia significativa entre las concentraciones.					
Hipótesis alternativa: Hay diferencia significativa entre las concentraciones.					
Hipótesis de la linealidad.					
Hipótesis nula: No hay diferencia significativa dentro de las concentraciones.					
Hipótesis alternativa: Hay diferencia significativa dentro de las concentraciones.					
Nivel de confianza: 95%					
Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Criterio de aceptación
Regresión (r)	1	$SC_r$	$\frac{SC_r}{1}$	$\frac{CM_r}{CM_{er}}$	$F_{exp} > F_{tabla}$
Linealidad (dl)	k-2	$SC_{dl}$	$\frac{SC_{er} - SC_{ep}}{k-2}$	$\frac{CM_{dl}}{CM_{ep}}$	$F_{exp} < F_{tabla}$
Error puro (ep)	n-k	$SC_{ep}$	$\frac{SC_{ep}}{n-k}$		

Fuente (39)

- Prueba de *Cochran* para la igualdad varianzas.

Para determinar si el modelo es homo o heterocedástico, se realizó una prueba de *Cochran* a partir del cálculo de la varianza de la relación de áreas para los iones  $m/z$  28 y 29 en cada nivel de concentración y se contrastó la hipótesis nula, que la varianza de la variable  $y$  es la misma en todos los puntos de la curva de calibración (**Tabla 8-9**).

**Tabla 8-9:** Test de *Cochran*

Hipótesis nula	$s_1^2 = s_2^2 = s_k^2$
Hipótesis alternativa	Por lo menos, la varianza de $y$ es diferente en un punto de la curva de calibración.
Nivel de confianza	95%
G experimental	$\frac{\text{El mayor } s_k^2}{\sum_{K=1}^k s_k^2}$
Se acepta la hipótesis nula	Si G experimental < G tabla $(0,05; k; n)$

Fuente (45)

- Método de mínimos cuadrados ponderados.

Para modelos heterocedásticos, los datos son tratados por métodos de regresión ponderada, dando a cada punto de la recta, se le da “una ponderación inversamente proporcional a la respectiva varianza  $S_i^2$ ” (44).

Para efectuar los cálculos, se estimó por nivel de concentración, el promedio de las relaciones de áreas ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar ( $S_i$ ), la varianza ( $S_i^2$ ) y la varianza inversa ( $S_i^{-2}$ ). Luego, se determinó cada una de las ponderaciones  $w_i$ , para los puntos  $(x_i, y_i)$ , aplicando la **Ecuación (8-2)**. Con la **Ecuación (8-3)** se calculó la pendiente ponderada ( $b_w$ ) y con la **Ecuación (8-4)**, el intercepto ponderado ( $a_w$ ) (44).

$$w_i = \frac{S_i^{-2}}{\sum_i s_i^2/n} \quad (8-2)$$

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (8-3)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w \quad (8-4)$$

- Análisis de varianza de la regresión ponderada.

Más tarde se aplicó un análisis de varianza para la evaluación de la linealidad que exigió ponderar también, cada uno de los casos de acuerdo con los valores de la variable de ponderación  $w_i$ , de forma que las sumas cuadráticas ponderadas se determinaron conforme se muestra en la **Tabla 8-10**. El criterio de aceptación para esta ANOVA es rechazar la hipótesis nula ( $b = 0$ ) si F experimental es mayor que el F tabla  $(0,05;1; n-2)$ (46).

**Tabla 8-10:** Análisis de varianza para evaluar la linealidad en regresión ponderada

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	Criterio de aceptación
Regresión	1	$\sum w_i^*(\check{y}_i - \bar{y}_w)^2$	$\frac{SC_{mod}}{1}$	$CM_{mod}$	$F_{exp} > F_{tabla(0,05;1; n-2)}$
				$CM_{resid}$	
Residual	n-2	$SC_{total} - SC_{Mod}$	$\frac{SC_{total} - SC_{Mod}}{n-2}$		
Total	n-1	$\sum w_i^*(y_i - \bar{y}_w)^2$	$\frac{SC_{total}}{n-1}$		

Fuente: Adaptado de (44,46)

- **La concentración y su error aleatorio**

Una vez se determinó la ecuación de la regresión con residuales heterocedásticos y se comprobó que la relación de las variables es lineal, se calculó la concentración de monóxido de carbono total en  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  ( $x_o$ ) que corresponde a cada una de las señales ( $y_o$ ) obtenidas al valorar las diferentes soluciones de referencia y muestras.

Para determinar el error aleatorio correspondiente a cada valor de concentración ( $Sx_{ow}$ ), se estimó la desviación estándar de los residuos de y de la recta de regresión ponderada ( $S_{(y/x)_w}$ ) (**Ecuación (8-5)**) y se realizó una ponderación ( $w_o$ ) del valor  $y_o$ . Con este el error aleatorio ( $Sx_{ow}$ ) (**Ecuación (8-6)**) y el valor  $t_{(0,05; n-2)}$ , se calculó el respectivo intervalo de confianza.

$$S_{(y/x)_w} = \left\{ \frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2} \quad (8-5)$$

$$S_{x_{ow}} = \frac{S_{(y/x)_w}}{b} \left[ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right]^{1/2} \quad (8-6)$$

- **Límite de detección.**

Se estimó el límite de detección con base a la desviación estándar del intercepto ( $s_a$ ) y a la pendiente ( $b$ ) de la curva de calibración realizada entre 0,10  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  y 2,99  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ , aplicando la **Ecuación (8-7)**.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sqrt{\sum s_b^2 \left( \frac{\sum x^2}{n} \right)}}{b} \quad (8-7)$$

Luego, se valoraron por triplicado, soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,05  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  y 0,025  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$  para estimar en la respuesta cromatográfica de ambas soluciones, la relación señal ruido para el ion  $m/z$  28. Debido a que los picos cromatográficos son amplios y al disminuir la concentración del analito de interés, estos se achatan, se empleó el algoritmo RMS (root-mean-square) con base al área de la señal y se delimitó la región del ruido entre 12,0 minutos y 17,5 minutos.

Se estableció como criterios de aceptación para el límite de detección que el coeficiente de variación con respecto al tiempo de retención absoluto para el ion  $m/z$  28 sea menor o igual que 2% y que su respuesta sea por lo menos, tres veces la relación señal ruido (calculada con base al área de la señal).

- **Límite de cuantificación.**

Se estimó el límite de cuantificación con base a la desviación estándar del intercepto (sa) y a la pendiente (b) de la curva de calibración realizada entre 0,10  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 2,99  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , aplicando la **Ecuación (8-8)**.

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sqrt{\sum s_b^2 \left( \frac{\sum x^2}{n} \right)}}{b} \quad (8-8)$$

Luego, se valoraron por triplicado, soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 0,10  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  para estimar en la respuesta cromatográfica de ambas soluciones, la relación señal ruido para el ion  $m/z$  28. Debido a que los picos cromatográficos son amplios y al disminuir la concentración del analito de interés, estos se achatan, se empleó el algoritmo RMS (root-mean-square) con base al área de la señal y se delimitó la región del ruido entre 12,0 minutos y 17,5 minutos.

Como criterios de aceptación para el límite de cuantificación, se estableció que el coeficiente de variación para el tiempo de retención para el ion  $m/z$  28 debe ser menor o igual que 2%, el coeficiente de variación para la relación de áreas de las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 ( $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ ) debe ser menor o igual que 20%, la respuesta del analito de interés debe ser como mínimo, diez veces la relación señal ruido (calculada con base al área de la señal) y su porcentaje de recuperación debe estar entre el 80% y 120%.

- **Exactitud.**

Se determinó la exactitud en términos de porcentaje de recuperación a partir de los resultados obtenidos de la valoración de soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,36  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,85  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 1,94  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Para cada una de las soluciones, se estimó la relación de áreas para las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 ( $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ ), la concentración experimental y el porcentaje de recuperación con base en la concentración teórica.



Se estableció como criterio de aceptación que el porcentaje de recuperación debe estar entre el 85 % y 115 %.

- **Precisión.**

- Repetibilidad.

Se determinó la repetibilidad en términos de coeficiente de variación a partir de los resultados obtenidos de la valoración de soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 0,36  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 0,85  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$  y 1,94  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ .

Como criterio de aceptación se estableció que el coeficiente de variación para la relación de áreas de las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 ( $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ ) debe ser menor o igual que 15%, excepto para el límite de cuantificación que no debe ser mayor del 20% (39).

- Precisión intermedia.

En dos días diferentes, dos analistas prepararon y valoraron soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ .

Por día y analista, se estimó la relación de áreas para las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 ( $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ ) y sus respectivos coeficientes de variación.

Como criterio de aceptación, se estableció que el coeficiente de variación global para la relación de áreas de las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 ( $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ ) debe ser menor o igual que 15% (39).

### **8.9.11. Soluciones control.**

- Valoración inicial de los controles.

Fueron valoradas por triplicado, las soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,36  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,85  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 1,94  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Después, para cada solución, se estimó la concentración promedio, su desviación estándar y el coeficiente de variación.

El criterio de aceptación para la valoración inicial de los controles fue que el coeficiente de variación para las determinaciones por concentración debe ser menor o igual que 15%.

Luego, con base en la concentración promedio y el valor de dos desviaciones estándar, se determinaron los límites de concentración para las soluciones control que serán valorados durante el análisis de muestras.

- Valoración de los controles durante cada corrida analítica con muestras o soluciones de Cooximetría.

Para asegurar la calidad de los resultados obtenidos, se estableció que, por corrida analítica, se emplearía un juego de tres soluciones control cada 10 muestras y al finalizar la secuencia (soluciones acuosas de ácido fórmico equivalentes a 0,36  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ , 0,85  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 1,94  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .)

Como criterio de aceptación para la corrida analítica, se definió que la concentración de monóxido de carbono total de cada una de las soluciones control debe estar entre los límites establecidos.

### **8.9.12. Incertidumbre del método.**

La incertidumbre del método para determinación de la concentración de monóxido de carbono total se calculó con base en la expresión  $s/\sqrt{N}$ , en donde  $s$  es la desviación estándar de la relación de áreas de los iones  $m/z$  28 y 29 por nivel de concentración y  $N$  es el número de determinaciones por nivel. Para el cálculo de la incertidumbre expandida, se multiplicó por el factor de cobertura ( $k = 2$ ) cada uno de los resultados de incertidumbre obtenidos.

## **8.10. Consideraciones Éticas.**

De acuerdo con la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, la presente investigación se clasifica como de riesgo mínimo ya que se realiza el análisis de muestras de sangre extraídas por punción venosa en adultos que gozan de un óptimo estado de salud (47).

La presente investigación cuenta con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de La Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, otorgado mediante el Acta de evaluación N° 006-071-17 del 27 de abril de 2017 (Anexo B).

Todos los sujetos de estudio aceptaron, voluntariamente, su participación en el estudio firmando el consentimiento cuyo modelo se muestra en el Anexo C.

Los investigadores del presente estudio declaramos que no existen conflictos de interés.

## 9. Resultados y Discusión

### 9.1. Estabilidad a Corto Plazo de la Carboxihemoglobina por UV/Vis.

Durante los dieciséis días del estudio, se efectuó por anticoagulante, un total de 48 valoraciones de la concentración de carboxihemoglobina y en la **Tabla 9-1** se muestra en detalle, la distribución de estas y la concentración promedio obtenida para cada uno de los tubos.

**Tabla 9-1:** Observaciones por tipo de anticoagulante y concentración de carboxihemoglobina.

Anticoagulante	Rango %COHb	tubo	Datos recolectados (n)	Concentración promedio de carboxihemoglobina
EDTA	<10%	N°1	n: 12.	5 ± 2 %
	10%- 20%*	N°2	n: 13.	13 ± 1 %
	21%- 49%*	N°3	n: 11.	30 ± 1 %
		N°4	n: 12.	34 ± 2 %
Citrato de sodio	<10%	N°1	n: 12.	6 ± 1 %
	10%- 20%*	N°2	n: 12.	13 ± 1 %
	21%- 49%*	N°3	n: 12.	35 ± 1 %
		N°4	n: 12.	45 ± 1 %
Heparina sódica	<10%	N°1	n: 12.	4 ± 1 %
	10%- 20%*	N°2	n: 12.	12 ± 1 %
	21%- 49%*	N°3	n: 12.	35 ± 1 %
	≥50%*	N°4	n: 12.	56 ± 1 %

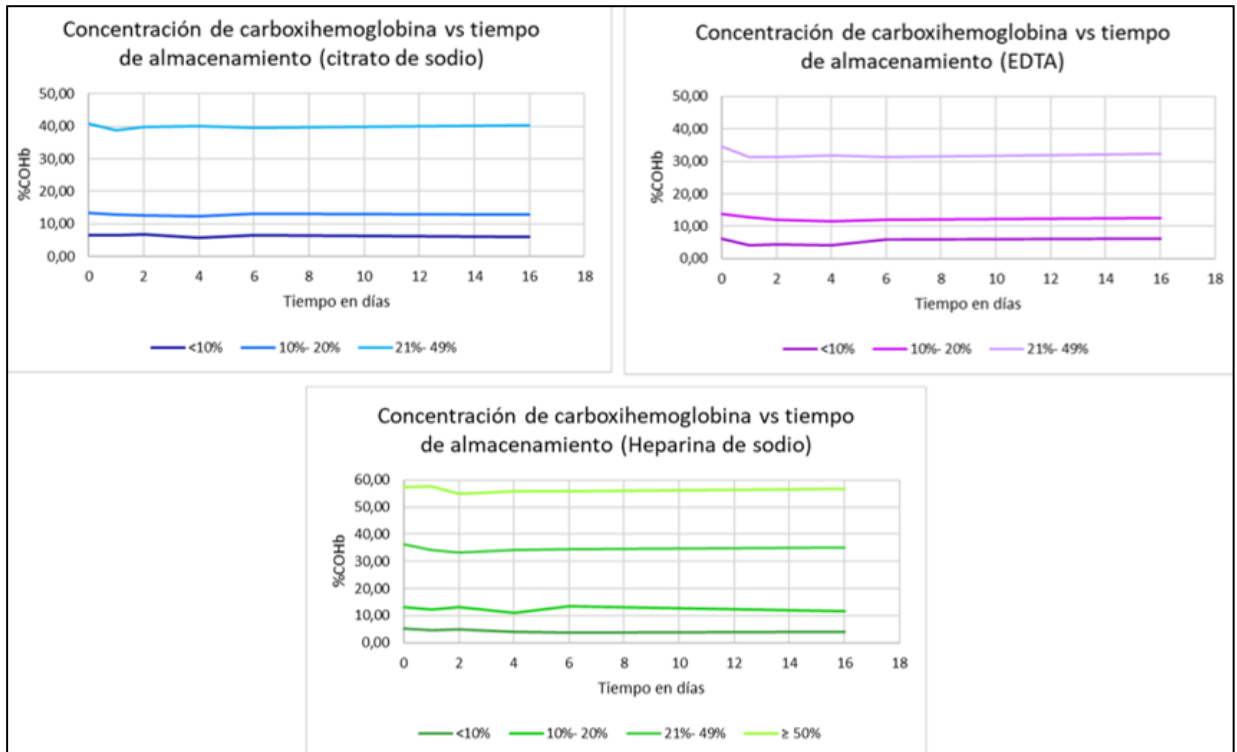
\* Concentración obtenida a partir de un proceso de saturación con CO.

Fuente: Elaboración propia.

Con un nivel confianza del 95%, se realizó un análisis de varianza multifactorial y se encontró que los factores que afectaron significativamente la concentración de carboxihemoglobina fueron el rango de concentración (p-valor: < 2e-16), el tipo de anticoagulante (p-valor < 2e-16) y la interacción entre estos dos (p-valor: 1,15e-05).

Además, el coeficiente de correlación ( $R^2$ : 0,9654) y el p-valor ( $< 2e-16$ ) para el modelo experimental indicó que el 96% de la variabilidad en la concentración de la carboxihemoglobina ocurrió por los efectos significativos de los factores y la interacción mencionados anteriormente (Ver Anexo N).

**Figura 9-1:** Gráficos de la variación de la carboxihemoglobina en el tiempo de almacenamiento por anticoagulante.



Fuente: Elaboración propia.

En la **Figura 9-1** se aprecia el efecto del tiempo en la concentración de carboxihemoglobina para cada anticoagulante. De acuerdo con el análisis realizado, el almacenamiento de las muestras durante dieciséis días no afectó significativamente la concentración de carboxihemoglobina (p-valor: 0,930).

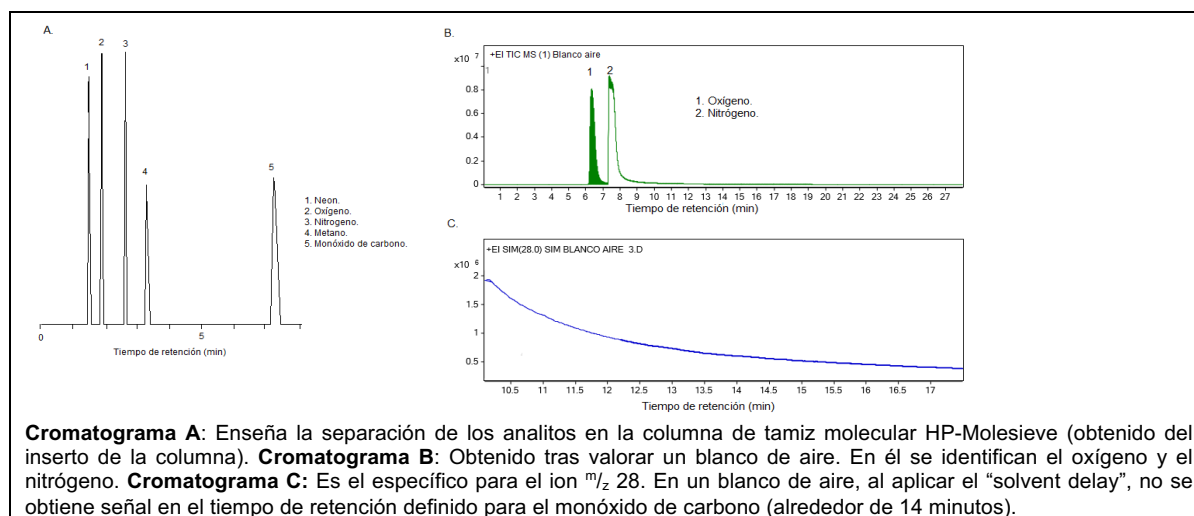
## 9.2. Validación de la Metodología Analítica para la Determinación de Monóxido de Carbono Total

### 9.2.1. Selectividad

#### ▪ Nitrógeno.

Fue mandatorio durante el desarrollo de la metodología, garantizar que el nitrógeno no interfiriera en el análisis puesto que, además de ser el mayor componente del aire, este es retenido por la columna analítica y el ion  $m/z$  28 también es característico de su patrón de fragmentación molecular. Lo anterior se logró con la programación de encendido del filamento en un tiempo mayor al de su elución (**Figura 9-2**).

**Figura 9-2:** Separación de analitos en la columna de tamiz molecular.



Fuente: Elaboración propia.

#### ▪ Oxígeno.

A pesar de que este compuesto no presenta un patrón de fragmentación similar al del monóxido de carbono, fue indispensable evitar su posible interferencia en el análisis, ya que, así como el nitrógeno, es separado por la columna analítica y se encuentra disponible en el aire en altas concentraciones.

- **Monóxido de carbono marcado ( $^{13}\text{CO}$ ).**

Durante el desarrollo de la investigación, se empleó como estándar interno, una solución de ácido fórmico marcado con carbono trece ( $\text{H}^{13}\text{COOH}$ ) la cual, al reaccionar con el ácido sulfúrico concentrado produce monóxido de carbono marcado ( $^{13}\text{CO}$ ). Debido a que su diferencia con el analito de interés radica en la presencia de un neutrón adicional, ambos presentan señales cromatográficas en tiempos de retención similares.

Por otra parte, se evidenció que, cuando se emplea agua en cambio de la solución acuosa de ácido fórmico, no se genera señal para el ion  $m/z$  28 (**Tabla 9-2**) y cuando no se adiciona el estándar interno a una muestra de sangre, se obtiene respuesta del ion  $m/z$  29 que equivale, en promedio, al 1,17% del área del ion  $m/z$  28, valor que coincide con lo reportado en la librería de espectros de masas (**ver Figura 9-3**).

