

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"GUÍA PRÁCTICA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS  
MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA VALORACIÓN  
DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA SOLUCIÓN DE  
HEMODIÁLISIS"**

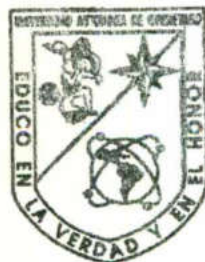
**GUÍA DEL MAESTRO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**FANY IMELDA BASURTO UGALDE**

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA

DIRIGIDA POR:

**M. en C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2002

No. Adq. J50503

No. Título 263 QFB

Clas. TS. 615. 19

B 227 g

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**"GUÍA PRÁCTICA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS  
MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA  
VALORACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA  
SOLUCIÓN DE HEMODIÁLISIS"**

**GUÍA DEL MAESTRO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
FANY IMELDA BASURTO UGALDE**

**DIRIGIDA POR:  
M. en C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**

**SINODALES:**

**M. en C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**

**DIRECTOR**

**Q.B. Ma. DE LOS ÁNGELES ESCAMILLA NAVARRO**

**PROPIETARIO**

**Q.F.B. CARLOS RAFAEL MONTES FERREGRINO**

**SUPLENTE**

**GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA**

*A DIOS por darme la oportunidad de poder realizar este sueño*

*A mi MAMÁ porque con nada podría pagar su amor, sus sacrificios y su apoyo incondicional.*

*A mi ABUELA por darme la fortaleza para enfrentar la vida*

*A mi PAPA... gracias por siempre confiar en mi*

*A mis tíos LEOPOLDO, VICENTA , ELODIA , JORGE y a mi primo CESAR porque a cada uno de ellos les debo esta Licenciatura.*

*A Wendy , Elizabeth, Cira, Coco , Sonia, Flor, Lizbeth y Victor gracias por su amistad pero sobre todo por las palabras de aliento en cada uno de los momentos difíciles por los que pasamos.*

*A la Maestra Paty Villalobos por darme su apoyo y su tiempo para la realización de este proyecto.*

*A mis sinodales Q.B Ángeles Escamilla y el Q.F.B Carlos Feregrino*

## INDICE GENERAL

	Pág.
Índice	i
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	vii
Resumen	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
1. Validación de métodos analíticos	2
a. Objetivo de la validación	3
b. Preparación para la validación	4
c. Procedimiento de validación	5
d. Parámetros evaluados en la validación de métodos analíticos	6
a) Linealidad	6
b) Exactitud	8
c) Precisión	9
d) Especificidad	10
2. Validación en la industria farmacéutica	11
3. Soluciones de hemodiálisis	12
III. Objetivos	14
1. Objetivo general	14
2. Objetivo particulares	14
IV. Metodología	15
1. Material	15
2. Procedimientos de calibración	16
a. Material volumétrico	16
b. Balanza analítica	20
c. Espectrofotómetro	21
d. Pipeta automática	23
e. Potenciómetro	26
3. Preparación de soluciones	29
a. Solución patrón o stock	29
b. Placebo cargado	29
c. Solución placebo	30
d. Soluciones reactivo, buffers e indicadores	30
4. Validación del método ácido-base para la determinación de acetato de sodio	31
5. Validación del método de determinación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	37
6. Validación del método volumétrico para la determinación de calcio	43

7. Validación del método volumétrico para la determinación de cloruros	49
8. Validación del método espectrofotométrico para la determinación de dextrosa	55
9. Validación del método volumétrico para la determinación de magnesio	61
10. Procedimientos de Cálculo	67
a. Preparación de soluciones stock	67
b. Linealidad del sistema	67
c. Exactitud y repetibilidad al 100 %	70
d. Precisión del sistema	70
e. Linealidad del método	71
f. Exactitud y repetibilidad al 100 %	73
g. Precisión	74
h. Anexo 2 (precisión)	75
I. Comparación de dos métodos analíticos	79
V. Resultados	86
1. Validación del método para la determinación de acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso	87
2. Validación del método para la determinación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	93
3. Validación del método volumétrico para la determinación de calcio	99
4. Validación del método para la determinación de cloruros	104
5. Validación del método espectrofotométrico para la determinación de dextrosa	110
6. Validación del método para la determinación de magnesio	115
7. Comparación de métodos	120
VI. Discusión	125
VII. Conclusiones	128
VIII. Apéndice	130
IX. Bibliografía	132

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Datos requeridos para la validación de valoraciones	6
Cuadro 2	Criterio de porcentaje recuperado y CV para exactitud y repetibilidad al 100 %	8
Cuadro 3	Criterios de CV para precisión	9
Cuadro 4	Patrones de tolerancia para la manufactura de material volumétrico clase A establecidos por la NBS	17
Cuadro 5	Factor de corrección para obtener el volumen de agua en un rango apropiado de temperatura	19
Cuadro 6	Acciones si la variación es mayor $\pm 003$ g	21
Cuadro 7	Verificación de espectrofotómetros	22
Cuadro 8	Valores de absorbancia para una solución de $K_2Cr_2O_7$	23
Cuadro 9	Exactitud y reproducibilidad de las micropipetas marca Oxford P-7000	24
Cuadro 10	Valores de pH de las soluciones reguladoras para calibración	27
Cuadro 11	Concentración de las soluciones stock	29
Cuadro 12	Formulación de la solución de hemodiálisis	29
Cuadro 13	Formato para tabular los resultados de la linealidad del sistema	68
Cuadro 14	Formato para tabular los resultados de la linealidad del método	71
Cuadro 15	Formato para tabular la precisión del método	74
Cuadro 16	Formato para tabular los resultados del análisis de varianza	78
Cuadro 17	Formatos para tabular la información requerida para la comparación de dos métodos analíticos	79
Cuadro 18	Información requerida para tabular los resultados de la comparación de la linealidad de dos métodos analíticos	83
Cuadro 19	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema de medición del acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso	87
Cuadro 20	Datos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso	88
Cuadro 21	Datos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso	88
Cuadro 22	Datos para determinar la linealidad del método de volumetría ácido-base en medio acuoso para cuantificar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	89
Cuadro 23	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	90

Cuadro 24	Por cientos recuperados entre días y entre analistas para evaluar la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	91
Cuadro 25	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	92
Cuadro 26	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de determinación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	93
Cuadro 27	Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición del método de acetato de sodio en medio no acuoso	94
Cuadro 28	Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	95
Cuadro 29	Observaciones para determinar la linealidad del método de análisis de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	95
Cuadro 30	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	97
Cuadro 31	Por cientos recuperados entre días y entre analistas para evaluar la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	98
Cuadro 32	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	98
Cuadro 33	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de calcio	99
Cuadro 34	Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema	100
Cuadro 35	Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de calcio	100
Cuadro 36	Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de calcio	101
Cuadro 37	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de calcio en una solución de hemodiálisis	102
Cuadro 38	Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar calcio en una solución de hemodiálisis	103
Cuadro 39	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar calcio en una solución de hemodiálisis	103
Cuadro 40	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema de medición de cloruros	104



