

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

# Validación de un método para alcoholemia: un enfoque con interferencia de anestésicos

Joel Martínez Quiroz<sup>1✉</sup>, Rosa María Esther González Rodríguez<sup>1</sup><sup>1</sup>Dirección General de los Servicios Periciales. FGE-Veracruz. Circuito Primavera s/, Unidad Nuevo Xalapa, Xalapa, Veracruz, México.

✉ joemartinez@uv.mx

## Datos del artículo

Cita: Martínez Quiroz Joel, González Rodríguez Rosa María Esther. 2022. Validación de un método para alcoholemia: un enfoque con interferencia de anestésicos. Revista Digital de Ciencia Forense. 1(2): 1-12 pp.

Editor: María Elena Bravo Gómez.

Recibido: 11 noviembre 2021.

Aceptado: 17 junio 2022.

Publicado: 28 octubre 2022.

## Resumen

La cromatografía de gases convencional (HS-GC-FID) es la técnica de elección para la determinación de alcohol etílico en fluidos biológicos. En caso de un resultado positivo, existe la convención de realizar un segundo ensayo, pero empleando una fase estacionaria distinta a la primera. Sin embargo, se han reportado limitaciones en la selectividad de este método debido a que algunos analitos como el sevoflurano y el enflurano, coeluyen o interfieren en la identificación plena del etanol y el cambio de columna cromatográfica no resuelve en su totalidad el inconveniente que se presenta con estos anestésicos. Por consiguiente, el presente trabajo propone un método alternativo para confirmar la presencia de etanol. Lo anterior, mediante el acoplamiento del cromatógrafo a un espectrómetro de masas (HS-GC-MS). Esta técnica brindó un método válido con un límite de detección de 0.58 g/L, adecuado en los casos de manejo de vehículos bajo la influencia de bebidas embriagantes; con precisión aceptable (C.V.  $\leq$  15%), libre de arrastre cromatográfico con una concentración de hasta 4.375 g/L. El método también resultó libre de interferencias como tolueno, cloroformo, n-butanol, metil terbutil éter, alcohol isoamílico; inclusive de anestésicos como el halotano, el isoflurano, el uretano y el propofol; los cuales no sería posible distinguirlos en un análisis toxicológico convencional. El método podría aplicarse en el análisis de muestras de sangre obtenidas a partir de pacientes o personas fallecidas quienes previamente hayan recibido terapia hospitalaria; a fin de descartar que el pico cromatográfico pueda deberse a la interferencia de algún anestésico.

**Palabras clave:** alcoholemia, anestésicos, interferencia, validación.

## Abstract

Headspace-gas chromatography with flame ionization detector (HS-GC-FID) prevails as the choice technique for blood alcohol determination (BAC) and other biological fluids. Almost all forensic laboratories include this routine procedure by analyzing two replicates of blood and confirm consequently, a positive result by using another stationary phase. However, certain analytes, as anesthetics sevoflurane and enflurane, have showed interference by co-eluting with ethyl alcohol, which affects method selectivity and makes interpretation difficult to reach. This paper proposes a method (HS-GC-MS), which use a mass spectrometer coupled to a gas chromatograph in order to confirm a BAC positive result in cases which blood samples come from hospitalized patients. The limit of detection for ethanol was 0.58 g/L, just below the legal threshold to drive vehicles under influence. Precision was acceptable and chromatographic carryover was not observed with alcohol concentration up to 4.375 g/L. Selectivity was adequate because the method was free of interferences as toluene, chloroform, n-butanol, methyl terbutyl ether, isoamyl alcohol and even with anesthetics as isoflurane, urethane, halothane and propofol. The present method could be used to analyze blood samples, which were obtained from corpses or patients previously subjected to hospital therapy, in order to confirm an alcohol positive result or to discard it because the presence of some anesthetic compound.