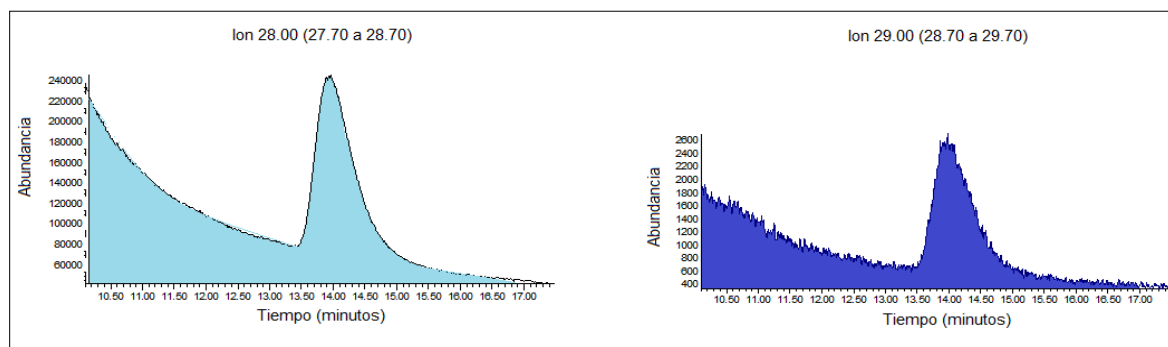
**Tabla 9-2:** Tiempos de retención de los iones  $m/z$  28 y 29 en las curvas de calibración realizadas en medio acuoso.

Tiempo de retención (minutos)	Ion $m/z$ 28			Ion $m/z$ 29		
0,00 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,000	0,000	0,000	14,198	14,177	14,156
	0,000	0,000	0,000	14,182	14,159	14,150
	0,000	0,000	0,000	14,198	14,156	14,140
0,10 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	14,134	14,119	14,076	14,187	14,166	14,145
	14,124	14,108	14,060	14,193	14,166	14,129
	14,129	14,108	14,092	14,187	14,187	14,140
0,25 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	14,135	14,135	14,108	14,177	14,172	14,156
	14,150	14,124	14,113	14,198	14,177	14,129
	14,140	14,103	14,076	14,187	14,156	14,140

(Continuación Tabla 9-2)

Tiempo de retención (minutos)	Ion $m/z$ 28			Ion $m/z$ 29		
0,51 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	14,140	14,097	14,103	14,182	14,150	14,145
	14,140	14,131	14,092	14,182	14,166	14,156
	14,129	14,108	14,113	14,193	14,161	14,135
1,01 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	14,150	14,097	14,097	14,171	14,145	14,145
	14,140	14,103	14,092	14,171	14,140	14,134
	14,140	14,113	14,087	14,156	14,119	14,145
2,99 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	14,029	13,997	13,928	14,045	14,071	13,965
	14,002	13,997	13,918	14,045	14,050	13,960
	13,992	13,992	13,934	14,050	14,050	13,987

Fuente: Elaboración propia.

**Figura 9-3:** Muestra de sangre sin estándar interno ( $\text{H}^{13}\text{COOH}$ ).

Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar si la respuesta del ion  $m/z$  29 proveniente del  $^{12}\text{CO}$  interfiere en la relación de áreas  $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$ , se realizó un análisis de varianza de un factor con los datos obtenidos de 215 determinaciones y con una confianza del 95% se demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa en la relación de áreas  $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$  cuando se resta o no del área total del ion  $m/z$  29, la cantidad que proviene del  $^{12}\text{CO}$  (valor  $F_{\text{experimental}} = 0,40 < \text{valor } F_{\text{de la tabla}}(0,05; 1; 428) = 3,86$ ) (**Tabla 9-3**).



**Tabla 9-3:** Análisis de varianza efecto del ion  $m/z$  29 proveniente de  $^{12}CO$ 

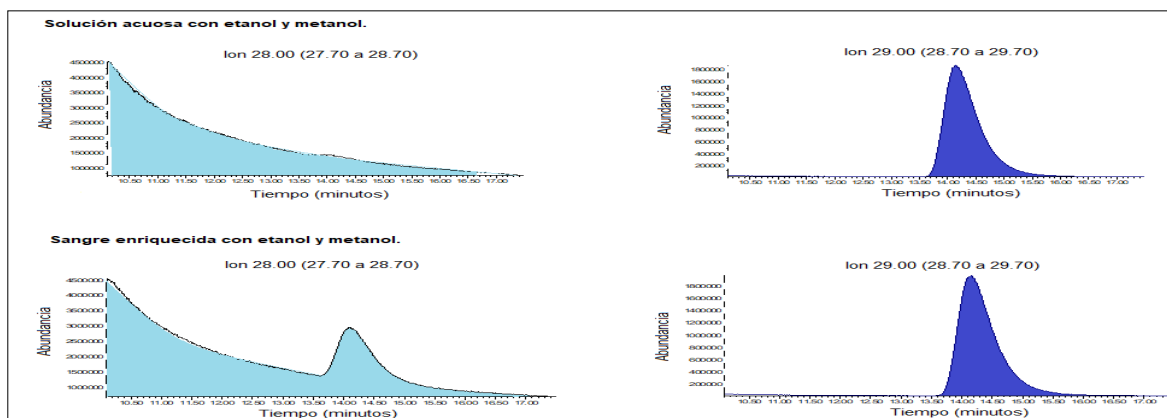
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tabla <sub>(0,05;1;428)</sub>
Entre grupos	1,73	1,00	1,73	0,40	3,86
Dentro de los grupos	1901,50	428,00	4,44		
Total	1903,23	429,00			

Fuente: Elaboración propia.

- **Otros compuestos volátiles.**

El etanol, metanol y cianuro son compuestos volátiles cuya determinación se realiza principalmente, a partir de metodologías bioanalíticas basadas en los principios del análisis por *Headspace* o espacio de cabeza. Para establecer si estos analitos son interferentes en la determinación de monóxido de carbono por GC-MS, se evaluaron soluciones acuosas y muestras de sangre total enriquecidas previamente con dichos compuestos. Como resultado, se evidenció para el ion  $m/z$  28 que en las soluciones acuosas no se presentaron señales cromatográficas en todo el tiempo de la corrida analítica, pero en el caso de las muestras enriquecidas, sí, pues al contener monóxido de carbono disuelto y unido a la hemoglobina, se va a producir su extracción con el tratamiento de la muestra (**Figura 9-4**).

**Figura 9-4:** Cromatogramas para soluciones acuosas y muestras de sangre enriquecidas con etanol y metanol.



Fuente: Elaboración propia.

### 9.2.2. Linealidad

- Sistema (medio acuoso).

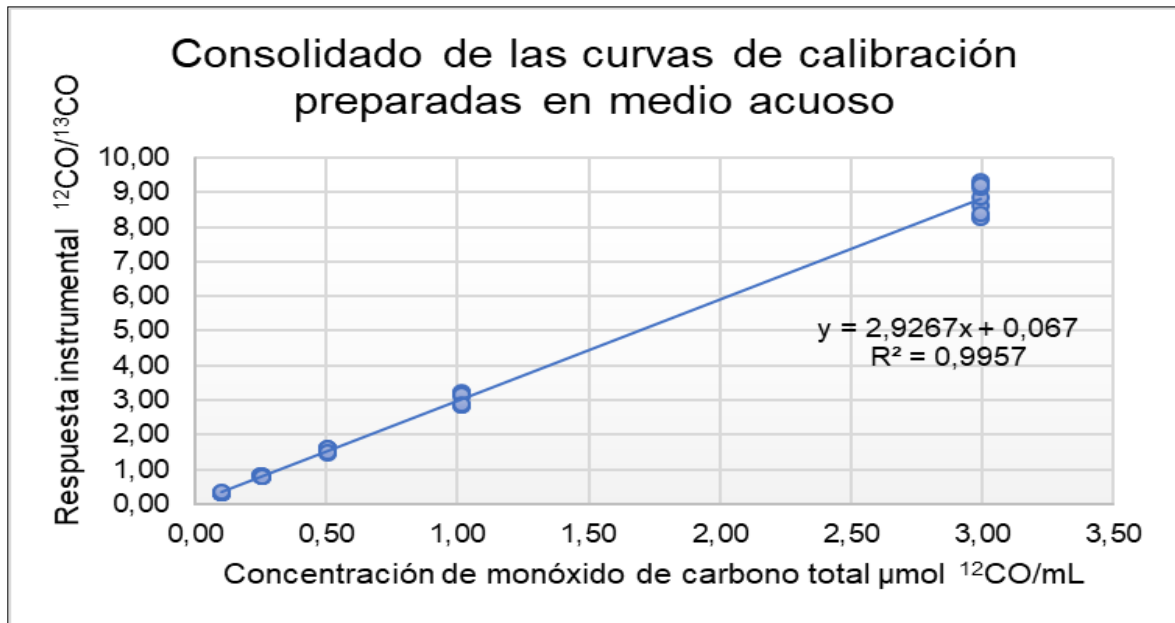
En tres días diferentes, se prepararon y valoraron tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración entre 0,10  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 2,99  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y tres réplicas por nivel (39). La respuesta instrumental se calculó a partir de la relación de áreas de las señales de los iones  $m/z$  28 y 29 que corresponden al monóxido de carbono ( $^{12}\text{CO}$ ) y el monóxido de carbono marcado ( $^{13}\text{CO}$ ), respectivamente. Los resultados se encuentran en la **Tabla 9-4**.

**Tabla 9-4:** Curvas de calibración en agua para la determinación de monóxido de carbono.

Nivel de concentración	Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	Relación de áreas			Promedio	Desviación estándar
		Día 1	Día 2	Día 3		
2	0,10	0,32	0,32	0,32	0,33	0,01
	0,10	0,32	0,33	0,33		
	0,10	0,31	0,34	0,34		
3	0,25	0,83	0,79	0,80	0,81	0,02
	0,25	0,84	0,78	0,82		
	0,25	0,83	0,81	0,79		
4	0,51	1,57	1,57	1,45	1,56	0,07
	0,51	1,63	1,63	1,48		
	0,51	1,56	1,62	1,50		
5	1,01	3,20	3,20	2,82	3,07	0,17
	1,01	3,24	3,18	2,83		
	1,01	3,11	3,17	2,89		
6	2,99	9,33	9,25	8,30	8,82	0,44
	2,99	8,62	9,14	8,25		
	2,99	8,84	9,23	8,39		

Fuente: Elaboración propia.

Al inspeccionar el gráfico de dispersión, se evidenció que aparentemente hay una relación lineal entre la respuesta instrumental y la concentración de monóxido de carbono total en  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (**Figura 9-5**).

**Figura 9-5:** Gráfico de dispersión - curvas de calibración en medio acuoso.

Fuente: Elaboración propia.

- Distribución de los residuos.

En el contexto de la regresión lineal, se conoce con el nombre de residuos a la diferencia entre los valores observados de la variable dependiente (relación de áreas iones  $m/z$  28 y 29) y los valores que se predicen a partir de la recta de regresión.

Dependiendo de la distribución de los residuos, estos pueden ser homocedásticos o heterocedásticos. Los residuos homocedásticos presentan una varianza  $S^2_{y/x}$  independiente de la variable  $x$ , mientras que en los residuos heterocedásticos, la varianza  $S^2_{y/x}$  depende de la variable  $x$ .

Como los modelos de regresión cambian según la distribución de los residuos, se recomienda antes de ajustar una curva, determinar el tipo de modelo para establecer si se ajusta a una recta ponderada o no ponderada (46). Para ello, se puede realizar la prueba de *Cochran*, el criterio de *Barlett* o la prueba de *Levene* (45).

Al realizar la prueba de *Cochran* con los datos de las curvas de calibración preparadas en medio acuoso, se demostró con un nivel de confianza del 95% y un  $G_{\text{experimental}}$  mayor que el  $G$  de la tabla (0,05; 9; 6) (0,846 > 0,381), que la varianza de la relación de áreas para los iones  $m/z$  28 y 29 es estadísticamente diferente en por lo menos, un punto de concentración de monóxido de carbono total (ver **Tabla 9-5**).

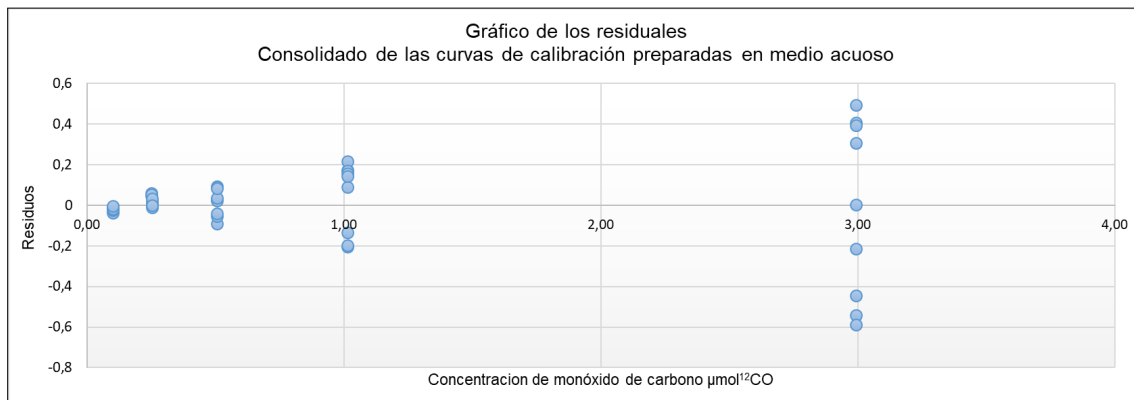
Al graficar la distribución de los residuos en función de la concentración de monóxido de carbono total, se observó que la varianza de los residuos de  $y$  ( $S^2_{y/x}$ ) depende de la variable  $x$ , aumentando cuando aumenta la concentración de monóxido de carbono total (**Figura 9-6**)

**Tabla 9-5:** Prueba de *Cochran* para varianzas.

Hipótesis nula	$S^2_{(0,10)} = S^2_{(0,25)} = S^2_{(0,51)} = S^2_{(1,01)} = S^2_{(2,99)}$		
Hipótesis alternativa	Por lo menos, hay una varianza que es diferente.		
Nivel de confianza	95%		
Concentración	Varianza	Datos para la toma de decisión	
0,10 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,00010	G experimental	0,846
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,00049	G tabla (0,05; n = 9; k = 5)	0,438
0,51 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,0045	Conclusión: Con una confianza del 95%, se rechaza la hipótesis nula.	
1,01 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,0298		
2,99 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,1922		

Fuente: Elaboración propia.

**Figura 9-6:** Gráfico de residuos de la variable  $y$  – curvas de calibración en medio acuoso.



Fuente: Elaboración propia.

- Recta de regresión ponderada.

Los parámetros de regresión ponderada se calculan a partir de los valores  $(x_i, y_i)$  pero atribuyendo a cada observación de  $y_i$ , un peso  $w_i$  que es el inverso de la estimación corregida de la variable  $y$  para el valor  $x_i$  de la variable  $x$  (44,46). Aplicando el método por mínimos cuadrados ponderados a los datos de las curvas de calibración, se determinó que la ecuación de la recta de regresión ponderada es  $y = 3,035 x + 0,024$ . En la **Tabla 9-6** se enseñan los resultados para el método de regresión.

**Tabla 9-6:** Cálculo de la recta de regresión por mínimos cuadrados ponderados.

Concentración	$x_i$	$y_i$	$S_i$	$S_i^2$	$1/S_i^2$	$w_i$	$wix_i$	$wiy_i$	$wixiy_i$	$wix_i^2$
0,10 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	0,10	0,32	0,01	0,0001	9884,199	4,053	0,407	1,316	0,132	0,041
0,25 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	0,25	0,81	0,02	0,0005	2047,709	0,840	0,213	0,682	0,173	0,054
0,51 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	0,51	1,56	0,07	0,0045	222,736	0,091	0,046	0,142	0,072	0,023
1,01 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	1,01	3,07	0,17	0,0298	33,581	0,014	0,014	0,042	0,043	0,014
2,99 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	2,99	8,82	0,44	0,1922	5,204	0,002	0,006	0,019	0,056	0,019
suma	4,87	14,58	0,71	0,2270	12193,428	5,000	0,686	2,201	0,476	0,152
promedio	0,97	2,92	0,14	0,0454	2438,686	1,000	0,137	0,440	0,095	0,030
Concentración	$\hat{y}_i$	$y_i - \bar{y}_w$	$(y_i - \bar{y}_w)^2$	$w_i(y_i - \bar{y}_w)^2$	$(\hat{y}_i - \bar{y}_w)$	$(\hat{y}_i - \bar{y}_w)^2$	$w_i(\hat{y}_i - \bar{y}_w)^2$			
0,10 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	0,328	-0,116	0,013	0,054	-0,112	0,013	0,051			
0,25 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	0,793	0,372	0,138	0,116	0,353	0,125	0,105			
0,51 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	1,563	1,116	1,245	0,114	1,123	1,260	0,115			
1,01 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	3,102	2,632	6,927	0,095	2,661	7,084	0,098			
2,99 $\mu\text{mol}^{12}\text{CO}$	9,111	8,377	70,172	0,150	8,671	75,183	0,160			
suma	14,897	12,381	78,496	0,529	12,696	83,664	0,529			
promedio	2,979	2,476	15,699	0,106	2,539	16,733	0,106			
a =	0,024				b =	3,035				

Fuente: Elaboración propia.

- Análisis de varianza para la verificación de la existencia de la regresión lineal entre las variables.

Con una confianza del 95% y un  $F_{\text{experimental}}$  mayor que el  $F_{\text{de la tabla}}$  (0,05; 1; 3) (2880,07 > 10,13), se demostró que existe una relación lineal entre las variables “relación de áreas de los iones  $m/z$  28 y 29” y “la concentración de monóxido de carbono total” en el modelo de regresión lineal ponderado (**Tabla 9-7**). Así mismo, con base en la suma de cuadrados de la regresión y la suma de cuadrados total, se determinó que, para la regresión ponderada, el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es 0,9990 y el coeficiente de correlación ( $r$ ) es 0,9995.

**Tabla 9-7:** Resultado ANOVA recta ponderada.

Hipótesis nula		b = 0			
Hipótesis alternativa		b ≠ 0			
Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F experimental	F tabla (0,05; 1;3)
Regresión	1	0,53	0,53	2880,07	10,13
Residual	3	0,00	0,00		
Total	4	0,53	0,13		

Fuente: Elaboración propia.

- Comparación entre las rectas ponderada y no ponderada.

Los efectos de ponderación evidenciados para los datos de la curva de concentración de monóxido de carbono total fueron la disminución del valor del intercepto en el eje y (44) y el aumento del valor de la pendiente, situaciones que permitieron que los coeficientes de determinación y de correlación se acercaran más a la unidad (**Tabla 9-8**).

**Tabla 9-8:** Comparación de las rectas ponderada y no ponderada.

Recta ponderada		Recta no ponderada	
Pendiente	3,035	Pendiente	2,927
Intercepto	0,024	Intercepto	0,066
Coefficiente de determinación	0,9990	Coefficiente de determinación	0,9957
Coefficiente de correlación	0,9995	Coefficiente de correlación	0,9979

(Continuación Tabla 9-8)

Recta ponderada		Recta no ponderada	
Relación Áreas $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$	Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	Relación Áreas $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$	Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$
0,32	0,099	0,32	0,088
0,81	0,260	0,81	0,255
1,56	0,505	1,56	0,509
3,07	1,004	3,07	1,027
8,82	2,897	8,82	2,990

Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la predicción de la concentración de monóxido de carbono total con base en la relación de áreas para las señales de los iones  $m/z$  28 y 29, los resultados de ambos métodos proporcionan valores sin diferencias estadísticamente significativas, afirmación que se demostró con un análisis de varianza aplicada a dos grupos de datos obtenidos al calcular la concentración por ambas rectas de regresión cuando se tienen como relación de áreas  $^{12}\text{CO}/^{13}\text{CO}$  los valores: 0,32, 0,81, 1,56, 3,07 y 8,82 ( $F_{\text{experimental}} = 0,0008 < F_{\text{tabla}(0,05;1;8)} = 5,32$ ) (**Tabla 9-9**).

**Tabla 9-9:** Comparación de las concentraciones obtenidas por ambas ecuaciones de regresión .

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tabla
Entre grupos	0,00	1,00	0,00	0,001	5,32
Dentro de los grupos	10,78	8,00	1,35		
Total	10,78	9,00			

Fuente: Elaboración propia.

En la práctica, se tiende a subvalorar los métodos de regresión ponderada por la complejidad en sus cálculos y la proximidad en la estimación de las concentraciones con base en una respuesta instrumental en comparación con métodos de regresión no ponderada. Pero una ventaja que presentan los métodos de regresión ponderada se basa en la capacidad de proporcionar valores más reales para los errores (44), por ello, la

amplitud de los límites de confianza ponderados es mayor en los puntos de la curva de calibración con concentración más alta de monóxido de carbono (**Tabla 9-10**).