Cuadro 41	Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de cloruros	105
Cuadro 42	Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de cloruros	106
Cuadro 43	Datos obtenidos para determinar la linealidad del método del análisis de cloruros	106
Cuadro 44	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de cloruros en una solución de hemodiálisis	108
Cuadro 45	Resultados de la reproducibilidad del método para determinar cloruros en una solución de hemodiálisis	109
Cuadro 46	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar cloruros en una solución de hemodiálisis	109
Cuadro 47	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de dextrosa	110
Cuadro 48	Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de dextrosa	111
Cuadro 49	Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de dextrosa	111
Cuadro 50	Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de dextrosa	112
Cuadro 51	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de dextrosa en una solución de hemodiálisis	113
Cuadro 52	Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar dextrosa en una solución de hemodiálisis	114
Cuadro 53	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar dextrosa en una solución de hemodiálisis	114
Cuadro 54	Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de magnesio	115
Cuadro 55	Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de magnesio	116
Cuadro 56	Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de magnesio	116
Cuadro 57	Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de magnesio	117
Cuadro 58	Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de magnesio en una solución de hemodiálisis	118
Cuadro 59	Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar magnesio en una solución de hemodiálisis	119
Cuadro 60	Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar magnesio en una solución de hemodiálisis	119

Cuadro 61	Datos requeridos para determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma repetibilidad	120
Cuadro 62	Datos requeridos para determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma exactitud	122
Cuadro 63	Datos requeridos para determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma linealidad	123
Cuadro 64	Resumen de los resultados obtenidos de la validación de métodos analíticos empleados en la valoración de los principios activos de una solución de hemodiálisis	124

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	31
Figura 2 Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso	32
Figura 3 Determinación de la linealidad del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución de hemodiálisis	33
Figura 4 Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución de hemodiálisis	34
Figura 5 Determinación de la especificidad del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución placebo de hemodiálisis	35
Figura 6 Determinación de la precisión del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución de hemodiálisis	36
Figura 7 Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de acetato de sodio por el método ácido-base	37
Figura 8 Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por el método ácido-base	38
Figura 9 Determinación de la linealidad del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis	39
Figura 10 Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis	40
Figura 11 Determinación de la especificidad del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución placebo de hemodiálisis	41
Figura 12 Determinación de la precisión del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis	42
Figura 13 Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de calcio	43
Figura 14 Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de calcio	44

Figura 15	Determinación de la linealidad del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis	45
Figura 16	Determinación de la especificidad del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis	46
Figura 17	Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis	47
Figura 18	Determinación de la precisión del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis	48
Figura 19	Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de cloruros	49
Figura 20	Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de cloruros	50
Figura 21	Determinación de la linealidad del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis	51
Figura 22	Determinación de la especificidad del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis	52
Figura 23	Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis	53
Figura 24	Determinación de la precisión del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis	54
Figura 25	Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de dextrosa	55
Figura 26	Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de dextrosa	56
Figura 27	Determinación de la linealidad del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis	57
Figura 28	Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis	58
Figura 29	Determinación de la especificidad del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis	59
Figura 30	Determinación de la precisión del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis	60
Figura 31	Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de magnesio	61
Figura 32	Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de magnesio	62
Figura 33	Determinación de la linealidad del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis	63
Figura 34	Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis	64
Figura 35	Determinación de la especificidad del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis	65

Figura 36	Determinación de la precisión del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis	66
Figura 37	Linealidad del sistema de medición de acetato de sodio en medio acuoso	87
Figura 38	Linealidad del método de volumetría ácido base en medio acuoso para la determinación de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis	89
Figura 39	Linealidad del sistema de medición de acetato de sodio en medio no acuoso	94
Figura 40	Linealidad del método para la determinación de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.	96
Figura 41	Linealidad del sistema de medición de calcio.	99
Figura 42	Linealidad del método para la determinación de calcio en una solución de Hemodiálisis	101
Figura 43	Linealidad del sistema de medición de cloruros	105
Figura 44	Linealidad del método para la determinación de cloruros en una solución de hemodiálisis.	107
Figura 45	Linealidad del sistema de medición de dextrosa.	110
Figura 46	Linealidad del método para la determinación de dextrosa en una solución de hemodiálisis.	112
Figura 47	Linealidad del sistema de medición de magnesio	115
Figura 48	Linealidad del método para la determinación de magnesio en una solución de hemodiálisis.	117

## RESUMEN

La validación de métodos analíticos es y ha sido un tema importante en la industria farmacéutica, ya que los procedimientos de análisis a los que se someten las muestras de materias primas, producto en proceso y producto terminado deben ser confiables. En el proceso general de validación de métodos para cuantificar principios activos en formas farmacéuticas como producto terminado se determinan los parámetros que describen la linealidad, exactitud, precisión y especificidad del sistema de medición y del método. Con el objeto de describir la metodología mediante la cual se determinan cada una de estos parámetros, en esta guía práctica se presentan los resultados de la validación de cada uno de los métodos de análisis de una solución de hemodiálisis. Los componentes que se cuantificaron en la solución de hemodiálisis fueron: Acetato de sodio (analizado por dos métodos), calcio, cloruros, glucosa y magnesio. La razón por la que se utilizó esta solución fue para presentar un caso de formulación a la que se le analizarán varios componentes, lo cual es frecuente en la práctica y para ejemplificar el trabajo de validación con diferentes técnicas de análisis, como: volumetrías en medio acuoso, potenciometría, volumetría en medio no acuoso y espectrofotometría visible. También se pensó en la disponibilidad de materiales para la calibración de los instrumentos y métodos; y, que tuviéramos analitos que se analizarán por métodos semejantes como fue el caso para la determinación de calcio y magnesio. Así, en los antecedentes se presentan los conceptos básicos del tema. La parte medular del trabajo es la metodología, en donde se describen las operaciones previas a la validación como la calibración de los instrumentos empleados y se dan los detalles del cómo se realizó: la linealidad, exactitud y precisión del sistema de medición; y la linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y especificidad de los métodos de análisis para: Acetato de sodio (analizado por dos métodos), calcio, cloruros, glucosa y magnesio. Todo esto acompañado de los cálculos para obtener los parámetros de cada una de las pruebas. También se incluyó la prueba de comparación de métodos de análisis con el ejemplo del acetato de sodio analizado por dos métodos. Los resultados mostraron que todos los métodos evaluados cumplieron con los valores límite que se recomiendan para los parámetros estadísticos determinados, y en la prueba de comparación se encontró que los métodos de análisis del acetato de sodio no fueron equivalentes en cuanto a su precisión y exactitud pero la linealidad de ambos métodos fue equivalente. Por lo anterior podemos concluir que se validaron cada uno de los métodos analíticos y que además se logró ejemplificar detalladamente la metodología empleada para la validación de métodos analíticos para cuantificar componentes de interés en productos terminados en la industria farmacéutica.