**Keywords:** blood alcohol, anaesthetics, interference, validation

## Introducción

El análisis toxicológico cualitativo tiene como objetivo determinar mediante una serie de procesos (pretratamiento de muestras, extracción-purificación y análisis instrumental), la presencia o ausencia de sustancias tóxicas en una muestra biológica (1). La cromatografía de gases con automuestreador headspace y detector de ionización de flama (HS-GC-FID, por sus siglas en inglés), es la técnica de elección para la determinación cualitativa y cuantitativa de alcohol etílico en fluidos biológicos, la cual no requiere una preparación laboriosa de la muestra, por lo que los resultados se obtienen en cuestión de minutos (2). En caso de un resultado positivo, existe la convención de realizar un segundo ensayo, pero con una variación sustantiva en el sistema cromatográfico, al emplear una fase estacionaria distinta a la primera (3,4), e.g. DB-ALC1 vs DB-ALC2. Esta estrategia permite, en ciertos casos, resolver el inconveniente cuando existe interferencia de alguna sustancia que coeluye con el etanol; lo que se denomina falta de selectividad. Al respecto, la selectividad es la capacidad para producir una señal inequívoca del analito en la presencia de otras sustancias bajo las condiciones instrumentales del método y se considera éste el parámetro más importante de todos los que implican a una validación (5). Recientemente, se han reportado insuficiencias en la selectividad del método para determinar alcohol etílico en presencia de anestésicos con la técnica HS-GC-FID. Estas deficiencias radican en una interferencia del pico cromatográfico del sevoflurano con el del etanol (6), o una interferencia del pico del enflurano con el pico del estándar interno tert-butanol (7). Resulta importante considerar que, en años recientes, la tasa de colisiones fatales de vehículos automotores cuyo conductor presentaba aliento alcohólico ha aumentado en la población juvenil (8), que cerca del 10% de los lesionados en este estado ingresan a algún nosocomio y que son pacientes susceptibles para recibir terapia con anestésicos. Estos inconvenientes obligan al toxicólogo analítico a explorar una alternativa a la técnica cromatográfica convencional en la determinación de alcoholemias. Actualmente, la técnica de espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases con automuestreador headspace (HS-GC-MS, por sus siglas en inglés), se ha validado para el análisis de etanol en sangre en casos en los que se sospecha de intoxicación por inhalantes como tolueno (9), o de abuso de propelentes (10). El presente trabajo tiene por objetivo la validación de un método analítico para determinar cualitativamente alcohol etílico en sangre mediante el sistema espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases con automuestreador headspace con énfasis en el análisis simultáneo de anestésicos como isoflurano, uretano, halotano y propofol.

## Material y Método

### Reactivos

Se utilizó alcohol etílico absoluto anhidro (J.T. Baker, USA) como sustancia orgánica volátil de interés (SOV), así como cloroformo, alcohol isoamílico, n-butanol, isobutanol, metil etil cetona (J.T. Baker, USA), alcohol alílico (Merck, USA), metil terbutil éter y tolueno (Sigma Aldrich, USA) para valorar la selectividad con otras SOV. En lo que respecta a la evaluación de la selectividad con fármacos anestésicos, se emplearon los anestésicos que se distinguen por ser de fácil acceso y por emplearse además como drogas de recreación o de abuso (11, 12). Se emplearon halotano (Hoechst, Alemania) e isoflurano (VEDCO, USA), uretano (Sigma-Aldrich, USA) y propofol (Baxter, USA); así como agua destilada (J.T. Baker, USA).

Para la selectividad con los isotopos se utilizó etanol-1,1,2,2,2-d5 (Sigma-Aldrich, USA).

Se empleó *pool* de sangre completa como matriz para las pruebas de límite de detección y arrastre cromatográfico (*carryover*).

### Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas modelo 6890 con un detector de masas 5973N (Agilent Technologies). El horno del cromatógrafo se acondicionó con una columna DB-5MS de 25 m x 0.20 mm x 0.33  $\mu$ m con 5% fenil y 95% metilpolisiloxano y se trabajó con una programación de temperatura inicial de 52°C durante 3.20 min hasta alcanzar una temperatura de 115°C a una velocidad de 60°C/min manteniéndose por 1.45 min con un tiempo de corrida de 5.7 min. Para la columna se usó una presión de 16.36 psi con un flujo de 0.9 mL/min y una velocidad media de 39 cm/seg usando helio como gas acarreador. La temperatura del inyector fue de 100°C.

El espectrómetro de masas se operó en modo Scan, sin solvent delay y en un intervalo de masas de 33-200 m/z.

El automuestreador headspace modelo G1888 (Agilent Technologies) trabajó con una temperatura de 80°C para el horno, 90°C para la aguja y 100°C para la línea de transferencia. El tiempo de corrida fue de 5.7 min, los viales se calentaron en termostato durante 5 min, se presurizaron durante 5 min, tiempo de llenado de la aguja de 0.20 min y 0.05 min para su equilibrio respectivamente. Por último, el tiempo de inyección fue de 0.02 min.

Los parámetros considerados para la validación de este método fueron tomados a partir de los criterios del grupo de trabajo científico en toxicología forense, SWGTOX (13).

### *Parámetros de validación*

#### Limite de detección

Con base en el criterio de SWGTOX (13) que sugiere emplear a una “concentración de punto de decisión” como límite de detección; se preparó sangre fortificada con etanol a una concentración de 0.585 g/L, establecida con base en concentraciones clínicas reportadas por la Secretaría de Salud (14), las cuales se analizaron por triplicado en tres días distintos para poder evaluar repetibilidad y reproducibilidad.