**Tabla 9-10:** Comparación de los límites de confianza entre los métodos de regresión ponderados y no ponderados.

$y_o$	No ponderada		Ponderada	
	$x_o$	LC (95%)	$x_o$	LC (95%)
0,32	0,11	0,04	0,10	0,01
0,81	0,27	0,04	0,26	0,02
1,56	0,52	0,04	0,50	0,05
3,07	1,03	0,04	1,00	0,11
8,82	2,95	0,04	2,90	0,38

Fuente: Elaboración propia.

- **Método.**

- Glóbulos rojos.

Empleando una solución de glóbulos rojos pobres en leucocitos diluida con agua 50:50, se prepararon cinco soluciones de ácido fórmico con concentración equivalente a 0,00  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 0,10  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 0,51  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ , 1,01  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$  y 2,99  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$ . Con estas soluciones se preparó una única curva de calibración cuya respuesta instrumental promedio para cada nivel de concentración, se presenta en la **Tabla 9-11**.

**Tabla 9-11:** Curva de calibración en matriz de glóbulos rojos.

Nivel de concentración	Concentración $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$	Relación de áreas promedio
1	0,00	1,49
2	0,10	1,63
3	0,25	1,72
4	0,51	2,52
5	1,01	3,19
6	2,99	7,90

Fuente: Elaboración propia.



La ecuación de la línea recta que más se ajusta a estos datos es  $y = 2,1672x + 1,34$ , con una confianza del 95% y un F experimental mayor que el F crítico (**Tabla 9-12**), se demostró que existe una relación lineal entre las variables concentración de monóxido de carbono y respuesta instrumental.

**Tabla 9-12:** Análisis de Varianza de la regresión – glóbulos rojos.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tabla
Regresión	1	29,85	29,85	664,64	0,000013
Residuos	4	0,18	0,04		
Total	5	30,03			

Fuente: Elaboración propia

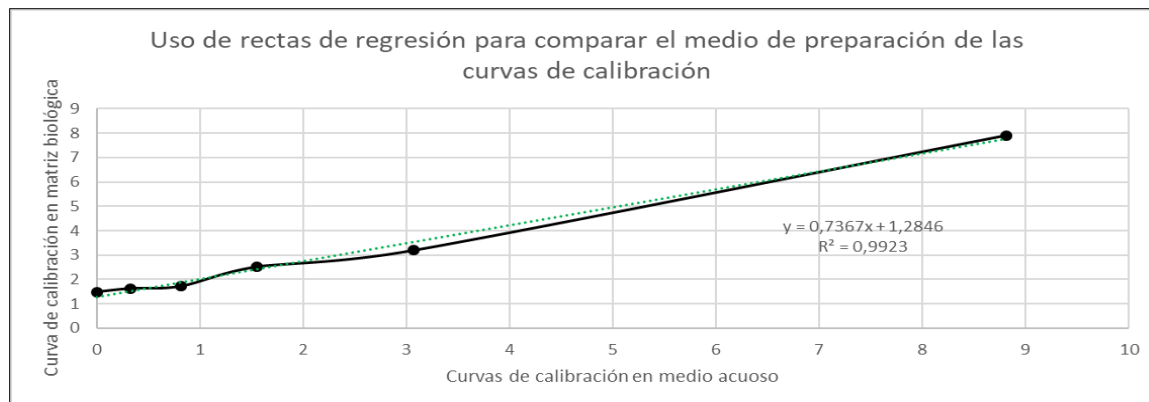
A diferencia de las curvas de calibración preparadas en agua, el intercepto de esta recta no pasa por cero (ver **Tabla 9-13**), evidenciándose que la solución de glóbulos rojos no produce un efecto matriz pues estos tienen una concentración basal de carboxihemoglobina y, por ende, de monóxido de carbono total. Al comparar las rectas de regresión no ponderadas obtenidas después de la valoración de las curvas de calibración en ambos medios (ver **Figura 9-7**), se concluye que las soluciones de ácido fórmico deben ser preparadas idealmente en medio acuoso.

**Tabla 9-13:** Evaluación de la linealidad del método en matriz de glóbulos rojos.

Pruebas para evaluar la linealidad.	Coefficiente de correlación	Pendiente	Intercepto
Valor	0,9960	2,1651	1,3208
Hipótesis nula ( $H_0$ )	el coeficiente de correlación es igual a cero	la pendiente es igual a cero	el intercepto es igual a cero
Hipótesis alternativa ( $H_1$ )	el coeficiente de correlación es diferente de cero	la pendiente es diferente de cero	el intercepto es diferente de cero
Número de datos (n)	6	6	6
Nivel de confianza ( $1 - \alpha$ )	95%	95%	95%
t experimental	22,3500	22,3500	10,4099
t tabla <sub>(0,05;52)</sub>	2,7764	2,7764	2,7764
Conclusión	Se rechaza $H_0$	Se rechaza $H_0$	Se rechaza $H_0$

Fuente: Elaboración propia.

**Figura 9-7:** Uso de rectas de regresión para comparar el medio de preparación de las curvas de calibración.



Fuente: Elaboración propia.

- Soluciones de Cooximetría.

Se valoraron por duplicado las soluciones calibradoras y de control de Cooximetría marca RNA Medical®, con números de producto CVC 223 y QC 253, con el fin de evaluar su uso en la preparación de las curvas de calibración en matriz biológica.

**Tabla 9-14:** Concentración de monóxido de carbono total en soluciones de Cooximetría.

Solución para Cooximetría			Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ promedio.	Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina promedio
CVC 223 Set 822334 Calibradores	Nivel 1	Lote 85131	0,51	66,30
	Nivel 2	Lote 84858	0,58	4,50
	Nivel 3	Lote 84954	0,83	16,80
	Nivel 4	Lote 85050	0,92	45,60
	Nivel 5	Lote 85231	0,96	96,04
QC 253 set 848840 Controles	Nivel 1	Lote 84858	0,60	4,77
	Nivel 2	Lote 84954	0,86	16,80
	Nivel 3	Lote 85050	0,92	45,60

Fuente: Elaboración propia.

Como se observa en la **Tabla 9-14**, las soluciones de Cooximetría no fueron aptas en el presente estudio para ser empleadas como calibradores ni controles en el análisis de monóxido de carbono total por GC-MS, ya que los resultados de la concentración de COt fueron inferiores a  $1,00 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  para todo el rango de porcentaje de saturación de carboxihemoglobina (entre 4,50 %COHb y 66,30 %COHb).

### **9.2.3. Límite de detección**

Se estimó que la concentración equivalente al límite de detección para la presente metodología analítica corresponde a  $0,05 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Se llegó a este resultado después de reemplazar en la **Ecuación (8-7)** los valores de la desviación estándar del intercepto y de la pendiente obtenidos a partir del consolidado de las curvas de calibración preparadas en medio acuoso (regresión no ponderada) y de evaluar la respuesta cromatográfica de una solución acuosa de  $0,05 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  con respecto a la relación señal ruido, calculado con base al área (**Tabla 9-15**).

La concentración del límite de detección obtenida ( $0,05 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ ) es 200 veces mayor que la estimada en la literatura ( $0,00025 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ ) (28) a pesar que en ambas metodologías analíticas, se definió el mismo volumen de muestra. Esta diferencia se debe principalmente a las condiciones instrumentales y al método empleado para la evaluación del límite de detección, pues con respecto a este último, en la investigación de referencia se determinó dicha concentración con base a la lectura de quince blancos mientras que, en la presente, se estimó a partir de la desviación estándar del intercepto y la pendiente de la curva de calibración.

**Tabla 9-15:** Evaluación de la concentración equivalente al límite de detección 0,05  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Teórico			
Sa	b	LOD	
0,0420	2,9267	0,047 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	
Experimental			
0,05 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .	Relación señal ruido ion $m/z$ 28*	Tiempo de retención en minutos	
		ion $m/z$ 28	ion $m/z$ 29
Lectura 1	33,0	14,013	14,076
Lectura 2	33,9	14,018	14,097
Lectura 3	40,0	14,024	14,098
Coefficiente de variación (%)	No Aplica	0,039 %	0,088%
* Con respecto al área.			

Fuente: Elaboración propia.

#### 9.2.4. Límite de cuantificación

Se definió que la concentración equivalente al límite de cuantificación es 0,10  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Se llegó a este resultado después de reemplazar en la **Ecuación (8-8)** los valores de la desviación estándar del intercepto y de la pendiente obtenidos a partir del consolidado de las curvas de calibración preparadas en medio acuoso (regresión no ponderada) y de evaluar la respuesta cromatográfica de una solución acuosa de 0,10  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  con respecto a la relación señal ruido, calculado con base al área (**Tabla 9-16**).

En publicaciones empleadas como referencia para el presente estudio, se estimó que la concentración para el límite de cuantificación corresponde a 0,25  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (28), pero al revisar los resultados en una muestra de 15 de conductores de vehículo automotor, se evidenció que las concentraciones de monóxido de carbono oscilaron entre 0,04  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 0,92  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (el 60% de los individuos tenía CO en una concentración inferior a 0,25  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ ) (31); lo anterior generó inquietud e incentivó a la valoración de una solución acuosa de ácido fórmico con concentración inferior 0,25  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

**Tabla 9-16:** Datos para evaluar la precisión y exactitud en la solución equivalente a la concentración del límite de cuantificación 0,10  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

Teórico						
Sa		b		LOQ		
0,0420		2,9267		0,14 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$		
Experimental 0,10 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$						
0,10 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	Tiempo de retención Minutos		Relación de áreas	Concentración $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$		Exactitud %R
	Ion $m/z$ 28	Ion $m/z$ 29		experimental	teórica	
Lectura 1	13,913	14,024	0,29	0,09	0,10	87,74 %
Lectura 2	13,955	13,976	0,32	0,10	0,10	98,36 %
Lectura 3	13,913	13,092	0,32	0,10	0,10	98,82 %
%CV	0,17 %	3,83%	6,09%	6,60 %	No Aplica	No Aplica
Relación señal ruido ion $m/z$ 28 con respecto al área				Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
				63,2	67,1	72,1

Fuente: Elaboración propia.

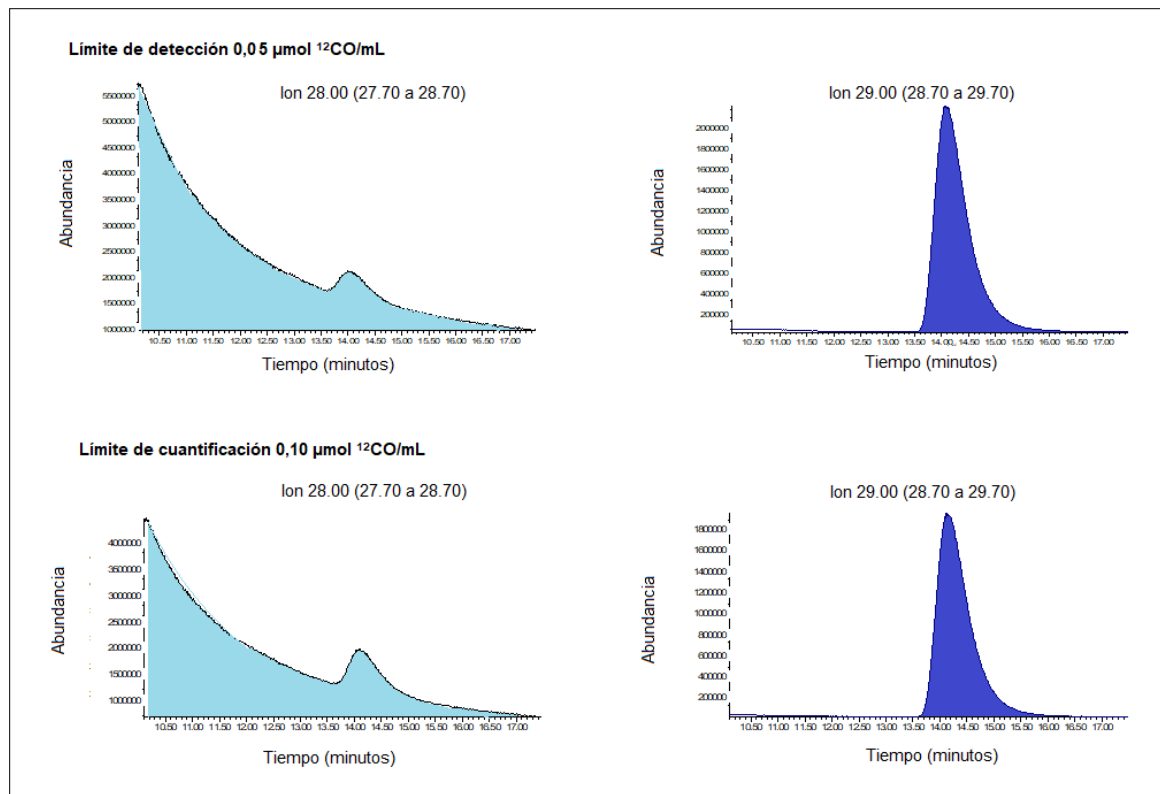
En la **Figura 9-8** se muestra la respuesta instrumental para las concentraciones que se definieron como los límites de detección y cuantificación.

### 9.2.5. Exactitud

La exactitud del método expresada en términos de porcentaje de recuperación estuvo entre el 87% y 98% para el límite de cuantificación y entre el 95,00% y 101,00% para el resto de las concentraciones, cumpliendo con el criterio de aceptación establecidos (ver **Tabla 9-17**).

En general, el parámetro de exactitud se ve afectado por los errores sistemáticos los cuales deben minimizarse o erradicarse de la experimentación para que no se sobreponga su acción a la de los errores aleatorios (48).

**Figura 9-8:** Respuesta cromatográfica para las concentraciones equivalentes a los límites de detección y cuantificación.



Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 9-17:** Exactitud del método cromatográfico.

Concentración	Porcentaje de recuperación	Criterio de aceptación
0,10 µmol <sup>12</sup> CO/mL Límite de cuantificación	87,74 %	Porcentaje de recuperación entre 80 % y 120 %.
	98,36 %	
	98,82 %	
0,36 µmol <sup>12</sup> CO/mL	95,81 %	Porcentaje de recuperación entre 85 % y 115 %
	99,90 %	
	100,91 %	
0,85 µmol <sup>12</sup> CO/mL	99,16 %	
	98,55 %	
	97,02 %	
1,94 µmol <sup>12</sup> CO/mL	95,48 %	
	96,74 %	
	98,46 %	

Fuente: Elaboración propia.

Aunque durante la implementación de la metodología bioanalítica para la determinación de monóxido de carbono total en sangre, los errores sistemáticos se minimizaron a partir de la normalización interna, se identificó que el analista debe desarrollar habilidades para la preparación de soluciones y el uso adecuado de los topes de las micropipetas.

### 9.2.6. Precisión

Se determinó que el método es preciso puesto que el coeficiente de variación de las determinaciones realizadas por un mismo analista sobre una solución de concentración de ácido fórmico en el rango dinámico de cuantificación, en el curso de la misma serie de análisis es menor que los límites establecidos para las metodologías bioanalíticas (**Tabla 9-18**).

**Tabla 9-18:** Precisión del método cromatográfico en términos de repetibilidad.

Concentración	CV experimental	Criterio de aceptación
		CV metodología bioanalítica
0,10 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>a</sup>	6,09 %	$\leq 20\%$
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>a</sup>	1,99 %	$\leq 15\%$
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>b</sup>	1,12%	$\leq 15\%$
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>c</sup>	2,39 %	$\leq 15\%$
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>d</sup>	3,49 %	$\leq 15\%$
0,25 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>e</sup>	5,53 %	$\leq 15\%$
0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>f</sup>	2,73 %	$\leq 15\%$
0,85 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>f</sup>	1,09 %	$\leq 15\%$
1,94 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ <sup>f</sup>	1,54 %	$\leq 15\%$

a. Valoración para la determinación de la concentración equivalente al límite de cuantificación.  
b. Valoración para la precisión intermedia Analista 1 día 1.  
c. Valoración para la precisión intermedia Analista 1 día 2.  
d. Valoración para la precisión intermedia Analista 2 día 1.  
e. Valoración para la precisión intermedia Analista 2 día 2.  
f. Valoración inicial de los controles.

Fuente: Elaboración propia.

### 9.2.7. Precisión Intermedia

- Solución de ácido fórmico equivalente a 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$ .

En dos días diferentes, dos analistas prepararon una solución de ácido fórmico en agua con concentración equivalente a 0,25  $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y la analizaron por triplicado. El coeficiente de variación global para la relación de áreas fue del 4,1% (**Tabla 9-19**) y al

realizar un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, se demostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la respuesta del equipo cuando dos analistas, en dos días diferentes, prepararon y valoraron la solución (**Tabla 9-20**).

**Tabla 9-19:** Precisión intermedia del método cromatográfico.

Precisión intermedia	Relación de áreas		Coeficiente de variación global (%)
	Analista 1	Analista 2	
0,25 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$			
Día 1	0,83	0,88	4,1%
	0,84	0,83	
	0,83	0,88	
Día 2	0,80	0,83	
	0,82	0,80	
	0,79	0,89	

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 9-20:** ANOVA para evaluar la precisión intermedia.

Hipótesis nula ( $H_0$ )		La respuesta instrumental no se ve afectada por el tiempo ni por el analista.			
Hipótesis alternativa ( $H_1$ )		La respuesta instrumental se ve afectada por el tiempo y el analista.			
Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculado	F tabla
Muestra	0,002	1,00	0,002	2,55	5,32
Columnas	0,004	1,00	0,004	4,51	5,32
Interacción	0,00003	1,00	0,00003	0,04	5,32
Dentro del grupo	0,007	8,00	0,0008		
Total	0,01	11,00			
Conclusión		Se acepta $H_0$			

Fuente: Elaboración propia.

- **Muestras de sangre.**

Adicionalmente, en dos días diferentes, se analizaron 18 de las 52 muestras del estudio. El coeficiente de variación entre las parejas de muestras fue menor del 12% (**Tabla 9-21**). Al efectuar un análisis de varianza de un factor con estos datos, se comprobó con un nivel de confianza del 95% que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de monóxido de carbono total determinadas los días 1 y 2 (**Tabla 9-22**).



**Tabla 9-21:** Coeficiente de variación entre las muestras de sangre.

Código Muestra	Día 1 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	Día 2 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	Concentración promedio $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	desviación estándar	Coeficiente de variación (%)
1	1,1	1,2	1,2	0,07	6,08 %
25	1,1	1,2	1,1	0,08	7,28 %
75	1,1	1,1	1,1	0,02	2,20 %
97	1,0	1,1	1,1	0,12	11,14 %
100	1,1	1,3	1,2	0,14	11,70 %
102	1,0	1,1	1,0	0,09	8,84 %
103	1,0	1,1	1,0	0,06	5,82 %
105	0,9	1,0	1,0	0,11	11,03 %
107	1,0	1,0	1,0	0,03	3,55 %
108	1,0	1,0	1,0	0,00	0,04 %
109	1,1	1,0	1,0	0,09	8,78 %
110	1,1	1,1	1,1	0,00	0,07 %
111	1,1	1,0	1,0	0,00	0,47 %
112	0,9	0,9	0,9	0,01	1,57 %
113	1,0	1,2	1,1	0,12	11,41 %
116	1,0	1,1	1,1	0,03	2,82 %
118	1,3	1,2	1,2	0,10	8,59 %
168	1,1	1,1	1,1	0,04	3,80 %

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 9-22:** Análisis de varianza para evaluar la precisión intermedia en las muestras.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculado	F tabla
Entre grupos	0,02	1	0,02	2,19	4,13
Dentro de los grupos	0,31	34	0,01		
Total	0,33	35			

Fuente: Elaboración propia.

### 9.2.8. Seguimiento a los controles.

En la **Tabla 9-23** se muestran los límites de concentración para las soluciones control, los cuales fueron calculados con base en dos veces la desviación estándar de las valoraciones realizadas inicialmente.

**Tabla 9-23:** Límites de concentración para las soluciones control.

	Control 1	Control 2	Control 3
Promedio	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,84 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,89 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Desviación estándar	0,01 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,01 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,03 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Límite inferior	0,34 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,82 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,83 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Límite superior	0,38 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,85 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,94 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$

Fuente: Elaboración propia.

El cien por ciento de los controles estuvo dentro de los límites y al efectuar un análisis de varianza, se demostró con una confianza del 95% que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en la valoración inicial de los controles y durante el análisis de las muestras y controles de cooximetría (ver **Tabla 9-24**).