## I. INTRODUCCIÓN

Hay dos razones importantes para la validación, el primero y el más importante es que la validación analítica es una parte integral del sistema de control de calidad. La segunda, también importante, es que las regulaciones actuales requieren forzosamente la validación de los ensayos. Podríamos mencionar diversas razones adicionales para la validación, tales como homogeneizar el lenguaje científico entre los laboratorios, la capacidad para realizar transacciones comerciales en base a los ensayos del material, etc. Haciendo caso omiso de las justificaciones que se dan para validar, se puede llegar a estas conclusiones simplemente considerando las dificultades por las que se atraviesa en un ensayo analítico común en la industria farmacéutica. Sin confianza en las mediciones tomadas en la muestra, sería sumamente difícil confirmar que el producto que está siendo manufacturado es uniforme y que cumple con los estándares o especificaciones establecidas.

Es por esto que al realizar la validación de los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes de una solución de hemodiálisis por volumetría (valoración de calcio, acetato de sodio, magnesio y cloruros) y espectrofotometría (dextrosa) se pretende mostrar que con la aplicación de métodos básicos y con pocos recursos es posible obtener mediciones analíticas confiables. Pero principalmente se desea que este documento sea de utilidad a los estudiantes ya que es una guía práctica del ¿Cómo se debe realizar la validación de un método analítico? Debido a que actualmente las normas impuestas a la industria mencionan insistentemente que los métodos de análisis deben ser validados sin embargo ninguna de ellas da un ejemplo práctico que nos asesore acerca de los pasos a seguir, ni las condiciones en las que se debe de realizar y mucho menos de los problemas que se nos pueden presentar. Siendo más ambiciosos se espera que las aportaciones de esta guía sean aplicadas en un futuro por los alumnos del área de Químico Farmacéutico Biólogo para dar un servicio de asesorías, no solo a la industria farmacéutica sino a la industria en general.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Validación de métodos analíticos

Se ha demostrado que se presentan serias deficiencias en las operaciones del laboratorio cuando se da poca importancia o aún se ignora el trabajo de calidad. Un laboratorio analítico debe tener como uno de sus principales objetivos la producción de datos analíticos de alta calidad a través del uso de mediciones analíticas que sean exactas, confiables y adecuadas para el propósito a que se destinan. La preocupación por el uso de prácticas de laboratorio deficientes ha llevado a la creación de programas de acreditación de laboratorios, regulaciones, desarrollo y aplicación de programas de control y aseguramiento de la calidad con el propósito de tener un producto de calidad bajo un sistema de actividades planeado. Estas son algunas de las cosas que dieron pauta para el surgimiento de términos de calidad muy usados hoy en día como el de "**validación**".

Varias instituciones encargadas de evaluar los niveles de calidad de los productos farmacéuticos y que constituyen los estándares legales han dado su definición de "validación"

**El Comité de Redacción de Guías Generales de Validación** la definen como el "Método científico que proporciona la evidencia documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier instrumento de medición de variables".

La **FDA** (Por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) define el proceso de validación como "Un programa documentado que provee un alto grado de seguridad y que un proceso específico producirá consistentemente un producto, dentro de sus especificaciones y atributos de calidad".

La **FIP** (Federación Internacional Farmacéutica) define el proceso de validación como " La evaluación de procesos productivos por medios sistemáticos, para demostrar si este es confiable y reproducible" (CPFEUM, 2000).



**USP** (Farmacopea de los Estados Unidos) define la validación de un método analítico como el proceso en el cual es establecido por estudios en el laboratorio, que las características de comportamiento del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas destinadas. Estas características se expresan, desde el punto de vista, de parámetros analíticos, los cuales se deben de considerar en la validación y pueden diferir con respecto a la terminología y el uso.

Estas definiciones indican que la validación es un procedimiento ordenado, ya que los medios sistemáticos son primeramente procesos de observación, recolección de documentos y verificación de que los valores de las variables de control de proceso permanecen en los límites predescritos para un producto óptimo. Prácticamente esto es una certificación de que las buenas prácticas de manufactura se han aplicado a lo largo del proceso. La validación debe basarse en el conocimiento científico, en el cual sea capaz de dar la verdadera garantía de la calidad del producto ( USP 23, 1995).

#### **a. Objetivo de la validación**

El objetivo de una validación es determinar el grado de error de un método analítico. En un proceso de análisis tendremos siempre dos grandes tipos de error:

*Errores aleatorios:* son aquellos errores que no presentan ninguna tendencia clara, no pueden evitarse y, por lo tanto, no pueden controlarse idealmente deben ser pequeños, de manera que no ejerzan un peso sobre el resultado de la medición analítica.

*Error sistemático:* es un error que debe ser eliminado.

En la validación de una metodología analítica, finalmente se termina conociendo la magnitud del error aleatorio en la medición; a menor error aleatorio, más cercano estará el verdadero valor de la medición analítica a la medición analítica. (Hoffman, 1987).

## **b. Preparación para la validación**

La validación depende de varios factores, ya que cada compuesto presenta sus propios problemas y esta sujeto a dificultades particulares en las áreas de desarrollo , manufactura y control. Es por ello que en los programas de validación se debe tomar en cuenta lo siguiente:

\*Antes de iniciar el estudio de validación de un método analítico debe contarse con que el mismo se encuentre ya optimizado y documentado.

\*El (los) equipo(s) de medición deberá(n) ser calibrado(s) antes de la validación del método analítico, documentando la actividad y el procedimiento estándar de operación.

\*Se debe contar con sustancias de referencia.

Estas se dividen en:

Sustancias de referencia primarias: serán aquéllas que proporcionen los organismos autorizados.

Las sustancias de referencias secundarias: serán aquéllas que se adquieran de fuentes confiables, como es el caso de COSUFAR, USP, BP, etc., para efectuar los análisis rutinarios con los métodos que aparecen en los textos aprobados.

Las sustancias de referencia internas de trabajo: son aquéllas obtenidas de materias primas de alta calidad farmacopéica y cuyos parámetros se han comprobado mediante análisis efectuados en el propio laboratorio (CIPAM, 1989).

### c. Procedimiento de validación

\*Las pruebas a efectuar en el estudio de validación dependerán de la categoría a la que pertenezca el método analítico, de acuerdo a la USP XXIII. Estas categorías son las siguientes:

**Categoría I .-** Dentro de esta categoría se encuentran los métodos analíticos para la cuantificación de la mayoría de los componentes de sustancias a granel o principios activos en formas farmacéuticas como producto terminado.