#### Arrastre cromatográfico (*Carryover*)

Para valorar si el método presentaba arrastre cromatográfico se preparó sangre fortificada con etanol a una concentración de 4.375 g/L, la cual se analizó por triplicado, intercalando en cada réplica un blanco de sangre libre de volátiles, esto por tres días consecutivos.

### *Selectividad*

#### Interferencia de la sangre

Se ensayaron diez muestras de sangre provenientes de fuentes diferentes a las cuales no se les adicionó etanol o su estándar marcado isotópicamente.

#### Anestésicos

Para evaluar la interferencia entre el etanol y anestésicos se prepararon soluciones de halotano, uretano, isoflurano y propofol a concentraciones finales de 0.260 g/L, 0.380 g/L, 0.07 g/L y 0.5 g/L respectivamente, las cuales corresponden a las concentraciones plasmáticas reportadas por Archer et al. (15), Winek et al. (16), y Guitton et al. (17). No se evaluó a los metabolitos de los anestésicos señalados en virtud de que la interferencia manifiesta que se ha reportado para algunos de ellos, se da con la sustancia administrada y en situaciones en las que se especula una intoxicación aguda que puede conllevar a la muerte por sobredosis (12).

#### Otras sustancias orgánicas volátiles

Para determinar las posibles interferencias de etanol con otras sustancias orgánicas volátiles comúnmente encontradas, se empleó cloroformo, alcohol isoamílico, n-butanol, isobutanol, metil etil cetona, alcohol alílico, metil terbutil éter y tolueno.

#### Estándares marcados isotópicamente

Las pruebas de selectividad con estándares marcados isotópicamente se llevaron a cabo con tres triplicados diferentes, el primero de blancos de sangre, el segundo fortificado con etanol deuterado-d5 a una concentración de 2.438

g/L y el tercero fortificado con etanol no deuterado a una concentración de 2.332 g/L.

Para los ensayos de límite de detección y arrastre cromatográfico se usó una alícuota del estándar de sangre fortalecida de 200  $\mu$ L, mientras que los de selectividad se empleó 1  $\mu$ L de los anestésicos y de los compuestos orgánicos volátiles y para los ensayos con estándar marcado isotópicamente se utilizó una alícuota de 20  $\mu$ L las cuales se depositaron en un vial de vidrio de 20 mL sellado con una tapa de aluminio con septa de PTFE herméticamente.

### *Análisis estadísticos de los datos.*

Se empleó a la media como medida de tendencia central y a la desviación estándar y al coeficiente de variación como medidas de dispersión. Se empleó además el estadístico t de student de variables independientes para valorar el arrastre cromatográfico. El nivel de significancia empleado fue de  $\alpha = 0.05$ .

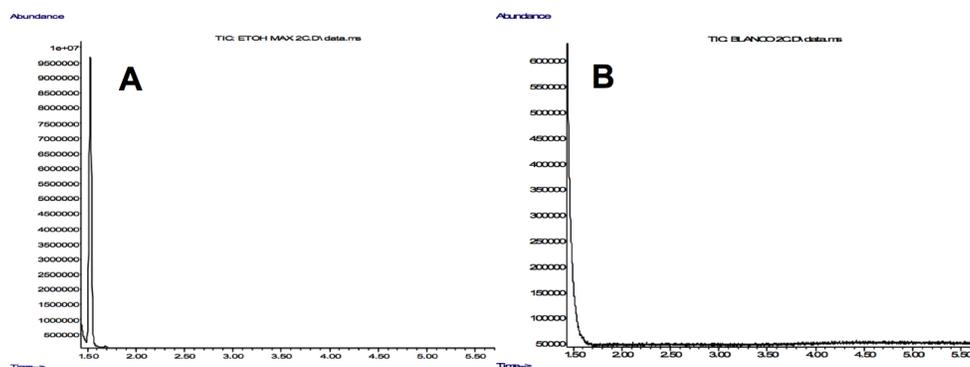
## Resultados

### *Límite de detección*

Se determinó el límite de detección de etanol en el sistema HS-GC-MS a una concentración de 0.585 g/L en virtud de que, a esta concentración, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) observada presentó una variación aceptable ( $C.V. \leq 15\%$ ) en el análisis de las réplicas (Tabla 1).

### *Arrastre cromatográfico (carryover).*

No se presentó arrastre cromatográfico en los ensayos replicados de sangre fortalecida con etanol a una concentración de 4.375 g/L, toda vez que en los cromatogramas obtenidos de los blancos de sangre no apareció señal residual de analito derivada de la inyección previa del fortificado, como se aprecia ilustrativamente en la figura 1.