**Tabla 9-24:** Seguimiento de los controles.

	Control bajo	Control medio	Control alto
Valoración inicial	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,84 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,89 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 1	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,84 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,86 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 2	0,34 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,83 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,88 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 3	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,83 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,94 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 4	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,82 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,89 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 5	0,36 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,82 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,86 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 6	0,35 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,85 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,84 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$
Set 7	0,35 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,82 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,87 $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$

(continuación Tabla 9-24)

	Control bajo	Control medio	Control alto		
Set 8	0,36 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,84 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,85 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$		
Set 9	0,37 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,83 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,89 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$		
Set 10	0,37 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,83 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,83 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$		
Set 11	0,34 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	0,83 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	1,86 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$		
Análisis de varianza para el seguimiento de los controles.					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculado	F tabla
Entre grupos	0,003	11	0,0003	0,00042	2,22
Dentro de los grupos	14,50	24	0,60		
Total	14,50				

Fuente: Elaboración propia.

### 9.2.9. Incertidumbre del método

Con una confianza del 95,45%, la incertidumbre expandida para el método de determinación de monóxido de carbono total por cromatografía de gases, espectrometría de masas, se calcula de acuerdo con la ecuación  $2^* \sqrt{(0,0465 x + 0,034)^2}$  donde x es la concentración de CO total en la muestra.

En la **tabla 9-25** se exhiben los resultados obtenidos durante la validación del método cromatográfico

**Tabla 9-25:** Resumen de los parámetros evaluados y los resultados obtenidos durante la validación del método para la determinación de COt por HS-GC-MS.

Parámetro		Resultado	Criterio de aceptación	Cumplimiento de criterio de aceptación.
Selectividad	Etanol	Los posibles interferentes incluidos en el estudio no exhibieron señal cromatográfica en el tiempo de retención del CO y la fragmentación de estos analitos es diferenciable de la exhibida por el CO.	No presenta señal cromatográfica en el tiempo de retención del CO y la fragmentación de estos analitos es diferenciable de la del CO	Cumple.
	Metanol			
	Cianuro			
	<sup>12</sup> CO	Tiempo de retención (minutos): 14,087. %CV tiempo de retención: 0,44%	%CV tiempo de retención ≤ 2%	Cumple.
	<sup>13</sup> CO	Tiempo de retención (minutos): 14,139. %CV tiempo de retención: 0,41%	%CV tiempo de retención ≤ 2%	Cumple.
Linealidad y Rango dinámico	Linealidad	Coefficiente de correlación (r): 0,9995	r > 0,900	Cumple.
		F experimental: 2880,07 F de la tabla (0,05; 1; 3): 10,13	F exp > F tabla (0,05; 1; n-2)	Cumple.
	Rango de cuantificación	0,10-3,00 μmol <sup>12</sup> CO/mL		
Límites de detección y cuantificación	Límite de detección 0,05 μmol/mL.	Tiempo de retención (minutos) ion 28: 14,018 %CV tiempo de retención: 0,039%	%CV tiempo de retención ≤ 2%	Cumple.
		Relación señal/ruido: 35,5	3 veces la relación señal/ruido ion 28.	
	Límite de cuantificación 0,10 μmol/mL.	Tiempo de retención (minutos) ion 28: 13,927 %CV tiempo de retención: 0,17%	%CV tiempo de retención ≤ 2%	Cumple.
		Relación señal/ruido: 67,5	10 veces la relación señal/ruido ion 28.	
		Exactitud (porcentaje de recuperación): entre 87 – 99%	80-120%.	
		Precisión: %CV para la relación de áreas <7%	%CV ≤ 20%.	
Precisión	Repetibilidad	%CV < 6%	%CV ≤ 15%	Cumple.
	Precisión intermedia	0,25 μmol <sup>12</sup> CO/mL: CV ≤ 5 % Sangre total: CV ≤ 12 %	%CV ≤ 15% %CV ≤ 15%	Cumple.
Exactitud	Porcentaje de recuperación	95-101%	85-115%	Cumple.
Incertidumbre del método		Con una confianza del 95,45%, la incertidumbre del método se estima a partir de la ecuación: $2 * \sqrt{(0,0465 * x + 0,034)^2}$ , donde x es la concentración de COt en μmol <sup>12</sup> CO/mL.	No aplica.	No aplica.

Fuente: Elaboración propia

## 9.3. Tratamiento Estadístico de los Datos para %COHb y COt

### 9.3.1. *Identificación de datos atípicos.*

Los valores atípicos se definen como aquellas observaciones que se desvían con respecto al comportamiento de un conjunto de datos que además, tienen la capacidad de afectar los resultados (49).

Para la presente investigación, los valores atípicos podrían afectar la relación que hay entre las variables porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y concentración de monóxido de carbono total en muestras de sangre.

- **Concentración de monóxido de carbono total.**

Del conjunto de datos obtenido para la concentración de monóxido de carbono total, dos datos que estuvieron por encima de  $1,3 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  (Ver **Tabla 9-26**) fueron considerados atípicos (muestras N° 104 y 118). El dato que se encontraba por debajo del límite inferior establecido no se consideró atípico ya que estaba a dos desviaciones estándar de la media.

- **Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina.**

Del conjunto de datos obtenido para el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina (**Tabla 9-26**), se consideró como atípico, el resultado para la muestra de sangre identificada con el código 126 (7,5 %COHb).

Con base en este hallazgo, se tomó la decisión de excluir del tratamiento estadístico, los resultados de porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total obtenidos para las muestras N°104, 118 y 126.

**Tabla 9-26:** Identificación de datos atípicos.

	Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina	Concentración de monóxido de carbono total
Cuartil 1 (Q1)	2,3 %COHb	0,1 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Cuartil 3 (Q3)	3,3 %COHb	1,1 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Rango Inter cuartilico (RI)	1,1 %COHb	0,1 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Límite inferior (Q1-1,5RI)	0,7 %COHb	0,9 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Límite superior (Q3+1,5RI)	4,9 %COHb	1,3 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$

Fuente: Elaboración propia.

### 9.3.2. *Distribución de probabilidad de las variables en la población*

Con un nivel de confianza del 95%, se determinó a partir de la prueba de *Anderson Darling* que las variables porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y concentración de monóxido de carbono total en la población evaluada tienen una distribución normal (**Tabla 9-27**).

**Tabla 9-27:** Prueba de normalidad de los datos.

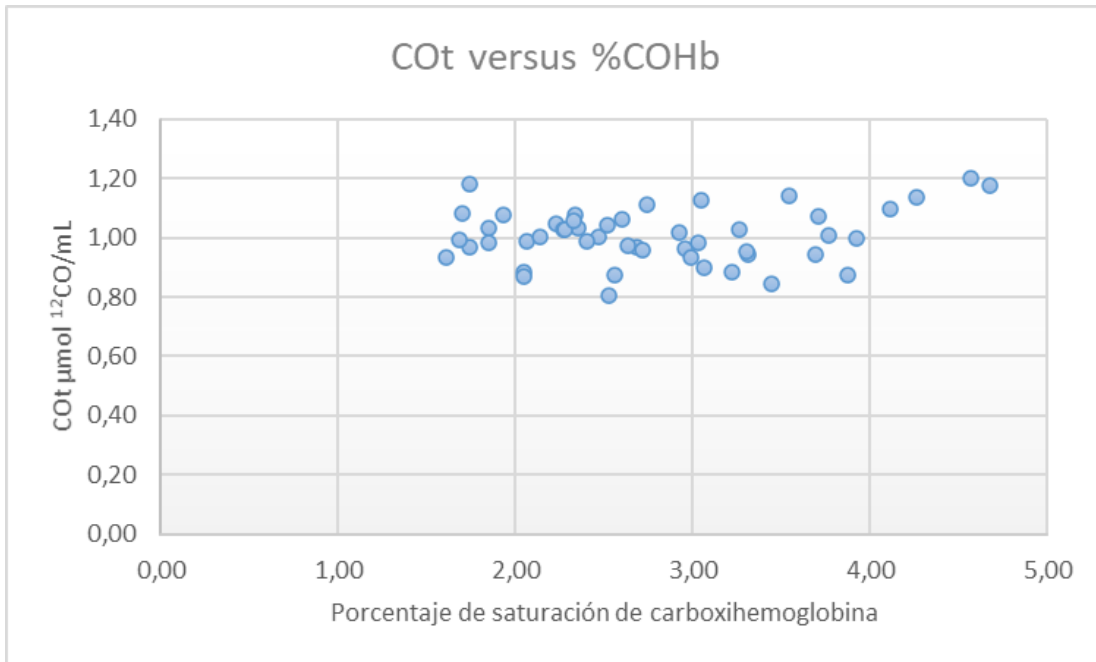
	Porcentaje de saturación de carboxihemoglobina	Concentración de monóxido de carbono total
n	49	49
Promedio	2,8 %COHb	1,0 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Desviación estándar	0,8 %COHb	0,1 $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$
Valor AD experimental	0,55	0,17
Valor AD tabla <sub>(0,05)</sub>	0,75	0,75
P-valor	0,148	0,934
Hipótesis nula	$H_0: X_i = N(\mu, \sigma^2)$	
Hipótesis alternativa	$H_1: X_i \neq N(\mu, \sigma^2)$	
Conclusión	Se aceptó la hipótesis nula	

Fuente: Elaboración propia.

#### 9.4. Evaluación de la Relación entre el Porcentaje de Saturación de Carboxihemoglobina y la Concentración de Monóxido de Carbono Total en Sangre.

Para evaluar si hay una relación lineal simple entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina (variable independiente) y la concentración de monóxido de carbono total en sangre (variable dependiente), se excluyeron las pareja de datos de las muestras N°104, 118 y 126, y se tomó el valor promedio para la concentración de monóxido de carbono total para aquellas muestras que fueron analizadas en dos días diferentes (ver **Tabla 9-21**).

**Figura 9-9:** Concentración de monóxido de carbono total en sangre versus porcentaje de saturación de carboxihemoglobina.



Fuente: Elaboración propia.

Al analizar la dispersión de los datos que se muestran en la **Figura 9-9**, no se encuentra una aparente relación entre el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total. Al efectuar pruebas de *t student* para el contraste de hipótesis en el modelo de regresión lineal simple, se logró demostrar con una

confianza del 95% que los valores para el coeficiente de correlación ( $r = 0,1977$ ; p-valor:  $0,173$ ;  $t_{exp} = 1,38 < t_{tabla(0,05;47)} = 2,012$ ) y la pendiente ( $b = 0,022 \mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$ ;  $t_{exp} = 1,59 < t_{tabla(0,05;47)} = 2,012$ .) no son estadísticamente diferentes de cero.

Con base en estos resultados, se evidenció que hay variables adicionales al porcentaje de saturación de carboxihemoglobina que influyen en la concentración de monóxido de carbono total.

La concentración de monóxido de carbono total corresponde a la suma de la fracción de monóxido de carbono unido a la hemoglobina más la concentración de monóxido de carbono libre. Con respecto al monóxido de carbono unido a la hemoglobina, se ha demostrado experimentalmente que este tiene una relación lineal con el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina ( $r > 0,9$ ) (15,31). En cuanto al monóxido de carbono libre, su concentración en el organismo depende de las condiciones de variabilidad biológica intrapersonal (11) y de acuerdo con un estudio reciente, este puede oscilar entre el 10% y 60% del COt (10), hecho que lo convierte probablemente, en el responsable de la falta de correlación entre los biomarcadores objeto de estudio.

La diferencia entre el valor de coeficiente de correlación estimado experimentalmente ( $r = 0,1977$ ) y el calculado con base en las publicaciones disponibles ( $r = 0,74$ ) radica en que los datos de concentración de monóxido de carbono allí consignados fueron obtenidos después de realizar un pretratamiento de las muestras clínicas y forenses, para eliminar la concentración de monóxido de carbono libre en la sangre y obtener solo la concentración de monóxido de carbono unido a la hemoglobina (10,12).

*Oliverio et al.* hallaron una correlación positiva moderada entre las variables de interés ( $R^2 = 0,68$ ; p-valor  $< 2e-16$ ) después de analizar 2376 muestras de sangre con saturación de carboxihemoglobina en todo el rango de concentración fisiológico. Adicionalmente, ellos establecieron un modelo de regresión lineal múltiple para el pronóstico del %COHb a partir del COt en el que se incluye un ajuste por el volumen de espacio de cabeza, el tipo de anticoagulante, el tiempo de espera para el análisis y la temperatura de almacenamiento (13).



En virtud de las condiciones de recolección, conservación y análisis de las muestras durante el desarrollo del presente estudio, los coeficientes que se tuvieron en cuenta para la predicción de la carboxihemoglobina se muestran en la **Ecuación (9-1)**, en donde  $X_t$  es el número de días transcurridos entre la fecha de recolección y el análisis cromatográfico y los dos valores restantes corresponden a los coeficientes de tiempo y temperatura de almacenamiento, respectivamente.

$$C_{\text{COHb}} = \text{COt} - (-0,10 * X_t) - 2,16 \quad (9-1)$$

Los datos de carboxihemoglobina estimados a partir de la concentración de monóxido de carbono total fueron comparados con los valores obtenidos experimentalmente a través de una prueba *t student*; con un nivel de confianza del 95%, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos (**Tabla 9-28**), demostrando, primero, que los resultados de %COHb obtenidos espectrofotométricamente son confiables y segundo, que la metodología bioanalítica cromatográfica desarrollada en el presente estudio, genera resultados que pueden relacionarse con niveles de carboxihemoglobina para el diagnóstico de intoxicaciones por monóxido de carbono.

**Tabla 9-28:** Eficacia del modelo de predicción.

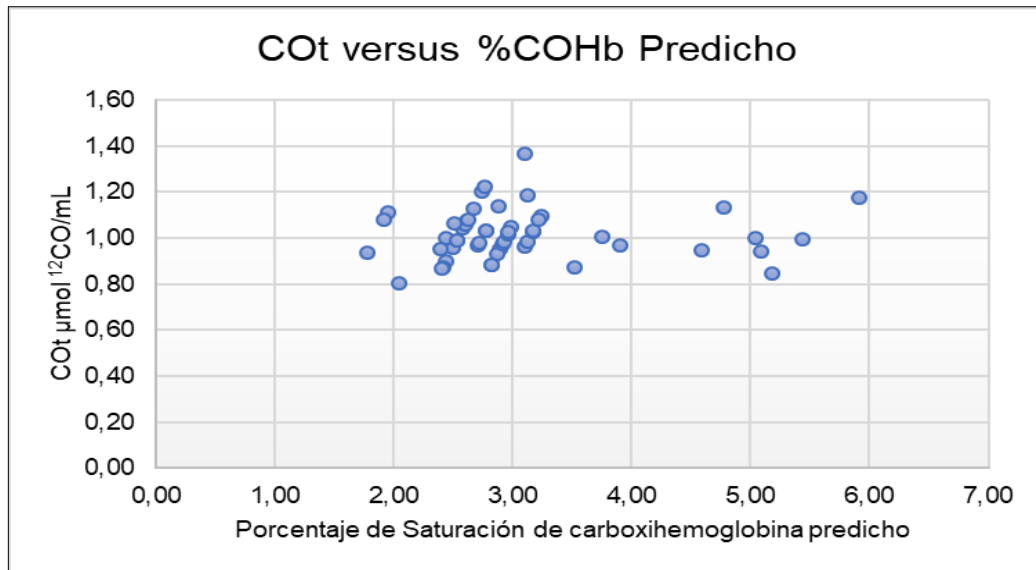
	%COHB Predicción	%COHB Experimental
Media	3,0	3,0
Varianza	1,0	1,0
Observaciones	52	52
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	101	
Estadístico t	1,01	
P(T<=t) dos colas	0,32	
Valor crítico de t (dos colas)	1,98	

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, el efecto del monóxido de carbono libre sobre la relación entre %COHb y COt se hace más notorio cuando esta se evalúa en muestras de sangre con porcentajes de saturación de carboxihemoglobina en el mismo rango de concentración. Como evidencia se presenta la **Figura 9-10**, en la cual, aunque los valores de %COHb fueron

estimados a partir de COt, el coeficiente de correlación no es significativamente diferente de cero ( $t_{\text{experimental}} = 0,33 < t_{\text{tabla}}(0,05; 50) = 2,009$ ).

**Figura 9-10:** Concentración de monóxido de carbono total en sangre versus porcentaje de saturación de carboxihemoglobina predicho.



Fuente: Elaboración propia.

## 9.5. Caracterización de la Exposición a Monóxido de Carbono en la Población Objeto de Estudio

Cincuenta y dos muestras de sangre de treinta y nueve voluntarios fueron analizadas por ambas metodologías analíticas para la determinación del porcentaje de saturación de carboxihemoglobina y la concentración de monóxido de carbono total.

La edad promedio de los participantes fue de veintitrés años. El ochenta y cinco por ciento de ellos fueron hombres y uno tenía hábito de tabaquismo leve; para este individuo la concentración de carboxihemoglobina estimada experimentalmente fue 4,7 %COHb y de monóxido de carbono total fue 1,2 μmol <sup>12</sup>CO/mL; el %COHb que se pronosticó a partir de COt es de 5,9 %COHb. Los resultados de este individuo se corresponden con los

descritos en la literatura para fumadores (50). Ninguna de las mujeres presentó hábito de tabaquismo durante el desarrollo del estudio.

En los no fumadores, el porcentaje de saturación de carboxihemoglobina estuvo entre 1,6 %COHb y 7,5 %COHb, con una concentración promedio de 2,9 %COHb  $\pm$  1,0 %COHb para los hombres y 2,8 %COHb  $\pm$  0,9 %COHb para las mujeres.

Con respecto al monóxido de carbono total, la concentración en la población evaluada estuvo entre 0,8  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y 1,4  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y los hombres presentaron en promedio, mayor concentración que las mujeres, con una diferencia de 0,1  $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$  entre ambos.

## 10. Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados de las características analíticas evaluadas permiten concluir que el método validado es idóneo para la determinación de COt por HS-GC-MSD en el rango de concentración entre  $0,1 \mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y  $3,0 \mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  y puede ser empleado para la caracterización de los niveles de monóxido de carbono total en población general (ver **tabla 9-25**). Además, esta metodología puede ser útil para evaluar la exposición a monóxido de carbono en muestras forenses en las cuales se pueden presentar mayores interferencias espectrales por procesos de deterioro de la sangre (putrefacción *postmortem* e *in vitro*).

El noventa por ciento de la población evaluada, los niveles de saturación de COHb están por debajo del 3,5% cuando se determinó por el método espectrofotométrico, lo cual evidenció que esta población no presentó una exposición significativa al monóxido de carbono.

El promedio de concentración de monóxido de carbono total en la población evaluada fue de  $1,0 \mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL} \pm 0,1 \mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$  cuando se empleó el método HS-GC-MSD validado. Al comparar los resultados obtenidos con valores de referencia reportados en otras publicaciones (aproximadamente  $1 \mu\text{mol}^{12}\text{CO}/\text{mL}$ ), se evidenció que en la población de estudio no hubo una exposición significativa al monóxido de carbono.

Los resultados de los estudios de estabilidad a corto plazo mostraron que no hay una variación estadísticamente significativa en la concentración de COHb cuando las muestras de sangre total fueron almacenadas en condiciones de refrigeración durante 16 días en tubos con EDTA, citrato de sodio o heparina sódica (p-valor: 0,93).

En las muestras de sangre total con concentraciones menores que 10% COHb, no se encontró una relación lineal simple entre los biomarcador monóxido de carbono total y carboxihemoglobina ( $r = 0,1977$ ; p-valor: 0,173;  $t_{\text{exp}} = 1,38 < t_{\text{tabla}}(0,05;47) = 2,012$ ).

Cuando se compararon los resultados obtenidos en este estudio con los publicados, se observó que el coeficiente de correlación se hace estadísticamente diferente de cero cuando se evalúa en un grupo de muestras con concentraciones de carboxihemoglobina entre 10% y 70% de saturación.

Para próximas investigaciones, se recomienda verificar la aplicabilidad del método cromatográfico validado en poblaciones con una exposición significativa al monóxido de carbono, tales como trabajadores que desarrollan actividades en recintos cerrados con fuentes de exposición conocidas, así como determinar la estabilidad del monóxido de carbono total en muestras de sangre total recolectadas en contenedores con varios tipos de conservantes y almacenadas en diferentes condiciones.



## **11. Limitaciones.**

Como limitación principal del estudio, se tiene que, a nivel mundial, la determinación de monóxido de carbono total por GC-MS es un tema relativamente nuevo y son pocos los expertos con conocimiento en esta área.

## **12. Financiación.**

Para el desarrollo de la presente investigación, se recibió apoyo económico por parte de la Universidad Nacional de Colombia a través de la “Convocatoria Nacional para el apoyo a proyectos de investigación y creación artística de la Universidad Nacional de Colombia 2017-2018”; el proyecto se identificó con el código Hermes 41336 y código QUIPU 201010028989.

Asimismo, en el marco del convenio celebrado entre la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, este proyecto se inscribió en la Escuela de Medicina Legal bajo el código 2018-A-09 y contó con la autorización para el uso de los equipos y las instalaciones del Laboratorio de Toxicología Forense de la Dirección Regional Noroccidente.