**Categoría II.-** Son aquellos métodos analíticos para la determinación de impurezas en principios activos y/o productos de su degradación en formas farmacéuticas terminadas. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.

**Categoría III.-** Los métodos analíticos para la determinación del cumplimiento de las características de calidad como disolución, liberación de activos, etc., pertenecen a este grupo.

El Cuadro 1 muestra los elementos que se requieren para los ensayos de cada categoría.

Los procedimientos varían desde determinaciones analíticas altamente exigentes, hasta la evaluación subjetiva de atributos. Considerando esta variedad de ensayos, es lógico que los métodos de diferente prueba requieren diferentes programas de validación (USP, 1995).

Cuadro 1. Datos requeridos para la validación de valoraciones

Parámetro de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III
		Cuantitativo	Prueba Límite	
Exactitud	Sí	Sí	*	*
Precisión	Sí	Sí	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*
Límite de detección	No	No	Sí	*
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*
Linealidad	Sí	Sí	No	*
Rango	Sí	Sí	*	*
Fortaleza	Sí	Sí	Sí	Sí

\* Puede requerirse , según la naturaleza de la prueba específica.

#### d. Parámetros evaluados en la validación de métodos analíticos

##### a) Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad para arrojar resultados del análisis que son directamente proporcionales, a la concentración del analito dentro de un rango dado. La linealidad es generalmente reportada como la varianza de la pendiente de la regresión lineal.

Criterio:

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99, r^2 \geq 0.9$$

Linealidad del sistema: Se determina constituyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis propuesto cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para el control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %. Se considera el 100 % como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

Linealidad del método: Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema incluyendo siempre la correspondiente al 100 %.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método ( control de calidad., estudios de estabilidad, etc) y deberá llevarse a cabo por el mismo analista en la mismas condiciones de operación.

b) *Exactitud*

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados del análisis obtenidos con el método con el valor verdadero.

La exactitud se expresa con frecuencia como por ciento recuperado por medio del ensayo, de cantidades adicionadas, conocidas del analito.

Criterio:

El por ciento recuperado y el CV deberán estar de acuerdo con el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Criterio de por ciento recuperado y CV para exactitud y repetibilidad al 100 %.

<b>MÉTODO</b>	<b>PROMEDIO DE RECOBRO</b>	<b>CV</b>
Cromatográficos	98-102 %	≤ 2 %
Tritrimétricos	98-102 %	≤ 2 %
Químicos y espectrofotométricos	97-103 %	≤ 3 %
Microbiológicos	95-105 %	≤ 5 %

La exactitud se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

c) *Precisión*

Es la medida del grado de repetibilidad de un método analítico bajo condiciones normales de operación y es expresada normalmente como el porcentaje de la desviación estándar relativa (Coeficiente de variación) y se aplica de manera repetida a muestreos múltiples de una muestra homogénea.

Criterio:

El CV total debe cumplir con los siguientes criterios del cuadro 3.

**Cuadro 3.** Criterios del CV para precisión

<b>MÉTODO</b>	<b>CV</b>
Cromatográficos	$\leq 2 \%$
Químicos y espectrofotométricos	$\leq 3 \%$
Microbiológicos	$\leq 5 \%$

Precisión del sistema: Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Precisión del método: Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

*d) Especificidad*

Habilidad para medir exacta y específicamente el analito de interés en la presencia de componentes que pudieran estar presentes en la matriz. Es una medida de la degradación de interferencias provenientes de otros principios activos, excipientes, impurezas y productos de degradación (Castañeda, 1995)

Criterio:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes (Swartz y Krull, 1997).

Está se realiza con el método propuesto para cada analito de la manera siguiente:

- 1.- Analizar placebos del producto.
- 2.- Identificar la(s) respuesta (s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de las sustancias presentes (Castañeda, 1995).



## 2.- Validación en la industria farmacéutica

La industria farmacéutica es el prototipo de la validación y esto, se debe, en su mayor parte a las regulaciones y normas a que está sometida. Por esta razón, se exponen a continuación los aspectos regulatorios que conciernen a la industria farmacéutica ya que siendo éstos los más estrictos, pueden ser aplicados a cualquier tipo de industria.

En México, ahora que se han hecho oficiales las **Buenas Practicas de Manufactura (BPM)**, el capítulo correspondiente al Control del Laboratorio Analítico (9.12) no ha pasado por alto el inciso correspondiente a la validación de métodos : De hecho existen dos incisos que mencionan este punto y son los siguientes:

9.11.3 Los métodos analíticos deben ser validados de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 "control de laboratorio analítico"

9.12.3 Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM (CIPAM, 1989).

Sin embargo en esta regulación no se mencionan los requisitos mínimos que debe cumplir un método para considerarse válido.

Para esto, se cuenta con la Guía para la Validación de Métodos Analíticos, hecha con la colaboración de la Dirección General de Control de insumos para la salud, de la SSA , el CNQFB, A.C y CANIFARMA

Otras de las normas aplicables a la industria farmacéutica aunque no las únicas son:

**BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio)** Es un sistema de administración que describe la organización y las condiciones bajo las cuales se realizan estudios no clínicos de laboratorio fundamentando la integridad y validez de la información de un estudio.

**Serie ISO 9000** ( Por sus siglas en inglés **International Standar Organization**) Es una serie de 5 sistemas de calidad de adopción voluntaria que describen el proceso, estructura organizacional, procedimientos o recursos de fabricantes y proveedores que se emplean para generar productos de calidad consistente que satisfagan las especificaciones definidas en todo tipo de industrias y prestadores de servicio para asegurar la calidad del producto.

**FDA** (Por sus siglas en inglés **Food and Drug Administration**) organismo que se encarga de verificar el cumplimiento de las normas de **BPM y BPL**

**FEUM** (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos)

**NOM-059-SSA1-1993** Buenas prácticas de fabricación de la industria químico farmacéutica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de noviembre de 1995.

**NOM-164-SSA-1998** Que establece las buenas prácticas de fabricación para fármacos.

### **3.- Soluciones de Hemodiálisis**

La calidad de un medicamento puede definirse como "la capacidad de un producto o de un servicio para satisfacer las necesidades del usuario o cliente ". En el caso particular de los medicamentos el "cliente" es, por lo general, una persona que requiere solucionar, prevenir o atenuar un problema de salud y el logro del objetivo implica una responsabilidad enorme sobre la Industria Farmacéutica.

Ahora bien , la calidad de un medicamento está basada en el cumplimiento de ciertas especificaciones generadas en base a datos científicos y técnicos que se han obtenido del estudio de los elementos de calidad que pudieran afectar la eficacia, la seguridad y la estabilidad del medicamento durante un periodo de tiempo, generalmente prolongado, y que han demostrado que el medicamento cumple con aquello para lo que fue diseñado.