**Figura 1.** Cromatograma de una réplica de etanol a una concentración de 4.375 g/L (panel A), en contraste con el obtenido del blanco de sangre analizado después del fortificado (panel B).

**Tabla 1.** Resultados de las alturas de los picos cromatográficos de réplicas de etanol a una concentración de 0.585 g/L.

Corrida	Réplica	Altura del pico	Repetibilidad	
Día 1	A	1,318,376	Media	1,189,630.333
	B	1,187,525	DS	127,706.0162
	C	1,062,990	CV	10.73%
Día 2	A	1,141,186	Media	1,150,197.333
	B	1,145,716	DS	11,902.4901
	C	1,163,690	CV	1.04%
Día 3	A	1,349,284	Media	1,326,968
	B	1,220,790	DS	96,965.4748
	C	1,410,830	CV	7.31%
Reproducibilidad	Media	1,222,265.222		
	DS	113,671.711		
	CV	9.3%		

DS= Desviación estándar, CV= Coeficiente de variación.

### Selectividad

#### Interferencia de la sangre

No hubo interferencia de los componentes propios de la sangre con el etanol, ya que la magnitud de la señal de línea base al tiempo de retención del analito, en los blancos de sangre fue significativamente menor ( $t_{17}=25.71$ ,  $p<0.05$ ), a la correspondiente señal del límite de detección del etanol (Tabla 2).

#### Compuestos orgánicos volátiles comúnmente encontrados

No se encontró interferencia con el etanol de las sustancias orgánicas volátiles valoradas, debido a que estas no eluyen en el mismo tiempo de retención que el analito de interés y su resolución fue mayor a 1.5. el cuál es el mínimo necesario (5), para considerar resueltos dos picos que eluyen próximos entre sí (Tabla 3).

#### Estándares marcados isotópicamente

La magnitud de la señal correspondiente al ion molecular ( $m/z = 46$ ) situada al tiempo de retención del etanol en los blancos de sangre (matriz sin etanol) fue insignificante comparada con la magnitud de la señal propia del analito. De igual modo, el ion molecular marcado isotópicamente ( $m/z = 51$ ) no presentó interferencia manifiesta con el ion molecular del analito natural (Tabla 4).

**Tabla 2.** Resultados de la valoración de interferencia de la sangre entre la concentración mínima de etanol (0.585 g/L) y blanco de sangre *post mortem*.

Mínima de concentración de etanol (Altura del pico)	Matriz sin etanol o blanco de sangre (Altura de la señal al TR de etanol)
1,318,376	76,000
1,187,525	140,000
1,062,990	108,000
1,141,186	88,000
1,145,716	77,000
1,163,690	110,000
1,349,284	140,000
1,220,790	198,000
1,410,830	169,000
N/D	290,000
Promedio	
1,222,265.222	139,600
DS	
113,617.711	66,161.7547

N/D= No determinado, TR= Tiempo de retención.

**Tabla3.** Tiempos de retención y resoluciones obtenidos de los compuestos orgánicos respecto a etanol.

Analito	Tiempo de retención	Resolución (R <sub>s</sub> )
Alcohol alílico	1.621	2.288
Metil terbutil éter	1.682	1.525
Metil etil cetona	1.817	5.985
Cloroformo	1.982	3.6
Isobutanol	2.019	6.12
n- butanol	2.308	6.37
Alcohol isoamilico	3.259	8.601
Tolueno	3.657	4.166

**Tabla 4.** Abundancias obtenidas del ion 46 y ion 51 en los triplicados de sangre sin etanol, con etanol y etanol deuterado.

Réplica	Sangre			
	Matriz (sin etanol)	Con etanol	Etanol deuterado	
	Ion 46	Ion 46	Ion 46	Ion 51
1	243	32,192	12,116	60,312
2	282	26,072	14,963	74,368
3	227	49,224	9,827	46,680