## 13. Referencias Bibliográficas.

1. Téllez J, Rodríguez A, Fajardo A. Contaminación por Monóxido de Carbono: un Problema de Salud Ambiental Ensayo/Essay. Rev salud pública [Internet]. 2006;8(1):108–17. Available from: <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v8n1/v8n1a10.pdf>
2. Anupam P, SK A, Nirupam P. Carbon Monoxide Poisoning. Apollo Med [Internet]. 2010;7(1):34–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0976001612600040>
3. Roderique JD, Josef CS, Feldman MJ, Spiess BD. A modern literature review of carbon monoxide poisoning theories, therapies, and potential targets for therapy advancement. Toxicology [Internet]. 2015;334:45–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.05.004>
4. Jaimes de Pino M, Hernandez Esquivel L. Determinación de niveles sanguíneos de carboxihemoglobina como función de la exposición al monóxido de carbono en la ciudad de Bogotá. Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas [Internet]. 1990;18:21 a 27. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56563>
5. Hampson NB, Bodwin D. Toxic CO-ingestions in intentional carbon monoxide poisoning. J Emerg Med [Internet]. 2013;44(3):625–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.08.033>
6. Mattiuzzi C, Lippi G. Worldwide epidemiology of carbon monoxide poisoning. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2020;39(4):387–92. Available from:

- [https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0960327119891214?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0960327119891214?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed)
7. Instituto Nacional de Salud. Colombia. Instituto Nacional de Salud. Estadísticas de Vigilancia Rutinaria. 2021. p. 1.
  8. McAllister J, Kunsman G, Levine B. Carbon Monoxide/Cyanide. In: Levine B, Kerrigan S, editors. Principles of Forensic Toxicology. Fifth Edit. Frederick, MD, USA: company Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 678.
  9. Tomaszewski C. The clinical Basis of Medical Toxicology: Occupational and Environmental Toxins: Carbon Monoxide. In: Nelson L, Lewin N, Howland MA, Hoffman R, Goldfrank L, Flomenbaum N, editors. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. Ninth Edit. McGraw-Hill Companies.; 2011. p. 1969.
  10. Oliverio S, Varlet V. Total Blood Carbon Monoxide: Alternative to Carboxyhemoglobin as Biological Marker for Carbon Monoxide Poisoning Determination. J Anal Toxicol [Internet]. 2019;43(2):79–87. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/43/2/79/5146172>
  11. Oliverio S, Varlet V. What are the limitations of methods to measure carbon monoxide in biological samples? Forensic Toxicol [Internet]. 2020;38(1). Available from: <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00490-1>
  12. Oliverio S, Varlet V. Carbon monoxide analysis method in human blood by Airtight Gas Syringe – Gas Chromatography – Mass Spectrometry (AGS-GC-MS): Relevance for postmortem poisoning diagnosis. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2018;1090(November 2017):81–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.019>
  13. Oliverio S, Varlet V. New strategy for carbon monoxide poisoning diagnosis: Carboxyhemoglobin (COHb) vs Total Blood Carbon Monoxide (TBCO). Forensic Sci Int [Internet]. 2020;306(November):110063. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110063>
  14. Walch SG, Lachenmeier DW, Sohnius E-M, Madea B, Musshoff F. Rapid Determination of Carboxyhemoglobin in Postmortem Blood using Fully-Automated

- Headspace Gas Chromatography with Methaniser and FID. *Open Toxicol J* [Internet]. 2010;4:21–5. Available from: <http://www.benthamscience.com/open/totoxij/articles/V004/21TOTOXIJ.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/253916DF-8FB2-4895-820E-5F4AABCABBDA>
15. Hao H, Zhou H, Liu X, Zhang Z, Yu Z. An accurate method for microanalysis of carbon monoxide in putrid postmortem blood by head-space gas chromatography-mass spectrometry (HS/GC/MS). *Forensic Sci Int* [Internet]. 2013;229(1–3):116–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23683916/>
  16. Fajardo A, Rodríguez A, Téllez J, Prieto E, Mora G. Estudio comparativo del comportamiento clínico cardiovascular y electrocardiográfico en dos poblaciones expuestas a monóxido de carbono. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* [Internet]. 2012;60(4):303–10. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/38438/47248>
  17. Czogała J, Wardas W, Goniewicz MŁ. Determination of low carboxyhemoglobin blood levels by gas chromatography. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2006;556(2):295–300. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267005016259>
  18. Delivoria-Papadopoulos M, Coburn RF, Forster RE. Cyclic variation of rate of carbon monoxide production in normal women. *J Appl Physiol* [Internet]. 1974;36(1):49–51. Available from: [www.physiology.org/journal/jappl](http://www.physiology.org/journal/jappl) at Midwestern Univ Lib (132.174.254.157)
  19. Kaya H, Coşkun A, Beton O, Zorlu A, Kurt R, Yucel H, et al. Carboxyhemoglobin levels predict the long-term development of acute myocardial infarction in carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med* [Internet]. 2016;34:840–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26947364>
  20. Coburn RF, Williams WJ, Kahn SB. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. *J Clin Invest* [Internet]. 1966;45(4):460–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC292720/>
  21. Contostavlos DL, Lichtenwalner M. A simple field test to detect elevated

- concentrations of carboxyhemoglobin in autopsy blood. *J Clin Forensic Med* [Internet]. 2003;10:77–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15275025/>
22. Sáez PO, Soto AB, Ortega AG, García RD, Ramírez PG, Campuzano EG, et al. Recomendaciones para el estudio de la cooximetría [Internet]. 2010. Report No.: Documento M. Fase 3. Versión 2. Available from: <http://www.seqc.es/download/doc/67/2840/951224035/603430/cms/recomendacion-es-para-el-estudio-de-la-cooximetria-2010.pdf/>
  23. Berg J. Biochemistry. In: *Biochemistry* [Internet]. Eight Edit. W. H. Freeman; 2015. p. 183–94. Available from: [https://www.academia.edu/18009796/7\\_Hemoglobin](https://www.academia.edu/18009796/7_Hemoglobin)
  24. Sagala DD. Paper Hemoglobin dan Eritropoesis [Internet]. 2015. Available from: [https://www.academia.edu/30099142/Paper\\_hemoglobin](https://www.academia.edu/30099142/Paper_hemoglobin)
  25. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. *Principios de análisis instrumental*. Vol. 53, CENGAGE Learning. 2008. 1689–1699 p.
  26. Levine, Barry; Cody JSPV. *Principles of Forensic Toxicology*. Fourth. Principles of Forensic Toxicology. Washington D.C: AACC Press; 2013. 550 p.
  27. Boumba VA, Vougiouklakis T. Evaluation of the methods used for carboxyhemoglobin analysis in postmortem blood. *Int J Toxicol* [Internet]. 2005;24:275–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16126621>
  28. Varlet V, Lagroy De Crouette E, Augsburg M, Mangin P. Accuracy profile validation of a new method for carbon monoxide measurement in the human blood using headspace-gas chromatography–mass spectrometry(HS-GC–MS). *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2012;880(1):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.028>
  29. Heredia P. Validación de la metodología para la determinación de carboxihemoglobina por espectrofotometría visible en muestras de sangre, código DRBO-M-IVT-LTOF-177-V01. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá; 2015.

30. Corporation R. A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC. In: Corporation R, editor. A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC [Internet]. Restek Corporation; p. 20. Available from: <https://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>
31. Varlet V, De Crouette EL, Augsburger M, Mangin P. A new approach for the carbon monoxide (CO) exposure diagnosis: Measurement of total co in human blood versus carboxyhemoglobin (HbCO). J Forensic Sci [Internet]. 2013;58(4):1041–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23692308/>
32. Mureşan CO, Taloş I, Sturz V, Enache A. Carboxyhemoglobin stability evaluation in stored and heat-treated biological samples. Rom J Leg Med [Internet]. 2013;21(3):239–44. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/fac0/b20861bd5246e0b4afb0933c0225619a268c.pdf>
33. Nagai K. Estimation of carboxyhemoglobin concentrations in thermo-coagulated blood on a CO-oximeter system: an experimental study. Forensic Sci Int [Internet]. 1996;83(3):211–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073896020397>
34. Kunsman GW, Presses CL, Rodriguez P. Carbon monoxide stability in stored postmortem blood samples. J Anal Toxicol [Internet]. 2000;24(7):572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043662>
35. Chace DH, Goldbaum LR, Lappas NT. Factors affecting the loss of carbon monoxide from stored blood samples. J Anal Toxicol [Internet]. 1986;10(5):181–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3773478/>
36. Vocabulario Internacional de Metrología, Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados,. In: Centro Español de Metrología [Internet]. JCGM; 2012. p. 88. Available from: <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
37. Pulido J. Tesis de Maestría: DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE THCA Y BENZOILECGONINA EN ORINA POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A

- CANNABIS Y COCAÍNA. [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2016. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/57595>
38. Agency EM. ICH topic Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In: Prescrire International [Internet]. London: European Medicines Agency; 2006. p. 278. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
39. Heredia P. Monografía: Guía para la validación de métodos bioanalíticos: Aplicación a la Toxicología Forense. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá; 2001.
40. Pértegas Díaz, S.; Pita Fernández S. Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. Cad Aten Primaria [Internet]. 2002;9:209–11. Available from: <https://www.fisterra.com/gestor/upload/guias/pearson2.pdf>
41. Londo C. Questionnaire to Classify the Level of Tobacco Consumption in Young People. Perspect Psicol [Internet]. 2011;7(2):281–91. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-99982011000200007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-99982011000200007&lng=en&nrm=iso)
42. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008. Available from: <https://www.r-project.org>
43. Alfisz, Stephan; Fajardo, Diana; Villa, Erica; Patiño N. Trabajo de grado: Evaluación de la estabilidad de carboxihemoglobina en muestras de sangre total almacenadas en diferentes condiciones a partir de la revalidación de una metodología analítica por espectrofotometría uv-visible. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.; 2019.
44. Miller JN, Miller J. Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. In: Capella I, Caicoya M, editors. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta Edi. Madrid: Pearson Educación S.A; 2002. p. 111–50.

45. Mongay Fernández C. Análisis de la varianza. In: Capilla, Juli. Hernández de la Figuera, Celso. Fuster, Pere. Navaab Akbar S, editor. Quimiometría. 1st ed. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2005. p. 129–53.
46. Mongay Fernández C. Regresión lineal simple. In: Capilla J, Hernández de la Figuera C, Fuster P, Navaab Akbar S, editors. Quimiometría. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2005. p. 281–300.
47. Ministerio de Salud C. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. [Internet]. Colombia: Ministerio de Salud; 1993 p. 19. Available from:  
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
48. Mongay Fernández C. Principios de quimiometría. In: Capilla, Juli. Hernández de la Figuera, Celso. Fuster, Pere. Navaab Akbar S, editor. Quimiometría. Valencia, España: Universidad de Valencia; 2005. p. 19–32.
49. Marcano L, Fermín W. Comparación de métodos de detección de datos anómalos multivariantes mediante un estudio de simulación. Saber, Univ Oriente, Venez [Internet]. 2013;25:192–201. Available from:  
<http://ve.scielo.org/pdf/saber/v25n2/art09.pdf>
50. Lindell K W. Cinical Prectice: Carbon monoxide poisoning. N Engl J Med. 2009;360(12):1217–25.

## A. Anexo

**Datos para la estimación del coeficiente de correlación que fue empleada para el cálculo del tamaño de muestra.**

Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$	%COHb	Tipo de muestra	Fuente
3,00	35	Postmortem	(28)
3,80	38	Postmortem	(28)
0,10	0	Postmortem	(28)
0,40	0	Postmortem	(28)
3,40	40	Postmortem	(28)
0,70	5	Postmortem	(28)
0,20	3	Postmortem	(28)
3,00	38	Postmortem	(28)
0,14	1,7	Clínica (Chofer)	(31)
0,13	1,6	Clínica (Chofer)	(31)
0,38	4,6	Clínica (Chofer)	(31)
0,92	11	Clínica (Chofer)	(31)
0,53	6,4	Clínica (Chofer)	(31)
0,24	2,9	Clínica (Chofer)	(31)
0,55	6,6	Clínica (Chofer)	(31)
0,45	5,4	Clínica (Chofer)	(31)
0,06	0,7	Clínica (Chofer)	(31)
0,04	0,5	Clínica (Chofer)	(31)
0,06	0,7	Clínica (Chofer)	(31)




Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$	%COHb	Tipo de muestra	Fuente
0,09	1,1	Clínica (Chofer)	(31)
0,23	2,8	Clínica (Chofer)	(31)
0,23	2,8	Clínica (Chofer)	(31)
0,30	3,6	Clínica (Chofer)	(31)
3,10	18	Postmortem	(31)
3,00	35	Postmortem	(31)
3,80	38	Postmortem	(31)
0,40	4	Postmortem	(31)
0,50	5	Postmortem	(31)
0,80	9	Postmortem	(31)
1,10	13	Postmortem	(31)
1,30	14	Postmortem	(31)
1,00	11	Postmortem	(31)
5,00	18	Postmortem	(31)
0,10	0	Postmortem	(31)
2,30	18	Postmortem	(31)
4,00	68	Postmortem	(31)
0,30	0	Postmortem	(31)
0,40	0	Postmortem	(31)
3,40	40	Postmortem	(31)
0,70	5	Postmortem	(31)
0,20	3	Postmortem	(31)
0,30	0	Postmortem	(31)
0,50	0	Postmortem	(31)
0,70	9	Postmortem	(31)

---

Concentración $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO/mL}$	%COHb	Tipo de muestra	Fuente
7,30	14	Postmortem	(31)
3,70	12	Postmortem	(31)
0,50	0	Postmortem	(31)
0,10	0	Postmortem	(31)
3,00	38	Postmortem	(31)

## B. Anexo.

### Aval Comité de Ética.


 Comité de Ética  
 Facultad de Medicina  
 Sede Bogotá

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
 DE COLOMBIA

**ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 006-071-17**  
 Fecha: 27 de abril de 2017

Nombre completo del proyecto: "RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO EN SANGRE Y PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE CARBOXIHEMOGLOBINA POR CROMATOGRÁFIA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN POBLACIÓN EXPUESTA EN BOGOTÁ".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Érica Sofía Villa Correa

Dirigido por: los profesores Nancy Patiño Reyes, Patricia Heredia Marroquín y Vicent Varlet

Presentado por: la profesora Alba Isabel Rodríguez Pulido, Coordinadora Académica

Departamento o Sección: Programa Curricular Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 27 de abril de 2017

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996) actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

**1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:**

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación.
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos.
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

**2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:**

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Patología
2	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Departamento de Morfología
3	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
4	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Departamento de Ciencias Fisiológicas
5	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

**3. El Comité consideró que el presente estudio:**

- a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

[Página 1/1]  
 Elaboró Jeannette Pineda A.

Carrera 30 N°. 45-03  
 FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 - 1 piso, Of.136  
 Comutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167  
 Bogotá, Colombia  
[eticasalud\\_fmbo@unal.edu.co](mailto:eticasalud_fmbo@unal.edu.co)

**Patrimonio  
 de todos  
 los colombianos**

SEQUICENTENARIO  
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Comité de Ética  
Facultad de  
Medicina  
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

**4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:**

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

**5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:**

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

**6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.**

**7. El Investigador principal deberá:**

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

**8. Observaciones:**

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

Nombre: **CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA**  
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana  
Cargo: Presidente Comité de Ética

[Página 2/2]  
Elaboró Jeannette Pineda A.

Carrera 30 N°. 45-03  
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471- 1 piso, Of. 136  
Conmutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167  
Bogotá, Colombia  
eticasalud\_fmbog@unal.edu.co

Patrimonio  
de todos  
los colombianos



## C. Anexo.

### Modelo de consentimiento informado.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

Yo \_\_\_\_\_ he sido informado(a) que la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia – sede Bogotá, está llevando a cabo un proyecto de investigación cuyo nombre es "Relación entre concentración de monóxido de carbono en sangre y porcentaje de saturación de carboxihemoglobina por  *cromatografía de gases-espectrometría de masas y espectrofotometría UV-visible* en población expuesta en Bogotá".

He decidido, voluntariamente, participar en el estudio; se me ha informado y entiendo que, para ello, los investigadores:

- Requieren que yo de respuesta a una serie de preguntas que serán de carácter general sobre aspectos personales, como edad, sexo y hábito de tabaquismo.
- Me extraerán dos muestras de sangre por punción venosa de vaso periférico, una al inicio y otra al final de un recorrido en bicicleta; con ello buscarán determinar mi concentración de carboxihemoglobina y monóxido de carbono en sangre, que permitirá conocer si me encuentro expuesto(a) ambientalmente al monóxido de carbono.

Además, se me ha explicado que:

- Los guantes, agujas y tubos tipo vacutainer usados durante la extracción de muestra serán nuevos y limpios y no se reusarán para la punción de otros individuos.
- Se me extraerá como máximo, 10 mL de sangre.

Entiendo que, si al participar en el estudio se desarrolla alguna condición desfavorable, se me ofrecerá orientación médica competente y tengo la libertad de retirarme del estudio, sin que se me sea juzgado(a) por la decisión tomada o persuadido a continuar.

Se me ha preguntado si en el momento tengo alguna duda acerca de la investigación y se me ha informado que, de llegar a presentarla posteriormente, esta puede ser resuelta en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia ubicado en la Avenida Carrera 30 Calle 45, Edificio 471, oficina 203. Igualmente, podré llamar a la investigadora principal, Erica Sofía Villa Correa al número de celular 3007801203.

Firma del participante : \_\_\_\_\_  
Nombre : \_\_\_\_\_  
Documento de identidad : \_\_\_\_\_  
Fecha : \_\_\_\_\_

Firma del investigador :   
Nombre : Erica Sofía Villa Correa  
Documento de identidad : 39 429 592 de Apartadó, Antioquia.

## D. Anexo.

### Certificado de calificación del espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Electron, modelo Helios gamma.



### CERTIFICADO DE CALIFICACIÓN

**Fecha de Calificación:** 21 de enero de 2019 **CERTIFICADO No. DE-509**  
**Ciudad:** Bogotá  
**Empresa:** UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - DEPARTAMENTO DE MEDICINA **Equipo:** ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS  
**Dirección:** Laboratorio de toxicología **Modelo:** HELIOS GAMMA  
**Teléfono:** 3163000 **Marca:** THERMO ELECTRON  
**Serie:** 114304  
**Número de Inventario:** N/A

#### VALORES DE REFERENCIA

**Longitud De Onda:**

**Referencia: SA0176**

*Filtros de HOLMIO y DIDIMIO; Los valores son expresados en nanómetros (nm), los rangos de aceptación están determinados por el fabricante para cada instrumento.*

Referencia (nm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Error	Incertidumbre	Límite Min	Límite Max	Estado
HOLMIO	278,3	278,5	278,5	278,5	0,80	0,306	278,0	280,6	PASA
SA0176	360,9	360,5	360,5	360,5	0,40	0,306	359,6	362,2	PASA
	418,7	419,0	419,0	419,0	-0,30	0,306	417,4	420,0	PASA

Referencia (nm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Error	Incertidumbre	Límite Min	Límite Max	Resultado
HOLMIO	585,3	585,5	585,5	585,3	-0,20	0,306	585,5	587,1	PASA
SA0176	807,1	807,0	807,0	807,0	0,10	0,306	805,1	809,1	PASA

*Nota: Se calcula la incertidumbre expandida usando un factor de confianza K=2 que corresponde a un factor de confianza del 95%*

#### Exactitud Fotométrica

**Referencia: SA2289**

*Filtros de densidad neutra; los resultados son expresados en unidades de absorbancia, y los rangos de aceptación están determinados por el fabricante para cada instrumento.*

Referencia	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Error	Incertidumbre	Límite min	Límite Max	Resultado
SA2289 / 1	0,279	0,280	0,280	0,280	-0,0007	0,0027	0,274	0,284	PASA
SA2289 / 3	0,658	0,658	0,658	0,657	0,0008	0,0027	0,653	0,664	PASA
SA2289 / 4	1,044	1,047	1,046	1,044	-0,0005	0,0032	1,037	1,051	PASA
SA2289 / 8	2,057	2,051	2,049	2,047	0,0077	0,0110	2,041	2,073	PASA

*Nota: Se calcula la incertidumbre expandida usando un factor de confianza K=2 que corresponde a un factor de confianza del 95%*

INNOVATEK S.A.S.  
 Carrera 21 No. 41-26 Bogotá, D.C. PBX: 338 0711 Fax: 3270936 Fecha: 23-03-2015  
 Pagina 1 de 4 www.innovatek.com.co Código: C.ST.UV.0017-02

Temperatura ambiente 23°C

**METODO DE CALIBRACION:**

Medición de Materiales de Referencia Certificados: Ver Documento Innovatek Código: P.37.0007, versión vigente

**MATERIAL UTILIZADO:**

Se emplean filtros:

1. NPL de Holmio y Didímio P/N Unicam 9423 185 03112, serie No. SA0176  
 Fecha de Calibración: 27 de Agosto de 2018  
 Certificado de Calibración No. CC008795
2. Filtros de densidad neutra P/N 9423 179 38091, serie No. SA2289  
 Fecha de Calibración: 21 de Septiembre de 2018  
 Certificado de Calibración No. C008897

**TRAZABILIDAD:**

Los filtros empleados fueron calibrados para valores de longitud de onda de los picos de absorción, usando un ancho de banda de 0,3 nm contra patrones NPL/NIST.