Un ejemplo dentro de la gran variedad de medicamentos que existen actualmente en el mercado lo constituyen las soluciones de hemodiálisis estas son usadas ampliamente cuando los riñones presentan una patología o lesión que les impide excretar los desechos nitrogenados y regular la concentración de agua, electrólitos y el pH del plasma, por lo que la sangre se debe filtrar mediante un mecanismo artificial. este aparato filtra la sangre, proceso que se denomina "hemodiálisis". El término diálisis significa la separación de las grandes partículas no difundibles de las partículas pequeñas difundibles a través de una membrana selectivamente permeable. Uno de los mecanismos mejor conocidos para lograr realizar la diálisis es el riñón artificial. Se conecta una sonda a la arteria radial del paciente y se bombea la sangre desde la arteria a través de las sondas hacia uno de los lados de una membrana con permeabilidad selectiva para diálisis que esta formada de acetato de celulosa. El otro lado de la membrana se lava en forma continúa con una solución artificial denominada dializador (solución de hemodiálisis).

Todas las sustancias (incluyendo desechos) de la sangre excepto las proteínas y las células sanguíneas pueden difundir y cruzar la membrana permeable.

El nivel de electrólitos del plasma se controla manteniendo los electrólitos del dializado en la misma concentración con respecto al plasma normal. Cualquier exceso de electrolitos en el plasma se mueve en favor de un gradiente de concentración hacia el dializado. Si el nivel de electrolitos en el plasma es normal, se encuentra en equilibrio con el dializado y no hay ganancia o pérdida neta de electrólitos. Como el dializado no contiene desechos, las sustancias como la urea se mueven en favor del gradiente de concentración hacia el dializado. De esta manera se eliminan los desechos y se mantiene el equilibrio normal de electrólitos (Tortora y Anagnostakos, 1993).

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo general

- Realizar la validación de los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes de una solución de hemodiálisis.

#### 2. Objetivos particulares

- Realizar la validación del método volumétrico para la determinación de calcio.
- Realizar la validación del método volumétrico para la determinación de magnesio.
- Realizar la validación del método potenciométrico para la determinación de acetato de sodio.
- Realizar la validación del método volumétrico para la determinación de cloruros.
- Realizar la validación del método espectrofotométrico para la determinación de Dextrosa.
- Realizar la comparación del método potenciométrico para la cuantificación del acetato de sodio, contra el método de titulación en medio no acuoso.

## IV. METODOLOGÍA

### 1. Material

#### a. Material de laboratorio

- Bureta
- Pipetas volumétricas
- Pipetas pasteur
- Matraces erlenmeyer
- Soporte universal
- Pinzas para bureta
- Vasos de precipitado
- Tubos de ensaye

#### b. Equipos

- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro
- Pipeta automática
- Estufa

#### c. Reactivos

- Reactivos enzimáticos para la determinación de glucosa
- Solución reguladora de hidróxido de amonio
- Solución al 0.1 % m / v de negro de eriocromo
- EDTA 0.005 M
- Hidróxido de potasio 8 N
- Rojo de calcio
- Sulfato de sodio anhidro
- Ácido clorhídrico 0.2 N

- Agua destilada
- Ácido acético
- Metanol
- Solución indicadora de eosina
- Nitrato de plata 0.1 N
- Ácido acético concentrado
- Cristal violeta al 0.1 % en ácido acético
- Ácido perclórico 0.1 N en ácido acético

## **2. Procedimientos de calibración**

Debido a la importancia que tiene la calibración dentro de la validación de métodos analíticos para la obtención de mediciones confiables, se presentan a continuación algunos de los procedimientos utilizados así como sus respectivos cálculos.

Ya que el equipo necesario para la realización de algunos de estos es muy costoso se realizaron las verificaciones más sencillas, pero se decidió aportar esta información para que a quién sirva esta sencilla guía tenga la oportunidad de mejorar los ensayos realizados y la calibración que lleve a cabo sea la que este de acuerdo a sus posibilidades.

### **a. Material volumétrico**

La calibración de los instrumentos y la calibración y/o verificación de los equipos se efectuará con la frecuencia que establezcan los requerimientos oficiales, las recomendaciones de los fabricantes o bien la experiencia de los directores del laboratorio.

Al efecto se elaborará un programa de calibración para cada instrumento y de calibración y/o verificación para cada equipo cuyo cumplimiento será responsabilidad del responsable del laboratorio o de la persona que éste designe.

Esto requiere de un registro en el que figuren:

- a) Nombre del instrumento o equipo
- b) Número de serie
- c) Fecha de calibración y/o verificación
- d) Persona o compañía que efectuó la calibración
- e) Observaciones

*Mediciones confiables de volúmenes de soluciones*

La **National Bureau of Standards (NBS)** ha establecido patrones de tolerancia para la manufactura de material volumétrico clase A, usado para la investigación y el trabajo analítico de gran exactitud. Para los cuatro tipos principales de material volumétrico de vidrio estas tolerancias se muestran en el cuadro 4

**Cuadro 4 :** Patrones de tolerancia para la manufactura de material volumétrico clase A establecidos por la NBS

<b>Capacidad en mL</b>	<b>Error Máximo permitido en mL</b>			
	<b>Buretas</b>	<b>Pipetas graduadas</b>	<b>Pipetas de transferencia</b>	<b>Matraces aforados</b>
1		0.02	0.006	
5		0.04	0.01	
10	0.02	0.06	0.02	0.02
25	0.03		0.03	0.03
50	0.05		0.05	0.05
100	0.10		0.08	0.08
200			0.10	0.10
250				0.12
500				0.20
1000				0.30

En el trabajo analítico rutinario, e incluso para la mayor parte de investigaciones son aceptables estas tolerancias. Sin embargo si este material ha de ser usado en mediciones de más alta calidad, es necesario establecer por cuenta propia como opera cada pieza en manos de cada persona. Un analista bien entrenado puede emplear un pipeta de 10 mL con una imprecisión de sólo unos 0.002 mL, lo que es 10 veces superior a la tolerancia.

El fabricante de material de vidrio coloca marcas de calibración (líneas grabadas a menudo coloreadas) sobre él. Si queremos usar material con la máxima precisión posible, no intentemos modificar la posición de esas marcas para hacerlas corresponder más cercanamente con el valor nominal del volumen, sino que estandarizamos el material, empleando las marcas de calibración originales.