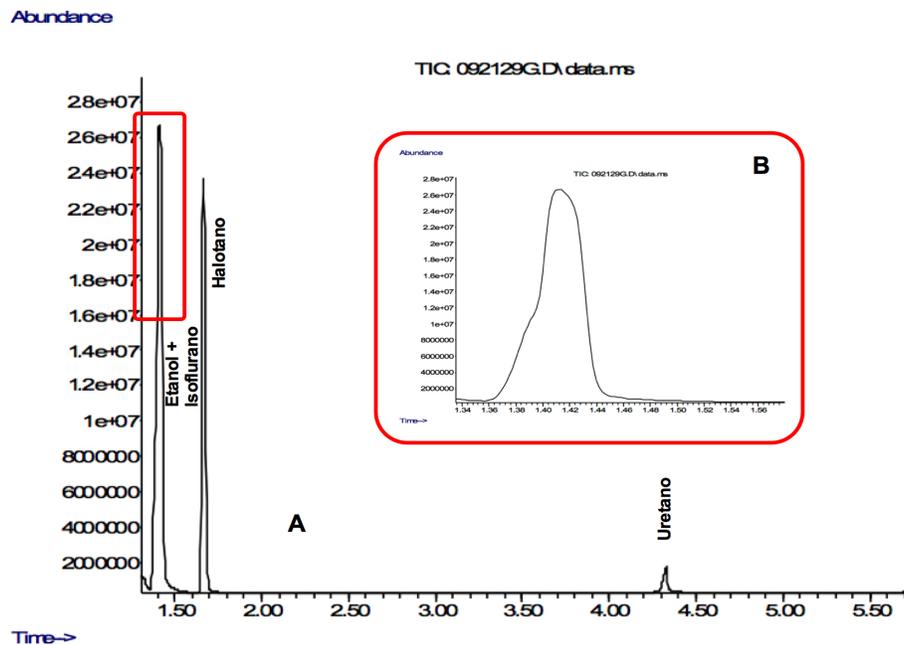
### Anestésicos

No se encontró interferencia con el etanol del halotano, uretano y propofol (Tabla 5), debido a que estos anestésicos no eluyen en el mismo tiempo de retención que el analito de interés y su resolución fue mayor a 1.5 (5). No obstante, bajo el criterio cromatográfico, el isoflurano se considera un interferente toda vez que se observó una resolución menor a 1, como se ilustra en la figura 2, en la cual se detalla la coelución de las dos sustancias.

**Tabla 3.** Tiempos de retención y resoluciones de anestésicos respecto a etanol.

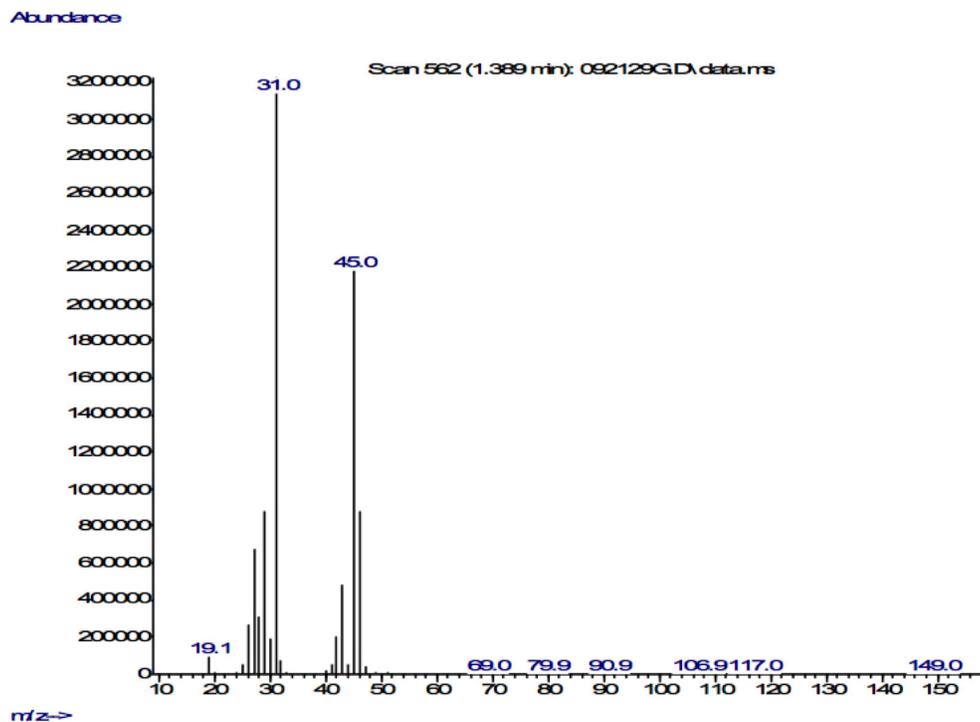
Anestésico	Tiempo de retención (min)	Resolución (R <sub>s</sub> )
Isoflurano	1.423	0.3016
Halotano	1.682	3.72
Uretano	4.384	33.1111
Propofol	N/A	N/A

N/A= No apareció.