**NORMA:**

Los certificados de calibración No. CC008795 y C008897 fueron emitidos de acuerdo con las exigencias de acreditación del United Kingdom Accreditation Service. ISO/IEC 17025 (17025).

Cada juego de filtros es exclusivamente identificado y calibrado en el laboratorio de THERMO ELECTRON CORP. No 0321, construido en un ambiente certificado bajo ISO 9001. La calibración de estos filtros es llevada a cabo por un procedimiento acreditado, el cual es auditado por UKAS (United Kingdom Accreditation Service), ofreciendo un respaldo independiente, reconocido internacionalmente por los procesos ISO/IEC 17025.

**NOTAS:**

**CONCLUSION:**

El instrumento trabaja dentro de especificaciones de fábrica y puede ser usado confiablemente

Realizado por:

*Luz Angela Mora Borja*

Qca. Luz Angela Mora Borja  
 Departamento de Soporte Técnico  
 e-mail: soporte@innovatek.com.co

INNOVATEK S.A.S.

Carrera 21 No. 41-26 Bogotá, D.C. PBX: 338 0711 Fax: 3270936  
 www.innovatek.com.co

Fecha: 23-03-2015  
 Código: C.ST.UV.0017-02

# E. Anexo.

## Certificado de análisis solución de amoníaco 25% lote K49011332.



### Certificate of Analysis

1.05432.1000 Ammonia solution 25% for analysis EMSURE®  
Batch K49011332

	Spec. Values		Batch Values	
	≥ 25.0	%	25.0	%
Assay (acidimetric, NH <sub>3</sub> )				
Carbonate (as CO <sub>2</sub> )	≤ 10	ppm	< 10	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Phosphate (PO <sub>4</sub> )	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Sulphate (SO <sub>4</sub> )	≤ 2	ppm	< 2	ppm
Sulphide (S)	≤ 0.2	ppm	< 0.2	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.500	ppm	< 0.200	ppm
Au (Gold)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.500	ppm	< 0.200	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Ga (Gallium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
In (Indium)	≤ 0.020	ppm	< 0.020	ppm
K (Potassium)	≤ 0.500	ppm	< 0.200	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.500	ppm	< 0.200	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.050	ppm	< 0.020	ppm
Pt (Platinum)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Sn (Tin)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.100	ppm	< 0.100	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Tl (Thallium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Substances reducing potassium permanganate (as O <sub>2</sub> )	≤ 5	ppm	< 5	ppm
Residue on ignition (as SO <sub>2</sub> )	≤ 10	ppm	< 10	ppm
Non volatile matter	≤ 10	ppm	< 10	ppm

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.04.2017  
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.04.2022



## Certificate of Analysis

---

1.05432.1000 Ammonia solution 25% for analysis EMSURE®  
Batch K49011332

---

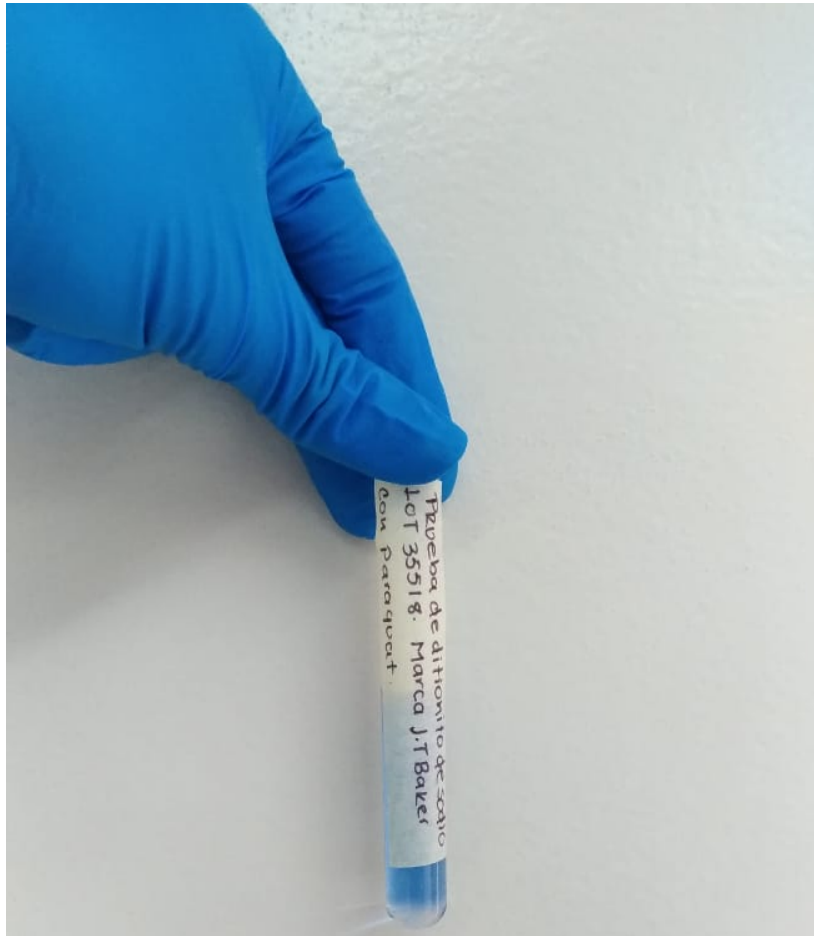
Dr. Rainer Vogt  
Responsible laboratory manager quality control

---

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

## F. Anexo.

**Prueba de reducción del ditionito de sodio marca JT. Baker lote 35518  
realizada en la fecha 2019-03-20.**



# G. Anexo.

## Calibradores de Cooximetría

### CVC 223 CO-Oximeter Calibration Verification Controls

#### Level 1

LOT 85131 2019-12

#### Expected Values Chart

Analyzers	tHb g/dL		O <sub>2</sub> Hb %		COHb %		MetHb <sup>3</sup> %	
	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range
<b>Accriva</b>								
AVOXimeter 1000E	4.8	4.2 - 5.4	33.2	28.6 - 37.8			0.6	-2.3 - 3.5
AVOXimeter 4000	4.8	4.2 - 5.4	31.4	26.8 - 36.0	68.5	61.5 - 75.5	0.6	-2.3 - 3.5
<b>IL</b>								
482	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
682	5.1	4.5 - 5.7	31.3	28.3 - 34.3	70.7	66.7 - 74.7	-0.2	-2.2 - 1.8
Synthesis Series	4.9	4.3 - 5.5	34.8	31.8 - 37.8	67.2	63.2 - 71.2	-0.5	-2.5 - 1.5
GEM OPL	4.8	4.2 - 5.4	31.4	26.8 - 36.0	68.5	61.5 - 75.5	0.6	-2.3 - 3.5
GEM Premier 4000	ORL <sup>1</sup>		ORL <sup>1</sup>		ORL <sup>1</sup>		ORL <sup>1</sup>	
GEM Premier 5000	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Nova</b>								
CCX	5.6	5.0 - 6.2	36.4	33.4 - 39.4	63.8	59.8 - 67.8	-0.1	-2.1 - 1.9
pHOx Ultra	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Radiometer</b>								
ABL 700 Series	4.8	4.2 - 5.4	35.3	32.3 - 38.3	64.7	60.7 - 68.7	1.7	-0.3 - 3.7
ABL 800 Series	4.8	4.2 - 5.4	35.3	32.3 - 38.3	64.7	60.7 - 68.7	1.7	-0.3 - 3.7
ABL 80 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Roche</b>								
Cobas b 221	4.8	4.2 - 5.4	30.8	27.8 - 33.8	66.1	62.1 - 70.1	0.2	-1.8 - 2.2
CMNI Series	4.8	4.2 - 5.4	32.5	29.5 - 35.5	67.6	63.6 - 71.6	0.7	-1.3 - 2.7
<b>Siemens</b>								
400 Series	6.4	5.8 - 7.0	36.7	33.7 - 39.7	63.7	59.7 - 67.7	-0.3	-2.3 - 1.7
500 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
1200 Series	6.1	5.5 - 6.7	37.1	34.1 - 40.1	63.7	59.7 - 67.7	-0.4	-2.4 - 1.6

## Level 2

LOT	84858		2019-12
-----	-------	---	---------

## Expected Values Chart

Analyzers	tHb g/dL		O <sub>2</sub> Hb %		COHb %		MetHb <sup>3</sup> %	
	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range
<b>Accriva</b>								
AVOXimeter 1000E	8.2	7.5 - 8.9	93.7	89.2 - 98.2			0.7	-2.2 - 3.6
AVOXimeter 4000	8.1	7.4 - 8.8	96.4	91.9 - 100.9	7.2	3.2 - 11.2		
<b>IL</b>								
482	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
682	7.5	6.8 - 8.2	95.0	90.0 - 100.0	6.5	2.5 - 10.5	-0.1	-2.1 - 1.9
Synthesis Series	7.2	6.5 - 7.9	97.9	92.9 - 102.9	5.6	1.6 - 9.6	-0.2	-2.2 - 1.8
GEM OPL	8.1	7.4 - 8.8	96.4	91.9 - 100.9	7.2	3.2 - 11.2	0.7	-2.2 - 3.6
GEM Premier 4000	7.2	6.5 - 7.9	97.1	92.1 - 102.1	4.5	0.5 - 8.5	-0.3	-2.3 - 1.7
GEM Premier 5000	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Nova</b>								
CCX	7.7	7.0 - 8.4	98.3	93.3 - 103.3	2.1	-1.9 - 6.1	-0.3	-2.3 - 1.7
pHOx Ultra	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Radiometer</b>								
ABL 700 Series	7.7	7.0 - 8.4	96.4	91.4 - 101.4	2.4	-1.6 - 6.4	0.6	-1.4 - 2.6
ABL 800 Series	7.7	7.0 - 8.4	96.2	91.2 - 101.2	2.4	-1.6 - 6.4	0.6	-1.4 - 2.6
ABL 80 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Roche</b>								
Cobas b 221	7.9	7.2 - 8.6	95.5	90.5 - 100.5	4.2	0.2 - 8.2	0.1	-1.9 - 2.1
OMNI Series	7.2	6.5 - 7.9	96.4	91.4 - 101.4	3.5	-0.5 - 7.5	0.1	-1.9 - 2.1
<b>Siemens</b>								
400 Series	9.0	8.3 - 9.7	96.2	91.2 - 101.2	4.2	0.2 - 8.2	-0.2	-2.2 - 1.8
500 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
1200 Series	8.6	7.9 - 9.3	96.2	91.2 - 101.2	4.2	0.2 - 8.2	-0.2	-2.2 - 1.8

## CVC 223 CO-Oximeter Calibration Verification Controls

## Level 3

LOT	84954		2019-12
-----	-------	---	---------

## Expected Values Chart

Analyzers	tHb g/dL		O <sub>2</sub> Hb %		COHb %		MetHb <sup>3</sup> %	
	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range
<b>Accriva</b>								
AVOXimeter 1000E	13.7	12.6 - 14.8	80.8	76.5 - 85.1			0.3	-2.7 - 3.2
AVOXimeter 4000	13.8	12.7 - 14.9	81.2	76.9 - 85.5	19.3	14.8 - 23.8		
<b>IL</b>								
482	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
682	13.1	12.1 - 14.1	81.1	77.1 - 85.1	20.2	16.2 - 24.2	0.4	-1.6 - 2.4
Synthesis Series	13.3	12.3 - 14.3	83.3	79.3 - 87.3	19.1	15.1 - 23.1	0.2	-1.8 - 2.2
GEM OPL	13.8	12.7 - 14.9	81.2	76.9 - 85.5	19.3	14.8 - 23.8	0.3	-2.7 - 3.2
GEM Premier 4000	12.7	11.7 - 13.7	83.2	79.2 - 87.2	18.4	14.4 - 22.4	0.1	-1.9 - 2.1
GEM Premier 5000	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Nova</b>								
CCX	14.1	13.1 - 15.1	84.5	80.5 - 88.5	14.4	10.4 - 18.4	0.3	-1.7 - 2.3
pHOx Ultra	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Radiometer</b>								
ABL 700 Series	13.6	12.6 - 14.6	83.5	79.5 - 87.5	14.6	10.6 - 18.6	1.3	-0.7 - 3.3
ABL 800 Series	13.6	12.6 - 14.6	83.5	79.5 - 87.5	14.4	10.4 - 18.4	1.3	-0.7 - 3.3
ABL 80 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Roche</b>								
Cobas b 221	12.8	11.8 - 13.8	82.7	78.7 - 86.7	16.4	12.4 - 20.4	0.6	-1.4 - 2.6
OMNI Series	13.0	12.0 - 14.0	83.0	79.0 - 87.0	15.5	11.5 - 19.5	1.1	-0.9 - 3.1
<b>Siemens</b>								
400 Series	14.5	13.5 - 15.5	83.2	79.2 - 87.2	16.5	12.5 - 20.5	0.2	-1.8 - 2.2
500 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
1200 Series	14.4	13.4 - 15.4	83.2	79.2 - 87.2	16.5	12.5 - 20.5	0.2	-1.8 - 2.2

## Level 4

LOT

85050



2019-12

## Expected Values Chart

Analyzers	tHb g/dL		O <sub>2</sub> Hb %		COHb %		MetHb <sup>3</sup> %	
	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range
<b>Accriva</b>								
AVOXimeter 1000E	15.9	14.6 - 17.2	53.7	49.4 - 58.0				
AVOXimeter 4000	15.7	14.4 - 17.0	53.3	49.0 - 57.6	47.5	42.2 - 52.8	0.2	-2.7 - 3.1
<b>IL</b>								
482	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
682	14.9	13.7 - 16.1	51.9	47.9 - 55.9	49.3	45.3 - 53.3	-0.1	-2.1 - 1.9
Synthesis Series	14.8	13.6 - 16.0	57.2	53.2 - 61.2	47.5	43.5 - 51.5	-0.2	-2.2 - 1.8
GEM OPL	15.7	14.4 - 17.0	53.3	49.0 - 57.6	47.5	42.2 - 52.8	0.2	-2.7 - 3.1
GEM Premier 4000	14.3	13.1 - 15.5	54.4	50.4 - 58.4	47.5	43.5 - 51.5	-0.4	-2.4 - 1.6
GEM Premier 5000	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Nova</b>								
CCX	16.8	15.6 - 18.0	56.4	52.4 - 60.4	43.5	39.5 - 47.5	-0.2	-2.2 - 1.8
pHOx Ultra	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Radiometer</b>								
ABL 700 Series	15.0	13.8 - 16.2	55.9	51.9 - 59.9	43.9	39.9 - 47.9	2.2	0.2 - 4.2
ABL 800 Series	15.0	13.8 - 16.2	56.1	52.1 - 60.1	43.9	39.9 - 47.9	2.1	0.1 - 4.1
ABL 80 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Roche</b>								
Cobas b 221	14.6	13.4 - 15.8	53.2	49.2 - 57.2	45.3	41.3 - 49.3	0.2	-1.8 - 2.2
OMNI Series	14.7	13.5 - 15.9	54.7	50.7 - 58.7	43.1	39.1 - 47.1	0.8	-1.2 - 2.8
<b>Siemens</b>								
400 Series	15.9	14.7 - 17.1	56.2	52.2 - 60.2	44.1	40.1 - 48.1	-0.3	-2.3 - 1.7
500 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
1200 Series	16.0	14.8 - 17.2	56.2	52.2 - 60.2	44.1	40.1 - 48.1	-0.3	-2.3 - 1.7

## CVC 223 CO-Oximeter Calibration Verification Controls

### Level 5

LOT 85231  2020-01

#### Expected Values Chart

Analyzers	tHb g/dL		O <sub>2</sub> Hb %		COHb %		Methb <sup>3</sup> %	
	mean	range	mean	range	mean	range	mean	range
<b>Accriva</b>								
AVOXimeter 1000E	21.2	19.0 - 23.4	3.3	-4.7 - 11.3				
AVOXimeter 4000	21.4	19.2 - 23.6	1.7	-6.3 - 9.7	ORL <sup>1</sup>		0.1	-2.8 - 3.0
<b>IL</b>								
482	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
682	20.1	18.1 - 22.1	1.3	-1.2 - 3.8	99.3	94.3 - 104.3	0.2	-1.8 - 2.2
Synthesis Series	18.6	16.6 - 20.6	2.5	0.0 - 5.0	97.7	92.7 - 102.7	-0.3	-2.3 - 1.7
GEM OPL	21.4	19.2 - 23.6	1.7	-6.3 - 9.7	ORL <sup>1</sup>		0.1	-2.8 - 3.0
GEM Premier 4000	19.7	17.7 - 21.7	1.1	-1.4 - 3.6	97.7	92.7 - 102.7	-0.2	-2.2 - 1.8
GEM Premier 5000	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Nova</b>								
CCX	23.2	21.2 - 25.2	3.2	0.7 - 5.7	96.1	91.1 - 101.1	-0.1	-2.1 - 1.9
pHcX Ultra	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Radiometer</b>								
ABL 700 Series	19.2	17.2 - 21.2	0.8	-1.7 - 3.3	95.6	90.6 - 100.6	3.0	1.0 - 5.0
ABL 800 Series	19.2	17.2 - 21.2	0.8	-1.7 - 3.3	95.6	90.6 - 100.6	3.0	1.0 - 5.0
ABL 80 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
<b>Roche</b>								
Cobas b 221	19.8	17.8 - 21.8	0.9	-1.6 - 3.4	96.7	91.7 - 101.7	0.4	-1.6 - 2.4
OMNI Series	19.8	17.8 - 21.8	1.8	-0.7 - 4.3	94.7	89.7 - 99.7	0.9	-1.1 - 2.9
<b>Siemens</b>								
400 Series	21.2	19.2 - 23.2	5.4	2.9 - 7.9	93.5	88.5 - 98.5	-0.2	-2.2 - 1.8
500 Series	DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>		DNA <sup>2</sup>	
1200 Series	21.7	19.7 - 23.7	5.4	2.9 - 7.9	93.5	88.5 - 98.5	-0.2	-2.2 - 1.8

#### FOOTNOTES:

1. ORL - Outside Reportable Limits of Analyzer
2. DNA - Data Not Available at time of printing
3. Methb range cannot determine linearity, calibration verification or reportable range.