#### *Procedimiento y Cálculos*

Para estandarizar un material volumétrico sólo hace falta pesar el agua que contiene o que escurre la pieza. Los matraces aforados se secan primero (no en estufa, porque esto podría modificar ligera o permanentemente sus volúmenes) y se pesan, y luego se llenan con agua destilada hasta la marca de calibración y se vuelven a pesar. El contenido de pipetas y buretas se escurre a un matraz previamente tarado el cual se tapa (para evitar la evaporación), y se vuelve a pesar. El primer dato es el peso aparente del agua y al dividirlo entre la densidad precisa del agua (a la temperatura en que fue usada), se determina su volumen. Debido a la baja densidad del agua es necesario hacer una corrección por empuje (este factor  $B$  es de 1.00103 para el agua y, toma en cuenta, la densidad del agua, la densidad del aire desplazado y la densidad de las pesas a la presión de 745 mmHg y  $T$  de 20°C como promedio), según el Cuadro 5 la densidad corregida por el factor de empuje ( $B/d$ ) nos da un factor de corrección para obtener el volumen del agua en un rango apropiado de temperatura.



$$V_{\text{agua}} = w_{\text{agua}} / d_{\text{agua}} = (w_{\text{agua}}) (B/d)$$

**Cuadro 5** : Factor de corrección para obtener el volumen del agua en un rango apropiado de temperatura

<b>T°C</b>	<b>d<sub>agua</sub></b>	<b>(B/d)</b>
18	0.998595	1.00244
19	0.998405	1.00263
20	0.998203	1.00283
21	0.997992	1.00304
22	0.997770	1.00327
23	0.99756	1.00350
24	0.997044	1.00374
25	0.996783	1.00400
26	0.996512	1.00426
27	0.996232	1.00453
28		1.00482

*Efecto de la temperatura sobre los volúmenes de soluciones*

En trabajos de gran exactitud, es de mayor importancia la expansión de las soluciones acuosas con la temperatura. Como buena aproximación podemos asumir que las soluciones diluidas cambian de volumen en la misma manera que el agua por lo que usamos las densidades del agua como guía. Supongamos que una solución de ácido nítrico contiene exactamente 1000 gramos de HNO<sub>3</sub> en un volumen de 50 mL, medido a 22°C. Al día siguiente la temperatura es de 26 °C y se emplea la misma pipeta para obtener una cantidad de la solución. Debido a la expansión de volumen, la solución de ácido nítrico contiene ahora ligeramente menos de 1000 g de ácido nítrico en el volumen de 50 mL.

Podemos hacer uso del cociente de densidades del agua a ambas temperaturas para hallar la nueva concentración.

$$C_{26} = (C_{22}) (d_{26} / d_{22}) = (1000) (0.996783 / 0.997770) = 0.9990 \text{ gramos /50 mL}$$

Respecto a la expansión térmica del material de vidrio tenemos, que si una pieza de vidrio ha sido estandarizada a cualquier temperatura del laboratorio típica, es posible usarla a otras temperaturas, sin necesidad de reestandarización. Esto se debe a que el coeficiente de expansión cúbica para vidrio de borosilicato es de sólo 25 ppm por grado, de modo que si se afora una pipeta a 23° C y luego se le usa a 27°C, el aumento relativo de volumen, debido a la expansión sería solamente de  $(4) (0.000025) = 0.0001$ , o una parte en 10 000. Una pipeta de 50 mL calibrada a 23°C, escurrirá 50.005 mL a 27°C y para la mayoría de las aplicaciones este efecto sería despreciable ( Ayres ,2001)

## **b. Balanza analítica**

### *Instrumentos necesarios*

- Masa cilíndrica de 100 g calibrada
- Paño limpio
- Pinzas

### *Procedimiento*

- Encender la balanza y esperar por lo menos 60 minutos antes de continuar
- Retirar el platillo y su soporte, limpiar con el paño
- Limpiar alrededor del área del platillo
- Colocar el soporte y el platillo
- Cerrar la tapa del corta aires

- Pulsar prolongadamente la tecla de mando hasta que aparezca “-CAL-“ en la pantalla
- Soltar la tecla de mando . En la pantalla deberá permanecer “-CAL-“
- Esperar hasta que en la pantalla parpadee “100.000 g”
- Con la pinzas colocar con cuidado la masa cilíndrica, en el centro del platillo
- En la pantalla aparecerá “-----“
- Esperar hasta que aparezca parpadeando “0.00g “
- Retirar con cuidado la masa cilíndrica
- Esperar a que la balanza indique el modo de pesado

La balanza esta lista para ser usada si la variación es menor a  $\pm 0.03$  g .Si el rango es mayor ver las acciones sugeridas en el cuadro 6

**Cuadro 6 :** Acciones si la variación es mayor  $\pm 0.03$  g

Variación	Acción
Más de $\pm 0.03$ g pero menor de $\pm 0.06$ g	Recalibrar
Más de $\pm 0.06$ g pero menor de $\pm 0.09$ g	Contactar al proveedor
Más de $\pm 0.09$ g	Servicio correctivo externo es requerido

### c. Espectrofotómetro

Comprobar regularmente la exactitud de ajuste del instrumento. Cuando se utiliza una fuente continua de energía radiante, deben comprobarse a la vez la escala de longitud de onda y la escala fotométrica. Cierta número de fuentes de energía radiante poseen rayas espectrales de intensidad conveniente repartidas adecuadamente en la región del espectro elegido.

Los valores exactos para la posición de las rayas características en la lámpara de cuarzo de arco de mercurio son 253.7 nm, 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, y 435.83 nm. La escala de longitudes de onda también puede comprobarse mediante filtros de vidrio adecuados que tienen bandas de absorción útiles en la región visible y en la ultravioleta algunos de los cuales se presentan en el cuadro 7

**Cuadro 7 : Verificación de espectrofotómetros**

<b>Identificación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Intervalo de <math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Uso</b>
SMR 2034	Óxido de Holmio	240-650	Longitud de onda
DMR-41	Óxido de Holmio	278-650	Longitud de onda
SRM 2009 a	Filtro de vidrio de didimio	400-760	Longitud de onda
SMR 1930	Filtros de vidrio	240-635	Transmitancia
SMR 930 d	Filtros de vidrio	440-635	Transmitancia
SMR 2031	Metal en cuarzo	250-635	Transmitancia
SMR 931 E	Solución Ni, Co	302-678	Absorbancia
SMR 935 a	$K_2Cr_2O_7$	235-350	Absorbancia
SMR 2032	Yoduro de K	240-280	Luz Extraviada

Para la calibración de la escala fotométrica suele aceptarse una tolerancia de  $\pm 1$  por ciento de absortividad. Para comprobar esta escala puede utilizarse solución de referencia de dicromato potásico.

En el cuadro 8 se dan los valores exactos de absorbancia y extinción específica para una solución de dicromato de potasio que contenga exactamente 60.06 mg en 1000 mL de una solución 0.005 M de ácido sulfúrico, leídas en una celda de 1 cm.