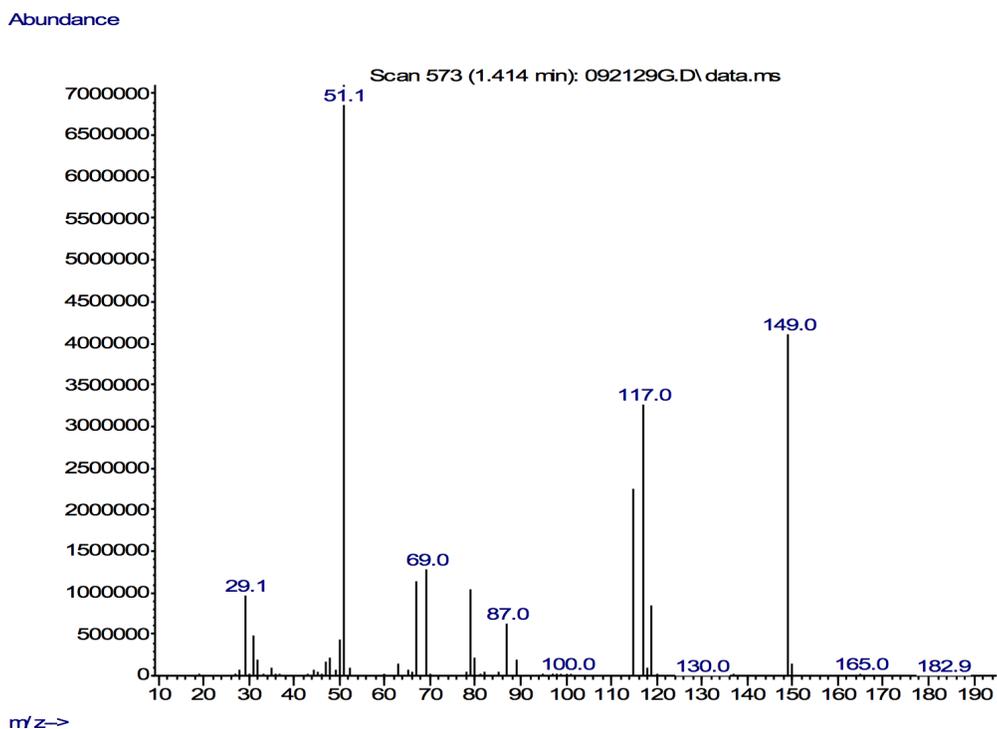


**Figura 2.** Cromatograma TIC del estudio de selectividad de etanol con los anestésicos isoflurano, halotano y uretano (panel A), con magnificación de la coelución del etanol con el isoflurano (panel B).

A pesar de la interferencia cromatográfica manifiesta entre el etanol y el isoflurano, el análisis por el acoplamiento HS-GC-MS si logra distinguir a los dos analitos coeluyentes con base en su espectro de masas, identificándose de este modo el etanol (Figura 3), con sus iones típicos  $m/z$  46<sub>24</sub>, 45<sub>38</sub>, 31<sub>100</sub>, 28<sub>50</sub> (18) y el isoflurano (Figura 4), con los iones típicos  $m/z$  149<sub>28</sub>, 117<sub>22</sub>, 51<sub>100</sub>, 115<sub>18</sub> (19).



**Figura 3.** Espectro de masas deducido del cromatograma TIC de la figura 2, mostrando la fracción de iones que eluyen a 1.389 min en el pico de coelución del etanol y el isoflurano.



**Figura 4.** Espectro de masas deducido del cromatograma TIC de la figura 2, mostrando la fracción de iones que eluyen a 1.414 min en el pico de coelución del etanol y el isoflurano.

## Discusión

En la validación de métodos empleados para el área forense, una precisión aceptable se da con un coeficiente de variación menor o igual al 20% cuando las concentraciones son bajas (20). El estudio de Xiao et al. (9) indica un límite de detección de 0.4 g/L y el de Tiscione et al. (10) de 0.1 g/L, con coeficientes de variación menores al 15% para un acoplamiento similar al presentado (HS-GC-MS). A pesar de que estas concentraciones son más bajas que la evaluada en este trabajo, se enfatiza la aplicación del presente método para muestras con resultado positivo previamente analizadas con un detector convencional (HS-GC-FID) y que además rebasen el límite legal permisible para el manejo de vehículos automotores (21), que es de 0.8 g/L de etanol en sangre (Art 50, SSC); por lo que, una vez identificado y cuantificado en el cromatógrafo convencional, no se hace necesario disponer de un sistema de detección tan sensible.

En lo que respecta al carryover para etanol, no existen reportes de que suceda arrastre cromatográfico en detrimento de algún método previamente ya validado (4, 9), aunque es indispensable ensayar este fenómeno en todo método cromatográfico, en virtud de que este inconveniente es serial por naturaleza y puede presentarse inclusive después del proceso de validación (22). En el presente trabajo se recomienda correr un testigo sin analito entre muestra y muestra para reducir al mínimo la contaminación cruzada entre las corridas.