### QC 253 Full Range CO-Oximeter Control

Level / Level / Nivel / Niveau / Livello / Nivå 2

LOT 84954  
2019-12

Expected Values Chart / Tabelle: Erwartete Werte / Tabla de valores esperados  
Tableau des valeurs théoriques / Tabella dei valori attesi / Tabell med förväntade värden

Manufacturer / Analyzer	Model	Range	Model	Range	Model	Range	Model	Range	Model	Range	Model	Range
Hersteller / Analysegerät	Modell	Reichweite	Modell	Reichweite	Modell	Reichweite	Modell	Reichweite	Modell	Reichweite	Modell	Reichweite
Fabricante / Analizador	Modelo	Rango	Modelo	Rango	Modelo	Rango	Modelo	Rango	Modelo	Rango	Modelo	Rango
Fabbricante / Analizzatore	Modello	Intervallo	Modello	Intervallo	Modello	Intervallo	Modello	Intervallo	Modello	Intervallo	Modello	Intervallo
Tilvarekæber / Analyzator	Modelnummer	Rekvident	Modelnummer	Rekvident	Modelnummer	Rekvident	Modelnummer	Rekvident	Modelnummer	Rekvident	Modelnummer	Rekvident

Accriva	tHb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %
AVOXimeter 100DE	13.7 12.6 - 14.8	89.8 76.5 - 85.1		
AVOXimeter 4000	13.8 12.7 - 14.9	81.2 76.9 - 85.5	19.3 14.8 - 23.8	0.3 -2.7 - 3.2

IL	tHb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %	Vol O <sub>2</sub> %	RHb %
482	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>
652	13.1 12.1 - 14.1	81.1 77.1 - 85.1	20.2 16.2 - 24.2	0.4 -1.5 - 2.4		
Synthesis Series	13.3 12.3 - 14.3	83.3 79.3 - 87.3	19.1 15.1 - 23.1	0.2 -1.8 - 2.2		
GEM OPL	13.6 12.7 - 14.9	81.2 76.9 - 85.5	19.3 14.8 - 23.8	0.3 -2.7 - 3.2		
GEM Premier 4000	12.7 11.7 - 13.7	83.2 79.2 - 87.2	18.4 14.4 - 22.4	0.1 -1.9 - 2.1		
GEM Premier 5000	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>		

Radiometer	tHb g%	HbO <sub>2</sub> Sat (sO <sub>2</sub> ) %	HbO <sub>2</sub> %	HbCO %	MetHb %	O <sub>2</sub> Ct Vol %
ABL 700 Series	13.8 12.0 - 14.0		83.5 79.5 - 87.5	14.6 10.8 - 18.8	1.3 -0.7 - 3.3	
ABL 800 Series	13.6 12.6 - 14.6		83.5 79.5 - 87.5	14.4 10.4 - 18.4	1.3 -0.7 - 3.3	
ABL 80 Series	DNA <sup>1</sup>		DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>1</sup>		DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	

Roche	tHb g/dL	COHb %	MetHb %	O <sub>2</sub> Hb %	RHb (HHb) %
CMNI Series	13.0 12.0 - 14.0	15.5 11.5 - 19.5	1.1 -0.8 - 3.1	83.0 79.0 - 87.0	DNA <sup>1</sup>

Siemens	tHb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %	HHb %
400 Series	14.5 13.5 - 15.5	83.2 79.2 - 87.2	19.5 12.5 - 20.5	0.2 -1.8 - 2.2	
500 Series	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	
1200 Series	14.4 13.4 - 15.4	83.2 79.2 - 87.2	18.5 12.5 - 20.5	0.2 -1.8 - 2.2	

Footnotes / Anmerkungen / Notas al pie / Notes explicatives / Note / Fotnoter:  
 1. Data not available at the time of printing. / Daten bei Drucklegung nicht verfügbar. / Datos no disponibles en el momento de la impresión. / Aucune donnée disponible lors de cette publication. / Dati non disponibili al momento della stampa. / Upplagor finns tillgängliga till följande tillämpning.





### QC 253 Full Range CO-Oximeter Control

Level / Level / Nivel / Niveau / Livello / Nivå 3

LOT 85050  
2019-12

Expected Values Chart / Tabelle: Erwartete Werte / Tabla de valores esperados  
Tableau des valeurs théoriques / Tabella dei valori attesi / Tabell med förväntade värden

Manufacturer / Analyzer Hersteller / Analysegerät Fabricante / Analizador Fabricant / Analyseur Fabbricante / Analizzatore Tilvokkare / Analytator	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range	Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin Hemo Hämoglobin	Range Bereich Rango Range Rango Range Range Range Range Range Range
---	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---

Accriva	Hb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %
AVOXimeter 100CE	15.9 14.6 - 17.2	53.7 49.4 - 58.0		
AVOXimeter 4000	15.7 14.4 - 17.0	53.3 49.0 - 57.6	47.5 42.2 - 52.8	0.2 -2.7 - 3.1

IL	Hb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %	Vol O <sub>2</sub> %	RHb %
402	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>
602	14.9 13.7 - 16.1	51.9 47.9 - 55.9	49.3 45.3 - 53.3	-0.1 -2.1 - 1.9		
Synthesis Series	14.8 13.6 - 16.0	52.2 53.2 - 51.2	47.5 43.5 - 51.5	-0.2 -2.2 - 1.8		
OEM OPL	15.7 14.4 - 17.0	53.3 49.0 - 57.6	47.5 42.2 - 52.8	0.2 -2.7 - 3.1		
OEM Premier 4000	14.3 13.1 - 15.5	54.6 50.4 - 58.4	47.5 43.5 - 51.5	-0.4 -2.4 - 1.8		
OEM Premier 5000	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>		

Radiometer	Hb g%	HbO <sub>2</sub> Sat (sO <sub>2</sub> ) %	HbO <sub>2</sub> %	HbCO %	MetHb %	O <sub>2</sub> Cl Vol %
ABL 700 Series	15.0 13.6 - 16.2		55.9 51.9 - 59.9	43.9 39.9 - 47.9	2.2 0.2 - 4.2	
ABL 800 Series	15.0 13.8 - 16.2		56.1 52.1 - 60.1	43.9 39.9 - 47.9	2.1 0.1 - 4.1	
ABL 80 Series	DNA <sup>1</sup>		DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	
ABL 90 Series	DNA <sup>1</sup>		DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	

Roche	Hb g/dL	COHb %	MetHb %	O <sub>2</sub> Hb %	RHb (Hb) %
OMNI Series	14.7 13.5 - 15.9	43.1 35.1 - 47.1	0.8 -1.2 - 2.3	54.7 50.7 - 58.7	DNA <sup>1</sup>

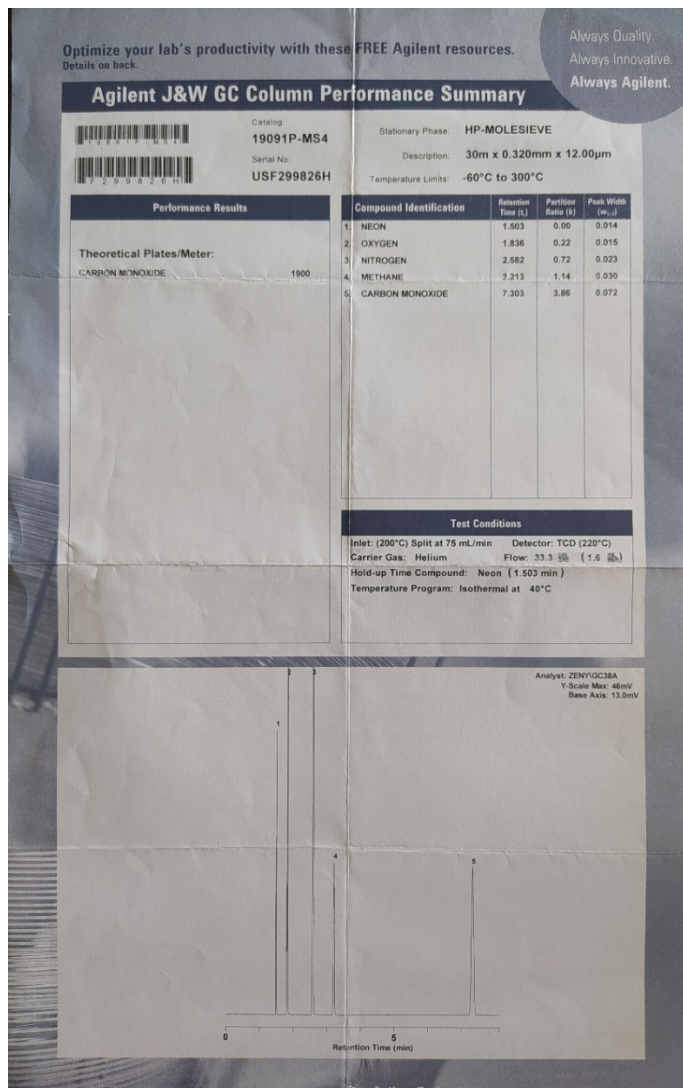
Siemens	Hb g/dL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %	HHb %
400 Series	15.9 14.7 - 17.1	56.2 52.2 - 60.2	44.1 40.1 - 48.1	-0.3 -2.3 - 1.7	
500 Series	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	
1200 Series	16.0 14.8 - 17.2	56.2 52.2 - 60.2	44.1 40.1 - 48.1	-0.3 -2.3 - 1.7	

Footnotes / Anmerkungen / Notas al pie / Notes explicatives / Note / Fotnoter:  
1. Data not available at the time of printing / Daten bei Drucklegung nicht verfügbar / Datos no disponibles en el momento de la impresión / Accuse données disponibles lors de cette publication / Dati non disponibili al momento della stampa / Uppgifter finns ej tillgängliga vid tryckningen för tryckningen.



# I. Anexo.

Inserto de la columna de tamiz molecular HP-Molesieve, Marca Agilent Technologies, N° de parte 19091P-MS4, serie N° USF299826H.



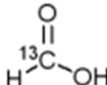
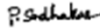
# J. Anexo.

## Certificado de análisis Helio ultra puro 99,9990%, lote N° 02He2003201901

CERTIFICADO DE ANALISIS GASES ESPECIALES																	
CUENTE:	PRODUCTO: HELIO																
FECHA: MARZO 20 DE 2019	DISTRITO:																
<p>ESPECIFICACION</p> <table> <tr> <td>HELIO</td> <td>99,9990%</td> </tr> <tr> <td>PUREZA</td> <td>CGA-580/YUGO</td> </tr> <tr> <td>VALVULA</td> <td>NO INFLAMABLE</td> </tr> <tr> <td>TIPO DE GAS</td> <td>2100 PSI</td> </tr> <tr> <td>PREISION APROX.</td> <td></td> </tr> </table> <p>SE CERTIFICA QUE EL LOTE No 02He2003201901 PRESENTA EL SIGUIENTE ANALISIS</p> <table> <tr> <td>OXIGENO</td> <td>0.6 PPM</td> </tr> <tr> <td>HUMEDAD</td> <td>1.8 PPM</td> </tr> <tr> <td>HELIO</td> <td>BALANCE</td> </tr> </table> <p>FECHA DE LLENADO: 20-03-2019                  FECHA DE ANALISIS: 20-03-2019                  FECHA DE EXPIRACION: 19-03-2024                  INCERTIDUMBRE ANALITICA RELATIVA: +/- 5,5%</p>		HELIO	99,9990%	PUREZA	CGA-580/YUGO	VALVULA	NO INFLAMABLE	TIPO DE GAS	2100 PSI	PREISION APROX.		OXIGENO	0.6 PPM	HUMEDAD	1.8 PPM	HELIO	BALANCE
HELIO	99,9990%																
PUREZA	CGA-580/YUGO																
VALVULA	NO INFLAMABLE																
TIPO DE GAS	2100 PSI																
PREISION APROX.																	
OXIGENO	0.6 PPM																
HUMEDAD	1.8 PPM																
HELIO	BALANCE																
<p>SI DESHA MAS INFORMACION SOBRE ESTE PRODUCTO, POR FAVOR LLAMENOS                  GRATIS A CRYLINEA AL 01 8000 514-300 O AL FAX 01800-514-003</p>																	
<p>LUGAR DE PRODUCCION Y ANALISIS: CRYOGAS S.A. - PLANTA GASES ESPECIALES DE SIBATE                  CILINDROS CORRESPONDIENTES AL LOTE No 02He2003201901: 751275, 032793, 36929277, 9796532, 36721807, 9796526,                  952282, 9788834, 34096857, 859956, 032304, 9796363, 34105617, 629734, 202985, 9796525, 9195371, 7535, 629852, 1506104, 1823,</p>																	
<p><b>CRYOGAS</b>                  Special AIR PRODUCTS                  Gases Especiales                  ING. JAIME VILLANUEVA P.                  CONTROL DE CALIDAD                  GASES ESPECIALES</p>																	

## K. Anexo.

**Certificado de análisis del ácido fórmico marcado H<sup>13</sup>COOH marca Sigma Aldrich, producto 279404-1G, lote N° MBBB0474V.**

<b>SIGMA-ALDRICH®</b>		<small>sigmaaldrich.com</small>
		<small>3000 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: www.sigmaaldrich.com Email USA: techserv@sigmaaldrich.com Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com</small>
<b>Certificate of Analysis</b>		
Product Name: Formic acid- <sup>13</sup> C - 95 wt. % in H <sub>2</sub> O, 99 atom % <sup>13</sup> C		
Product Number:	279404	
Batch Number:	MBBB0474V	
Brand:	ALDRICH	
CAS Number:	1633-56-3	
MDL Number:	MFCD00003298	
Formula:	13CH2O2	
Formula Weight:	47.02 g/mol	
Quality Release Date:	22 AUG 2013	
<b>Test</b>	<b>Specification</b>	<b>Result</b>
Appearance (Clarity)	Clear	Clear
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Proton NMR (ATOM % <sup>13</sup> C)	≥ 99.0 %	99.4 %
Carbon NMR Spectrum	Conforms	Conforms
Proton NMR Spectrum	Conforms	Conforms
Purity (GC)	≥ 99 %	100 %
(Exclusive of Moisture)		
Water (by Karl Fischer)	4.5 - 5.5 %	4.8 %
 Sudhakar Parthasarathy, Scientist Quality Control Mansfield, Ohio US		

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## L. Anexo.

Ácido fórmico (P >88%,) marca JT. Baker, N° de producto 0128-05 y lote 0000005643.

Test	Specification	Result
Assay (HCOOH)	≥ 88.0%	91.7
Color (APHA)	≤ 15	5
Dilution Test	Passes Test	PT
Residue after Evaporation	≤ 0.0020%	0.0020
Acetic Acid (CH <sub>3</sub> COOH)	≤ 0.4%	< 0.1
Ammonium (NH <sub>4</sub> )	≤ 0.005%	< 0.005
Sulfate (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.002%	< 0.001
Sulfide (S <sub>2</sub> )	Passes Test	PT
Chloride (Cl)	≤ 5 ppm	< 3
ACS - Heavy Metals (as Pb)	≤ 5 ppm	< 3
Trace Impurities - Iron (Fe)	≤ 5.000 ppm	3.000

Meets ACS Reagent Chemical Requirements.

For Laboratory, Research, or Manufacturing Use

Storage Conditions:  
 Country of Origin: NL  
 Packaging Site: Paris Mtg Ctr & DC

Phillipsburg, NJ 9001.2006, 14001.2004  
 Paris, KY 9001.2006  
 Mexico City, Mexico 9001.2006  
 Deventer, The Netherlands 9001.2006, 14001.2004  
 Selangor, Malaysia 9001.2006  
 Pune, India 9101.2100  
 Glinice, Poland 9001.2006, 17025.2009

Richard M Silberski  
 Global Director of Quality Assurance

For questions on this Certificate of Analysis please contact Technical Services at 855.282.6867 or +1.610.573.2600  
 Avantor™ Performance Materials Inc.  
 3477 Corporate Parkway, Suite #200, Center Valley, PA 18034, U.S.A. Phone: 610.573.2600, Fax: 610.573.2610

# M. Anexo.

**Certificado de análisis ácido sulfúrico grado reactivo 95%-97%, marca Merck, producto N° 1.00732.2500, lote N° K39708932.**



## Certificate of Analysis

1.00732.2500 Sulfuric acid 95-97% GR for analysis (max. 0,005 ppm Hg) ACS,ISO,Reag. Ph Eur  
Batch K39708932

	Spec. Values		Batch Values	
	95.0 - 97.0	%	96.6	%
Assay (alkalimetric)	≤ 10	Hazen	≤ 10	Hazen
Colour	passes test		passes test	
Appearance	1,834 - 1,837		1,836	
Density (d <sub>20</sub> /20)	≤ 0.1	ppm	≤ 0.1	ppm
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	≤ 0.2	ppm	≤ 0.2	ppm
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	≤ 0.5	ppm	≤ 0.5	ppm
Phosphate (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	≤ 1	ppm	≤ 1	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.02	ppm	≤ 0.02	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.02	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.02	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.1	ppm	≤ 0.05	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.2	ppm	≤ 0.1	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.02	ppm	≤ 0.02	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.02	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.1	ppm	≤ 0.05	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.05	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.005	ppm	≤ 0.003	ppm
Hg (Mercury)	≤ 0.1	ppm	≤ 0.05	ppm
K (Potassium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.02	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.05	ppm
Mo (Molybdenum)				

## Certificate of Analysis

1.00732.2500 Sulfuric acid 95-97% GR for analysis (max. 0,005 ppm Hg) ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Batch K39708932

	Spec. Values		Batch Values	
	≤	ppm	≤	ppm
NH <sub>4</sub> (Ammonium)	≤ 2	ppm	≤ 2	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.02	ppm	≤ 0.02	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.02	ppm	≤ 0.02	ppm
Se (Selenium)	≤ 0.02	ppm	≤ 0.02	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.1	ppm	< 0.05	ppm
Tl (Thallium)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.05	ppm
V (Vanadium)	≤ 0.01	ppm	≤ 0.01	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.05	ppm	≤ 0.05	ppm
Zr (Zirconium)	≤ 0.1	ppm	< 0.02	ppm
Substances reducing potassium permanganate (as SO <sub>2</sub> )	≤ 2	ppm	≤ 2	ppm
Residue on ignition	≤ 5	ppm	≤ 5	ppm

Test date (DD.MM.YYYY): 09.02.2009

Dr. Annika Arndt

responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

## N. Anexo.

### Informe del software R con el tratamiento de los datos para la estabilidad a corto plazo de la COHb.

por Sofía Villa, Nancy Patiño, Carolina Fajardo y Stephan Alfisz

Software RStudio ®

```
library(readxl)

## Warning: package 'readxl' was built under R version 4.0.4

NOE <- read_excel("C:/Users/SOFIA/Desktop/ESTABILIDAD_COHB_2019_1.xlsx")

summary(NOE)

##      TIEMPO          ANTICOAGULANTE          RANGO          COHB
## Length:144          Length:144          Length:144          Min.   : 3.728
## Class :character    Class :character    Class :character    1st Qu.:10.807
## Mode  :character    Mode  :character    Mode  :character    Median :14.983
##                                     Mean  :23.952
##                                     3rd Qu.:34.693
##                                     Max.   :57.710

str(NOE)

## tibble [144 x 4] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ TIEMPO          : chr [1:144] "DIA_0" "DIA_0" "DIA_0" "DIA_0" ...
## $ ANTICOAGULANTE: chr [1:144] "CIT" "CIT" "CIT" "CIT" ...
## $ RANGO           : chr [1:144] "NIVEL_A" "NIVEL_A" "NIVEL_B" "NIVEL_B" ...
## $ COHB            : num [1:144] 6.37 6.85 13.31 13.35 35.93 ...

names(NOE)

## [1] "TIEMPO"          "ANTICOAGULANTE" "RANGO"          "COHB"

NOE1 <-NOE[1:145,]

## Warning: The `i` argument of `[.tbl_df()` must lie in [0, rows] if positive, as of t
ibble 3.0.0.
## Use `NA_integer_` as row index to obtain a row full of `NA` values.
## This warning is displayed once every 8 hours.
## Call `lifecycle::last_warnings()` to see where this warning was generated.
```



```

m2 <- aov(COHB~ANTICOAGULANTE*TIEMPO*RANGO,data=NOE[1:145,])
summary(m2)

##              Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
## ANTICOAGULANTE      2   1169      585   61.015 < 2e-16 ***
## TIEMPO                5     13        3    0.267   0.930
## RANGO                 3  37288  12429 1296.939 < 2e-16 ***
## ANTICOAGULANTE:TIEMPO  10     15        1    0.152   0.999
## ANTICOAGULANTE:RANGO   4     316        79    8.255 1.15e-05 ***
## TIEMPO:RANGO          15     26        2    0.179   1.000
## ANTICOAGULANTE:TIEMPO:RANGO 20     24        1    0.126   1.000
## Residuals            84     805        10
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## 1 observation deleted due to missingness

summary(lm(m2))

##
## Call:
## lm(formula = m2)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -6.3331 -0.3334  0.0132  0.3334  5.9496
##
## Coefficients: (12 not defined because of singularities)
##              Estimate Std. Error t value
## (Intercept)      6.614018   2.189020   3.021
## ANTICOAGULANTEEDTA      -0.814538   3.095742  -0.263
## ANTICOAGULANTEHEP      -1.381064   3.095742  -0.446
## TIEMPODIA_1            -0.004215   3.095742  -0.001
## TIEMPODIA_16           -0.596712   3.095742  -0.193
## TIEMPODIA_2             0.041617   3.095742   0.013
## TIEMPODIA_4            -0.907230   3.095742  -0.293
## TIEMPODIA_6            -0.125515   3.095742  -0.041
## RANGONIVEL_B            6.714509   3.095742   2.169
## RANGONIVEL_C           34.291175   2.680992  12.790
## RANGONIVEL_D           51.996228   3.095742  16.796
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1      0.361735   4.378041   0.083
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1     -1.165322   4.378041  -0.266
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16     2.691410   4.378041   0.615
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16    -0.023644   4.378041  -0.005
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2    -1.686068   4.378041  -0.385
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2    -0.418986   4.378041  -0.096
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4    -0.498358   4.378041  -0.114
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4    -0.346356   4.378041  -0.079
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6    -1.456510   4.378041  -0.333
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6    -1.333259   4.378041  -0.305
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_B     1.242800   4.191655   0.296
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_B     1.198528   4.378041   0.274
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_C    -5.500165   3.895390  -1.412
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_C    -3.204451   4.095282  -0.782
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_D           NA           NA           NA
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_D           NA           NA           NA
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B     -0.399924   4.378041  -0.091
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B      0.230170   4.378041   0.053
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B     -0.693270   4.378041  -0.158
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B     -0.164526   4.378041  -0.038