Cuadro 8 : Valores de absorbancia para una solución de  $K_2Cr_2O_7$

Longitud de onda	235 nm (Mínimo)	257nm (Máximo)	313 mn (Mínimo)	350 mn (Máximo)
A	0.748	0.865	0.292	0.640
Tolerancia Aceptada	0.740-0.756	0.856-0.874	0.289-0.295	0.634-0.646
$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	124.54	144.02	48.62	106.56

Existen también filtros de vidrio inorgánico de transmitancia conocida para verificar la escala fotométrica (CPFEUM, 2000)

#### d. Pipeta automática

##### *Especificaciones de micropipetas*

La exactitud y la reproducibilidad de las micropipetas marca OXFORD P-7000 se muestra en el Cuadro 9

Estos instrumentos fueron calibrados para liberar agua desionizada a una temperatura entre  $22 \pm 3^\circ \text{C}$  cuando se usan las pipetas en el modo de operación reversa.

**Cuadro 9 : Exactitud y reproducibilidad de las micropipetas marca Oxford P-7000**

<b>Volumen</b>	<b>Exactitud</b>	<b>Reproducibilidad (DE)</b>
1 $\mu\text{L}$	$\pm 0.12 \mu\text{L}$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
2 $\mu\text{L}$	$\pm 0.12 \mu\text{L}$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
3 $\mu\text{L}$	$\pm 0.12 \mu\text{L}$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
4 $\mu\text{L}$	$\pm 0.12 \mu\text{L}$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
5 $\mu\text{L}$	$\pm 0.12 \mu\text{L}$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
10 $\mu\text{L}$	$\pm 2.0 \%$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
20 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.06 \mu\text{L}$
25 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.10 \mu\text{L}$
30 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.12 \mu\text{L}$
50 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.15 \mu\text{L}$
100 $\mu\text{L}$	$\pm 0.7 \%$	$\leq 0.25 \mu\text{L}$
200 $\mu\text{L}$	$\pm 0.7 \%$	$\leq 0.50 \mu\text{L}$
250 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.75 \mu\text{L}$
300 $\mu\text{L}$	$\pm 1.0 \%$	$\leq 0.90 \mu\text{L}$
400 $\mu\text{L}$	$\pm 0.6 \%$	$\leq 1.20 \mu\text{L}$
500 $\mu\text{L}$	$\pm 0.6 \%$	$\leq 1.00 \mu\text{L}$
1000 $\mu\text{L}$	$\pm 0.6 \%$	$\leq 2.50 \mu\text{L}$

### *Procedimiento*

- a) Dejar todo el material que se va a utilizar al lado de la balanza durante 15 minutos para que se equilibre la temperatura.
- b) Colocar el termómetro en el agua.
- c) Determinar la precisión de la balanza analítica pesando el mismo objeto 3 veces.
- d) Tomar la punta de la micropipeta y colocarla. Sujetarla bien.

- e) Colocar el papel aluminio sobre la balanza analítica, y tarar la balanza.
- f) Medir la temperatura del agua
- g) Medir el volumen de agua destilada con la micropipeta que se desea verificar con el método de operación directo
- h) Descargar el contenido sobre el papel aluminio.
- i) Medir en la balanza analítica la cantidad medida por la micropipeta.
- j) Otra persona deberá anotar el peso .
- k) Realizar este paso 19 veces lo más rápido posible.

NOTA: La temperatura del agua siempre se deberá verificar. Se debe de realizar las mediciones lo más rápido posible para evitar evaporaciones y cambios en la temperatura.

### Cálculos

Calcular el volumen en  $\mu\text{l}$  con la fórmula siguiente:

$$V_{\text{agua}} = w_{\text{agua}} / d_{\text{agua}} = (w_{\text{agua}}) (B/d) / 1000$$

Densidad = masa/volumen;  $d = m/v$ ;  $v = m/d$

En donde:

$d_{\text{agua}}$  = densidad del agua a la temperatura a la que se midió.

$(B/d)$  = densidad del agua a la temperatura a la que se midió, corregida por el factor de empuje  $B$ . Consultar este dato en el cuadro 5.

$w_{\text{agua}}$  = gramos de cada medición (sacarlo por la diferencia entre pesos consecutivos)

$V_{\text{agua}}$  =  $\mu\text{l}$  obtenidos

$\mu\text{l}$  obtenidos = [g pesados  $B$ /densidad del agua (g/mL)] [1000  $\mu\text{l}$  /1mL]

$\mu\text{l}$  = (g pesados)  $(B/d)/(1000)$

Tabular el número de pesada y el peso obtenido en gramos y calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El coeficiente de variación no debe de ser mayor de 1%.

La DE no deberá ser mayor que la de las especificaciones para el volumen medido

Finalmente, calcular el porcentaje de error mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Error} = \frac{\text{Valor observado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100$$

#### e. Potenciómetro

Debido a las variaciones en la naturaleza y en la operación de potenciómetros apropiados, no es práctico indicar direcciones aplicables universalmente para determinaciones potenciométricas de pH. Los principios generales deben ser efectuados siguiendo las instrucciones previstas para cada instrumento por su fabricante. Examinar los electrodos antes de usarlos observando si presentan el puente salino, previo a su uso, si es necesario, abastecer de solución salina el puente y observar las precauciones indicadas por el fabricante para el instrumento y el electrodo.

Encender el aparato y dejarlo calentar lo suficiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seleccionar dos soluciones reguladoras, patrón de referencia certificadas para calibración, cuya diferencia en pH no exceda 4 unidades. Llenar el recipiente con una de las soluciones reguladoras para calibración, teniendo en cuenta la temperatura a la cual el material de prueba debe ser medido. Colocar el medidos de temperatura a la de la solución y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores de pH observados sean idénticos a los tabulados. Enjuagar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución reguladora, seleccionada para la calibración. Llenar los recipientes a la misma temperatura a la que el material debe ser medido. El pH de la segunda solución reguladora debe estar dentro de  $\pm 0.07$  unidades de pH del valor tabulado.



Si se observa mayor desviación revisar los electrodos y si están afectados , reemplazarlos. Ajustar el control de calibración para hacer que el valor de pH observado sea igual al valor tabulado ( véase cuadro 10 ).

Repetir la calibración hasta que las dos soluciones reguladoras den valores observados de pH dentro de 0.05 unidades de los valores tabulados, sin más ajuste de los controles. Evitar frotar los electrodos durante las mediciones, ya que se pueden cargar electrostáticamente y provocar alteraciones en la lectura.

**Cuadro 10:** Valores de pH de las soluciones reguladoras para calibración

<b>Tempetarura °C</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
10	1.67	4.0	6.92	9.33	13.00
15	1.67	4.0	6.90	9.28	12.81
20	1.68	4.0	6.88	9.23	12.63
25	1.68	4.01	6.86	9.18	12.45
30	1.68	4.02	6.85	9.14	12.29
35	1.69	4.02	6.84	9.10	12.13
40	1.69	4.04	6.84	9.07	11.98
45	1.70	4.05	6.83	9.04	11.84
50	1.71	4.06	6.83	9.01	11.71
55	1.72	4.08	6.83	8.99	11.57
60	1.72	4.09	6.84	8.96	11.45

#### *Ajuste del aparato*

Aplicar el mismo procedimiento descrito para la calibración, pero utilizando patrones secundarios. Esto se realizará inmediatamente antes de cada determinación.