De acuerdo con el SWGTOX (13), se indica que para determinar que un método es selectivo, es necesario evitar tres tipos de interferencia; la de matriz, la debida a otros analitos y la del marcaje isotópico en caso de utilizar estándares con isotopos estables. Al respecto, la sangre per se no presentó algún componente que interfiera con la señal del etanol, toda vez que tanto en la señal de línea base cromatográfica, como en la abundancia espectrométrica del ión molecular de etanol ( $m/z = 46$ ) en la región correspondiente a la elución del analito, la magnitud registrada no fue suficiente para considerarse como una interferencia manifiesta.

Cabe mencionar que en los métodos reportados para análisis de etanol por HS-GC-MS (4, 9), no se explora el uso de un marcador isotópico, lo que le brinda al presente trabajo una herramienta adicional para su empleo en perspectiva como método cuantitativo, debido a la nula interferencia del etanol deuterado, por lo que es pertinente su empleo mediante la técnica de estándar interno.

En lo que respecta a la posible interferencia debida a otros analitos, los valores de resolución de los picos cromatográficos de alcohol alílico, metil terbutil éter, metil etil cetona, cloroformo, isobutanol, n-butanol, alcohol isoamílico y tolueno fueron suficientemente elevados para considerar al método selectivo para estas sustancias orgánicas volátiles. Xiao et al. (9) solo valoraron n-propanol como otra SOV y Tiscione et al. (4) consideraron además de los incluidos en el presente al 1,1-diluoroetano, al desflurano, al sevoflurano, al

metanol, acetaldehído, pentano, isopropanol, cloruro de metileno, acetonitrilo por citar los más importantes. De todos ellos, el sevoflurano presentó un tiempo de retención más próximo al etanol empleando la fase estacionaria DB-ALC1. Al respecto, esta misma fase estacionaria eluyó al etanol y al sevoflurano a un mismo tiempo de retención en dos estudios independientes (6, 7), lo que evidentemente representa una interferencia cromatográfica ineludible. De modo similar, el isoflurano coeluye con el etanol en la fase estacionaria DB5-MS que se empleó en el presente trabajo. Es importante resaltar que ambos tipos de fase estacionaria suelen constituir a las columnas más empleadas en el área de toxicología forense (3), por lo que su selectividad en los sistemas cromatográficos convencionales se ve restringida si no se logra una correcta identificación del analito. Es por ello que la espectrometría de masas en el acoplamiento HS-GC-MS suministra una herramienta adicional como lo es la dilucidación de un pico mediante los espectros de masas de las fracciones que eluyen del sistema. La diferencia entre los iones que emergen de cada fracción del cromatograma completo de iones se comparó contra la biblioteca de espectros de masas y se logró distinguir la presencia tanto de etanol como del isoflurano. Este método posee, por lo tanto, el potencial de discriminar a dos sustancias cuyos picos cromatográficos están superpuestos y que eluyen a un valor de resolución menor a 1. Se enfatiza así que la espectrometría de masas brinda información molecular de las sustancias analizadas, posicionando a esta técnica como una de mayor categoría por su poder de discriminación; por encima de la cromatográfica y la electroquímica (23), que se ha empleado para distinguir etanol de anestésicos en el ámbito hospitalario; técnicas que únicamente valoran una característica fisicoquímica de las sustancias analizadas (24).

## Consideraciones finales

Este método cualitativo de alcoholemia mediante headspace-cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas es preciso, selectivo, libre de arrastre cromatográfico y permite confirmar la presencia de etanol, inclusive con la interferencia de anestésicos, por lo que puede aplicarse a casos positivos de alcohol de sujetos o cadáveres que procedan de centros hospitalarios, a fin de corroborar la presencia del tóxico de forma científicamente indiscutible y legalmente defendible.