```

## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B	-0.110136	4.378041	-0.025
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C	-2.015873	3.791495	-0.532
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C	0.082244	3.791495	0.022
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C	-1.097927	3.791495	-0.290
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C	-0.073195	3.791495	-0.019
## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C	-1.165844	3.791495	-0.307
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D	0.749329	4.378041	0.171
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D	1.027482	4.378041	0.235
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D	-1.909652	4.378041	-0.436
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D	-0.099464	4.378041	-0.023
## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D	0.001010	4.378041	0.000
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B	-1.090479	6.061123	-0.180
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B	0.064043	6.191485	0.010
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B	-3.423624	6.061123	-0.565
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B	-0.627293	6.191485	-0.101
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B	1.273003	6.061123	0.210
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B	1.249875	6.191485	0.202
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B	-0.735776	6.061123	-0.121
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B	-0.642264	6.191485	-0.104
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B	-0.169726	6.061123	-0.028
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B	1.785738	6.191485	0.288
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C	-0.532172	5.435945	-0.098
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C	1.834457	5.791604	0.317
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C	-5.400678	5.435945	-0.994
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C	-1.447753	5.791604	-0.250
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C	-0.466845	5.435945	-0.086
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C	-1.684671	5.791604	-0.291
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C	-1.253064	5.435945	-0.231
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C	-0.704601	5.791604	-0.122
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C	-0.579104	5.435945	-0.107
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C	0.808183	5.791604	0.140
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D	NA	NA	NA
##			
	Pr(> t )		
## (Intercept)	0.00333	**	
## ANTICOAGULANTEEDTA	0.79311		
## ANTICOAGULANTEHEP	0.65666		
## TIEMPODIA_1	0.99892		
## TIEMPODIA_16	0.84762		
## TIEMPODIA_2	0.98931		
## TIEMPODIA_4	0.77020		
## TIEMPODIA_6	0.96776		
## RANGONIVEL_B	0.03291	*	
## RANGONIVEL_C	< 2e-16	***	
## RANGONIVEL_D	< 2e-16	***	
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1	0.93435		
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1	0.79076		
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16	0.54038		
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16	0.99570		
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2	0.70112		
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2	0.92399		

```

## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4 0.90964
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4 0.93713
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6 0.74020
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6 0.76147
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_B 0.76758
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_B 0.78494
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_C 0.16165
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_C 0.43614
## ANTICOAGULANTEEDTA:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:RANGONIVEL_D NA
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B 0.92743
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B 0.95820
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B 0.87456
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B 0.97011
## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B 0.97999
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C 0.59635
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C 0.98275
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C 0.77285
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C 0.98464
## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C 0.75923
## TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D 0.86451
## TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D 0.81502
## TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D 0.66382
## TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D 0.98193
## TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D 0.99982
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B 0.85765
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_B 0.99177
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B 0.57368
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_B 0.91954
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B 0.83415
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_B 0.84051
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B 0.90367
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_B 0.91763
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B 0.97773
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_B 0.77374
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C 0.92225
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_C 0.75222
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C 0.32331
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_C 0.80322
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C 0.93177
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_C 0.77186
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C 0.81825
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_C 0.90346
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C 0.91541
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_C 0.88935
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_1:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_16:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_2:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_4:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEEDTA:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D NA
## ANTICOAGULANTEHEP:TIEMPODIA_6:RANGONIVEL_D NA
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##

```

```
## Residual standard error: 3.096 on 84 degrees of freedom
## (1 observation deleted due to missingness)
## Multiple R-squared: 0.9797, Adjusted R-squared: 0.9654
## F-statistic: 68.71 on 59 and 84 DF, p-value: < 2.2e-16
```

```
##GRÁFICOS PLOT
```

```
library(Rcmdr)
```

```
## Loading required package: splines
```

```
## Loading required package: RcmdrMisc
```

```
## Loading required package: car
```

```
## Loading required package: carData
```

```
## Loading required package: sandwich
```

```
## Loading required package: effects
```

```
## Registered S3 methods overwritten by 'lme4':
```

```
## method from
```

```
## cooks.distance.influence.merMod car
```

```
## influence.merMod car
```

```
## dfbeta.influence.merMod car
```

```
## dfbetas.influence.merMod car
```

```
## lattice theme set by effectsTheme()
```

```
## See ?effectsTheme for details.
```

```
## La interfaz R-Commander sólo funciona en sesiones interactivas
```

```
##
```

```
## Attaching package: 'Rcmdr'
```

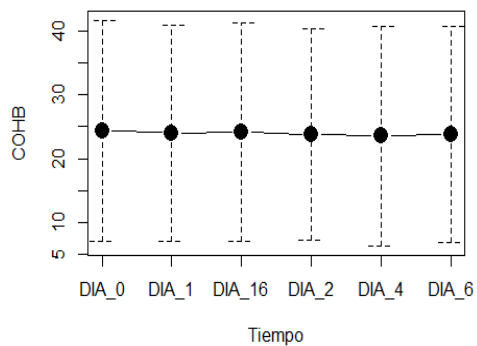
```
## The following object is masked from 'package:base':
```

```
##
```

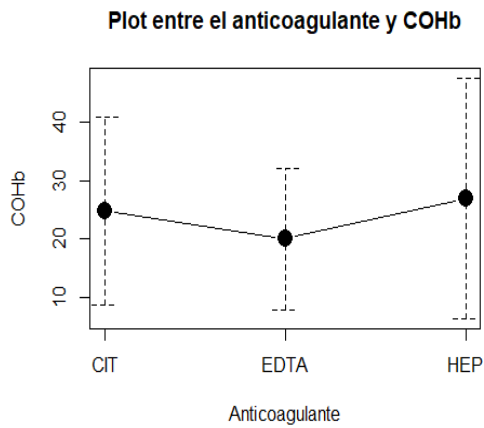
```
## errorCondition
```

```
with(NOE[1:145,], plotMeans(COHB, TIEMPO, error.bars=c("sd"), connect=TRUE, xlab='Tiempo', ylab='COHB',
main='Plot entre el Tiempo y COHB'))
```

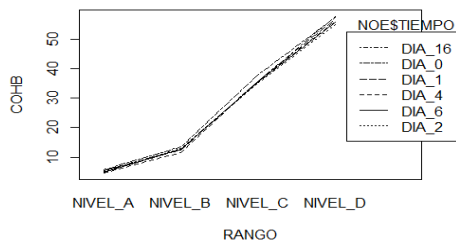
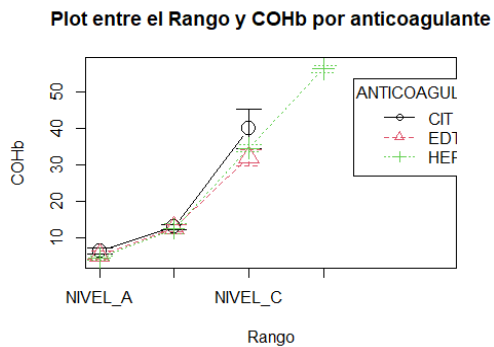
**Plot entre el Tiempo y COHB**



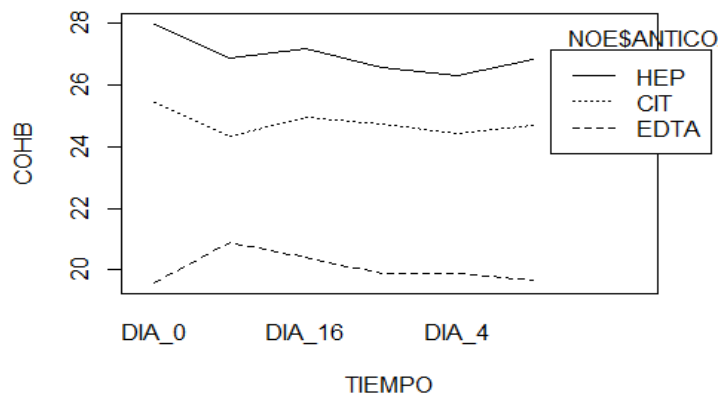
```
with(NOE[1:145,], plotMeans(COHB,ANTICOAGULANTE, error.bars=c("sd"), connect=TRUE,xlab='Anticoagulante',ylab='COHb',
                           main='Plot entre el anticoagulante y COHb'))
```



```
with(NOE[1:145,], plotMeans(COHB,RANGO,ANTICOAGULANTE, error.bars=c("sd"), connect=TRUE,xlab='Rango',ylab='COHb',
                           main='Plot entre el Rango y COHb por anticoagulante'))
```



```
interaction.plot(NOE$TIEMPO,NOE$ANTICOAGULANTE,NOE$COHB,
                col=1,xlab='TIEMPO',ylab='COHB',leg.bty='o',cex=1.4)
interaction.plot(NOE$TIEMPO,NOE$ANTICOAGULANTE,NOE$COHB,
                col=1,xlab='TIEMPO',ylab='COHB',leg.bty='o',cex=1.4)
```



## O. Anexo.

### Informe del software R con el tratamiento de los datos para la correlación entre COT y %COHb.

```
DATOS_ESTUDIO <- readXL("C:/Users/SOFIA/Desktop/ESTUDIO.xlsx",  
  rownames=FALSE, header=TRUE, na="", sheet="Sheet1", stringsAsFactors=TRUE)
```

```
summary(DATOS_ESTUDIO)
```

```
##      COHb      Promedio_COT  
## Min.   :1.61  Min.   :0.8056  
## 1st Qu.:2.23  1st Qu.:0.9551  
## Median :2.63  Median :1.0010  
## Mean   :2.79  Mean   :1.0056  
## 3rd Qu.:3.30  3rd Qu.:1.0638  
## Max.   :4.68  Max.   :1.2012
```

```
numSummary(DATOS_ESTUDIO[, "COHb", drop=FALSE], statistics=c("mean", "sd",  
  "IQR", "quantiles"), quantiles=c(0,.25,.5,.75,1))
```

```
## mean      sd IQR  0% 25% 50% 75% 100% n  
## 2.79 0.7966728 1.07 1.61 2.23 2.63 3.3 4.68 49
```

```
summary(DATOS_ESTUDIO)
```

```
##      COHb      Promedio_COT
## Min.   :1.61  Min.   :0.8056
## 1st Qu.:2.23  1st Qu.:0.9551
## Median :2.63  Median :1.0010
## Mean   :2.79  Mean   :1.0056
## 3rd Qu.:3.30  3rd Qu.:1.0638
## Max.   :4.68  Max.   :1.2012
```

```
numSummary(DATOS_ESTUDIO[, "Promedio_COT", drop=FALSE], statistics=c("mean",
"sd", "IQR", "quantiles"), quantiles=c(0,.25,.5,.75,1))
```

```
##      mean      sd      IQR      0%      25%      50%      75%      100%
## 1.005583 0.09053352 0.1087026 0.8055536 0.9551243 1.000958 1.063827 1.201229
## n
## 49
```

```
sapply(DATOS_ESTUDIO, function(x)(sum(is.na(x)))) # NA counts
```

```
##      COHb Promedio_COT
##      0      0
```

```
normalityTest(~COHb, test="ad.test", data=DATOS_ESTUDIO)
```

```
##
## Anderson-Darling normality test
##
## data: COHb
## A = 0.55091, p-value = 0.148
```



```
normalityTest(~Promedio_COT, test="ad.test", data=DATOS_ESTUDIO)
```

```
##
## Anderson-Darling normality test
##
## data: Promedio_COT
## A = 0.16673, p-value = 0.9343
```

```
with(DATOS_ESTUDIO, cor.test(COHB, Promedio_COT, alternative="two.sided",
method="pearson"))
```

```
##
## Pearson's product-moment correlation
##
## data: COHB and Promedio_COT
## t = 1.3832, df = 47, p-value = 0.1731
## alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -0.08832708 0.45374326
## sample estimates:
## cor
## 0.1977819
```

```
DOE <- read_excel("C:/Users/SOFIA/Desktop/ESTUDIO.xlsx")
```

```
summary(DOE)
str(DOE)
names(DOE)
DOE1 <- DOE[1:50,]
aov(DOE1)
m1 <- aov(Promedio_COT~COHB, data=DOE1[1:50,])
summary(m1)
lm(m1)
m1.1 <- lm(Promedio_COT~COHB, data=DOE[1:50,])
summary(m1.1)
```

```
Call:
lm(formula = m1)

Coefficients:
(Intercept)          COHb
      0.94288         0.02248

> m1.1 <- lm(Promedio_COT~COHb,data=DOE[1:50,])
> summary(m1.1)

Call:
lm(formula = Promedio_COT ~ COHb, data = DOE[1:50, ])

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.194185 -0.047939  0.002567  0.061893  0.201875

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  0.94288    0.04711  20.015  <2e-16 ***
COHb         0.02248    0.01625   1.383   0.173
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.08968 on 47 degrees of freedom
(1 observation deleted due to missingness)
Multiple R-squared:  0.03912, Adjusted R-squared:  0.01867
F-statistic: 1.913 on 1 and 47 DF, p-value: 0.1731
```

## P. Anexo.

**Resultados de %COHb y COt en las muestras de sangre analizadas por ambas metodologías.**

Voluntario	N° Muestra	Sexo	Edad	%COHb	Concentración en $\mu\text{mol }^{12}\text{CO/mL}$			
					Dato 1	Dato 2	Promedio	Incertidumbre
1	1	M	21	4,7	1,1	1,2	1,2	0,2
2	6	M	38	3,9	1,0	-	1,0	0,2
3	9	M	20	3,4	0,9	-	0,9	0,2
4	21	M	25	3,7	0,9	-	0,9	0,2
5	22	M	19	2,5	1,0	-	1,0	0,2
6	24	M	20	3,3	1,0	-	1,0	0,2
7	25	M	19	4,3	1,1	1,2	1,1	0,2
8	38	M	26	2,7	1,0	-	1,0	0,2
9	40	F	21	3,9	0,9	-	0,9	0,2
10	41	F	26	3,8	1,0	-	1,0	0,2
11	49	M	30	3,0	1,0	-	1,0	0,2
12	55	M	25	3,0	1,0	-	1,0	0,2
13	62	M	24	3,3	1,0	-	1,0	0,2
14	63	M	24	4,1	1,1	-	1,1	0,2
15	72	M	30	2,4	1,0	-	1,0	0,2
16	75	M	21	2,3	1,1	1,1	1,1	0,2

Voluntario	N° Muestra	Sexo	Edad	%COHb	Concentración en $\mu\text{mol }^{12}\text{CO}/\text{mL}$			
					Dato 1	Dato 2	Promedio	Incertidumbre
17	77	F	22	3,3	1,0	-	1,0	0,2
18	80	M	27	1,6	0,9	-	0,9	0,2
19	84	M	20	2,1	0,9	-	0,9	0,2
20	95	M	37	2,6	1,0	-	1,0	0,2
21	96	F	19	3,2	0,9	-	0,9	0,2
	105			1,7	0,9	1,0	1,0	0,2
	107			1,9	1,0	1,0	1,0	0,2
22	97	M	22	2,2	1,0	1,1	1,1	0,2
	100			1,7	1,1	1,3	1,2	0,2
23	101	M	19	2,4	1,0	-	1,0	0,2
	103			2,3	1,0	1,1	1,0	0,2
24	102	M	26	2,9	1,0	1,1	1,0	0,2
	104			3,6	1,4	-	1,4	0,2
25	106	M	44	3,5	1,1	-	1,1	0,2
	109			2,3	1,1	1,0	1,0	0,2
26	108	M	25	1,9	1,0	1,0	1,0	0,2
	110			3,1	1,1	1,1	1,1	0,2
27	111	M	22	2,5	1,1	1,0	1,0	0,2
	114			4,6	1,2	-	1,2	0,2
	126			7,5	1,2	-	1,2	0,2
28	112	F	29	3,1	0,9	0,9	0,9	0,2
	115			2,6	0,9	-	0,9	0,2
29	113	M	21	3,7	1,0	1,2	1,1	0,2
	116			2,3	1,0	1,1	1,1	0,2
	168			2,7	1,1	1,1	1,1	0,2

Voluntario	N° Muestra	Sexo	Edad	%COHb	Concentración en $\mu\text{mol } ^{12}\text{CO}/\text{mL}$			
					Dato 1	Dato 2	Promedio	Incertidumbre
30	117	M	21	2,7	1,0	-	1,0	0,2
	118			3,1	1,3	1,2	1,2	0,2
31	120	M	21	2,1	1,0	-	1,0	0,2
32	121	M	23	2,1	1,0	-	1,0	0,2
33	125	M	20	2,6	1,1	-	1,1	0,2
34	131	F	23	1,7	1,0	-	1,0	0,2
35	135	M	19	1,7	1,1	-	1,1	0,2
36	145	M	21	2,1	0,9	-	0,9	0,2
37	153	M	19	2,5	0,8	-	0,8	0,1
38	167	M	20	3,0	0,9	-	0,9	0,2
39	169	M	23	1,9	1,1	-	1,1	0,2

F: Femenino. M: Masculino.

# Q. Anexo.

## Informe Calificación operacional HS-GC-MS

PROCESO: SOPORTE  
 CÓDIGO: FK-P3-01  
 VERSIÓN: 03-12 De Mayo de 2015



Certificados ISO 9001:2008

### INFORME DE SERVICIO Y/O ACTA DE RECIBO A SATISFACCIÓN

**Ciudad y Fecha:** MEDELLÍN - Friday, May 03, 2019      **Inicio servicio:** 02/05/2019 8:00 a.m.  
**Código del Informe:** KH8427      **Fin servicio:** 03/05/2019 5:30 p.m.  
**Compañía:** INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES SECCIONAL MEDELLIN      **Dirección:** Carrera 65N 80-325  
**Persona encargada:** TATIANA JIMENEZ PINZON  
**Usuario:** ERICA SOFIA VILLA CORREA  
**Motivo de la Visita:** Mantenimiento Preventivo       Instalación       Calificación OQ/PV   
    Entrenamiento       Soporte Telefónico       Diagnostico   
    Mantenimiento Correctivo       Soporte Remoto       Acta de Entrega   
**Equipo:** 7890B 5977B 7697A --- 108885      **Serial:** CN17383001  
 Agilent Technologies

### Configuración

Items	Nombre Componente	Configuración	Módulo	Serial	Versión
1	7697A	HEADSPACE SAMPLER	N/A	CN17410047	7697A
2	ALS	7693	G4513A	CN17480025	7693
3	FRONT INLET	SPL/SPLSS	N/A	SPL/SPLSS	SPL/SPLSS
4	MASS SELECTIVE DETECTOR	MASS SELECTIVE DETECTOR	5977B	US1746M042	5977B Extraction Source
5	TRAY	7693	G4514A	CN17460064	7693

Carrera 18 No. 82- 23

Bogotá, D.C. Colombia

PBX: 571 - 691 3111

Fax: 571 - 617 0403

www.khymos.com  
 info@khymos.com



**Agilent Technologies**

Authorized Distributor

PROCESO: SOPORTE  
 CÓDIGO: FK-P3-01  
 VERSIÓN: 03-12 De Mayo de 2015



## Detalles de la Revisión

**Diagnóstico:** N/A

**Descripción:** Se realiza inyecciones de muestras de control del cliente y tune para tener como referencia inicial de la intervención.

Se ventea el equipo y se realiza calificación operacional de acuerdo al protocolo de Agilent para la configuración del equipo. Se vuelve a acondicionar el equipo y se deja en las condiciones iniciales que tenía el cliente. Se realiza tune y se vuelve a realizar análisis de los controles del usuario.

**Acciones Correctivas:** N/A

**Recomendaciones:** Se recomienda al cliente, solicitar capacitación en software Mass Hunter, y evitar el uso de excel para preservar la integridad de los datos.

**Otros:** N/A

**Pendientes:**

- Si                       No                       Partes / Consumibles  
 Khyμός                 Cliente                 Otro.  
 Cual? N/A

**Anexos:** Protocolos de calificación operacional, resultados y certificados.

**Comentarios:** Todas las pruebas de calificación operacional son satisfactorias.

Se realizan los controles por parte de Sofia Villa y se verifica que el equipo queda plenamente operativo y los parametros de aceptación del equipo se cumplen.



*Esneider Jimenez*  
 Esneider Jimenez Grajales  
 Ingeniero de Soporte  
 esneider.jimenez@khyμός.com  
 www.khyμός.com

**ERICA SOFIA VILLA CORREA**  
 Profesional Universitario Forense  
 INSTITUTO NACIONAL DE  
 MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS  
 FORENSES SECCIONAL MEDELLIN

Carrera 18 No. 82- 23

Bogotá, D.C. Colombia

PBX: 571 - 691 3111

Fax: 571 - 617 0403

www.khyμός.com  
 info@khyμός.com



Página 2 de 2