## Bibliografía

1. Martínez-Gonzalez MA. Criterios cualitativos en toxicología forense. *Rev. Esp. Med. Legal.* 2012; 38 (2): p. 68-75. DOI: 10.1016/j.reml.2012.03.004
2. Dorubeț D., Moldoveanu S., Mircea C., Butnaru E., Astărăstoae V. Development and validation of a quantitative determination method of blood ethanol by gas chromatography with headspace (GC-HS). *Rom. J. Leg. Med.* 2009; 4: p. 303-308. DOI: 10.4323/rjlm.2009.303
3. Ojanperä I., Rasanen I. Forensic screening by gas chromatography. En: Bogusz MJ (ed.) *Handbook of analytical separations.* Vol. 6. 2nd ed. Amsterdam. Elsevier B.V.; 2008. p. 403-424. DOI:10.1016/S1567-7192(06)06011-6
4. Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT, Shan X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *J. Anal. Toxicol.* 2011; 35: p. 501-511. DOI: 10.1093/anatox/35.7.501
5. Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: an overview. En: Anderson JL et al. (eds.) *Analytical Separation Science.* Weinheim. Wiley-VCH; 2015; p. 1757-1808. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>
6. Monteiro C. Proença P. Tavares C. Castañera A., Corte-Real F. Interference of anesthetics in blood alcohol analysis by HS-GC-FID: A case report. *Forensic Sci. Int.* 2016; 265: p. 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.010>
7. Xie B., Yan WJ., Meng XY., Miao XG., Yu F., Dong M., Shi Y., Xiang P., Ma CL., Wen D. Influence of halogenated hydroxyl-alkanes inhalation anesthetic on the determination of ethanol content in blood. *J. Forensic Med.* 2020; 36(5): p.682-687. DOI: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.05.014.
8. Guerrero-López C.M., Muñoz-Hernandez J.A., Saenz B., Perez-Nuñez R., Reynales-Shigematsu L.M. Impacto del consumo nocivo de alcohol en accidentes y enfermedades crónicas en México. *Salud Pública de México.* 2013; 55(2): p.S282 S288. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342013000800027](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013000800027)
9. Xiao H., Tong R., Yu J., Chen L., Zou J., Li J., Bian Y., Zhang Y. 2014. Rapid and Sensitive Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Analysis of Ethanol in the Whole Blood. *J. Clin. Lab. Anal.* 00: p.1-6. DOI: 10.1002/jcla.21698
10. Tiscione NB, Yeatman DT, Shan X, Kahl J.H. Identification of volatiles by headspace gas chromatography with simultaneous flame ionization and mass spectrometric detection. *J. Anal. Toxicol.* 2013; 37: p. 573-579. DOI: 10.1093/jat/bkt072
11. Levy R.J. Clinical effects and lethal and forensic aspects of propofol. *J. Forensic Sci.* 2011; 56(01): p. S142-S147. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2010.01583.x
12. Yamashita M., Matsuki A., Oyama T. Illicit use of modern volatile anaesthetics. *Can. Anaesth. Soc. J.* 1984; 31 (1): p. 76-79. DOI: 10.1007/BF03011485
13. SWGTOX. Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) Standard practices for method validation in forensic toxicology. *J. Anal. Toxicol.* 2013; 37: p. 452-474. DOI: 10.1093/jat/bkt054
14. SS. Secretaría de Salud. Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la intoxicación aguda por alcohol etílico en el adulto en segundo y tercer nivel de atención. México. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. 2013.
15. Archer HE., Chapman L., Rhoden E., Warren FL. The estimation of urethane (ethyl carbamate) in blood. *Biochem. J.* 1948; 42 (1): p. 58-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1258596/pdf/biochemj00950-0071.pdf>
16. Winek CL., Wahba WW., Winek Jr. CL., Balzer TW. Drug and chemical blood-level data. *Forensic Sci. Int.* 2001; 122 (2-3): p. 107-123. DOI: 10.1016/s0379-0738(01)00483-2
17. Guilton J., Desage M., Lepape A., Degoute CS., Manchon M., Brazier JL. Quantitation of Propofol in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chrom B.* 1995; 669: p. 358-365. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00105-r
18. Pflieger K., Maurer H.H., Weber A. 1992. *Mass Spectral and GC Data.* 2th edition. Wiley VCH. New York.
19. Schmidt R., Wahl HG., Häberle H., Dieterich HJ., Schurig V. Headspace gas chromatography-mass spectrometry analysis of isoflurane enantiomers in blood samples after anesthesia with the racemic mixture. *Chirality.* 1999; 11: p. 206-211. DOI: 10.1002/(SICI)1520-636X(1999)11:3<206::AID-CHIR6>3.0.CO;2-R
20. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Sección de laboratorio y asuntos científicos. Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. Naciones Unidas. Nueva York, 2010.
21. SSC. Reglamento de Tránsito de la Ciudad de México. Secretaría de Seguridad Ciudadana. Gobierno de la Ciudad de México.
22. Hughes N.C., Wong E.Y.K., Fan J., Bajaj N. 2007. Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry–Based Chromatographic Assays. *The AAPS Journal.* 9(3): p. E353 E360. DOI: 10.1208/aapsj0903042
23. Morimoto Y., Koening H., Kramer G., Zornow M. Monitoring end-tidal ethanol concentrations during general anesthesia. *Anesthesiology.* 2000; 93: 898-901.
24. SWGDRUG. 2019. Scientific Working Group or the Analysis of Seized Drugs. Version 8.0, June-13.