### *Procedimiento*

Efectuar las determinaciones a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  a menos que se indique otra cosa en la monografía correspondiente. Ajustar el aparato de acuerdo al punto anterior, a continuación, lavar los electrodos y recipientes varias veces con agua destilada, dejando que los electrodos escurran el agua, y secar el recipiente con papel absorbente. Ajustar la temperatura con el control, a la que tienen la solución de prueba. Enjuagar los electrodos y el recipiente con la solución de prueba. Posteriormente llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH. Repetir el procedimiento con una segunda muestra. La diferencia no deberá ser mayor a 0.05.

### *Resultados*

Los valores de pH determinados, mediante este procedimiento, se deben reportar hasta 0.01 unidades. Las determinaciones (por duplicado) que presenten variaciones dentro de 0.02 unidades de pH, son aceptables para promedio, con un nivel de 95 % de confiabilidad. (CPFEUM, 2000).

### 3.- Preparación de soluciones

#### a. Soluciones patrones o stock

Cuadro 11 : Concentraciones de las soluciones stock

Solución patrón	Concentración
Acetato de sodio trihidratado	150 mg /mL
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	6.708 mg/ mL
CaCl <sub>2</sub>	4.439 mg / mL
NaCl*	100 mg/ mL
Dextrosa anhidra	10 mg/ mL
Acetato de sodio trihidratado* (1)	50 mg/ mL

\* Previamente secado durante 1 hora a 110° C

(1) Volumetría en medio no acuoso.

#### Preparación

Las soluciones patrón se prepararán a las concentraciones descritas en el cuadro 11 y el volumen dependerá de los mililitros usados para cada caso en particular. Estas concentraciones se establecieron para obtener alícuotas que correspondieran a un rango de concentración que incluyera el 100 %.

#### b. Placebo cargado

Cuadro 12: Formulación de la solución de hemodiálisis

Fórmula cualitativa	g/L	% de Pureza
Cloruro de magnesio hexahidratado	5.340	95.8 %
Cloruro de calcio dehidratado	6.430	98.5
Cloruro de Sodio	198.40	99.5
Acetato de sodio trihidratado	176.22	99.5
Dextrosa anhidra	87.56	99.5
Agua C.S.P	1000.0	

### *Preparación*

- 1.-Pesar exactamente las cantidades de los activos mencionados en el cuadro 12
- 2.- Disolver el cloruro de sodio en la mínima cantidad de agua a 70 °C
- 3.- Agregar el Acetato de sodio trihidratado y agitar hasta disolverlo
- 4.- Repetir el paso anterior con el cloruro de calcio y el cloruro de magnesio
- 5.- Dejar enfriar la solución , agregar la dextrosa anhidra y agitar hasta disolverla
- 6.- Aforar con agua.

### **c. Solución Placebo**

#### *Preparación:*

Para las soluciones placebo se seguirá la misma metodología que para la preparación del placebo cargado solo que en este caso llevarán todos los activos excepto el que se está analizando.

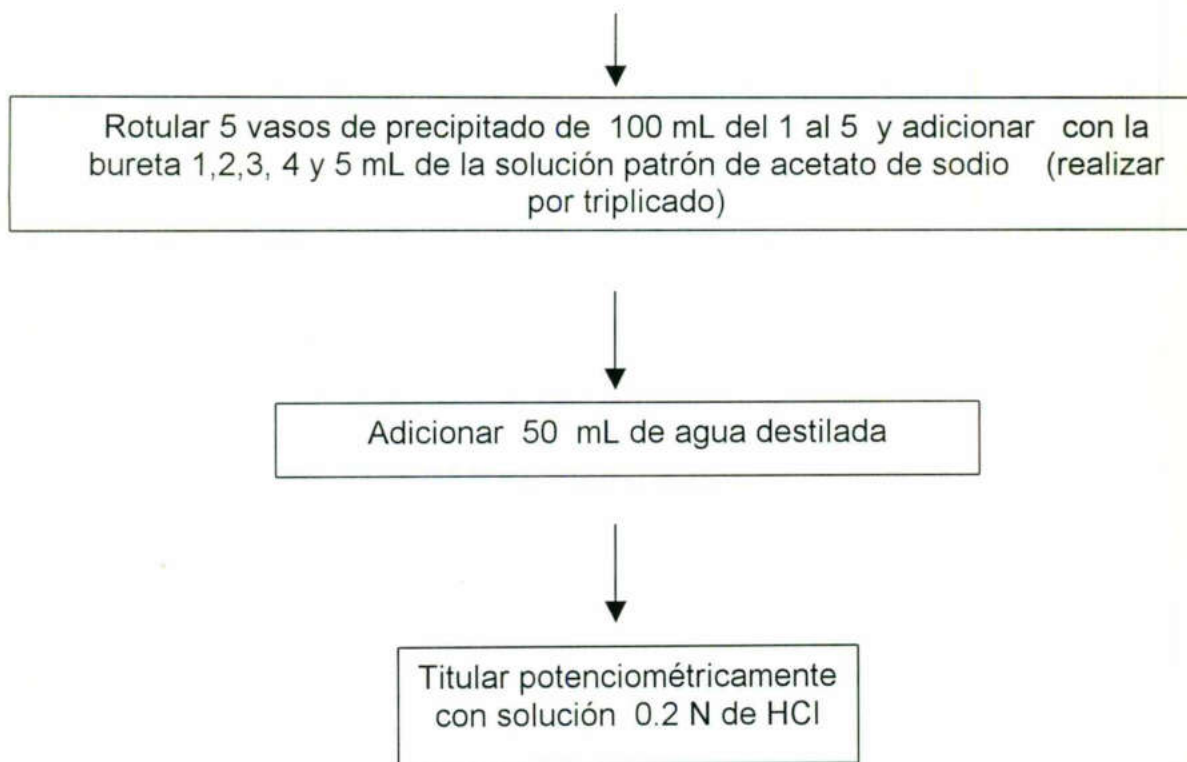
### **d. Soluciones reactivo, buffers e indicadores**

#### *Preparación:*

Conforme a lo descrito en la Farmacopea de lo Estados Unidos Mexicanos de la edición descrita en la bibliografía.

#### 4. Validación del método ácido-base para la determinación de acetato de sodio

##### LINEARIDAD DEL SISTEMA



**Figura 1** : Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de acetato de sodio por el método ácido-base.

## PRECISIÓN DEL SISTEMA



Rotular 3 vasos de precipitado de 100 mL del 1 al 3 y adicionar a cada uno con la bureta 3 mL de la solución patrón de acetato de sodio (realizar por duplicado)



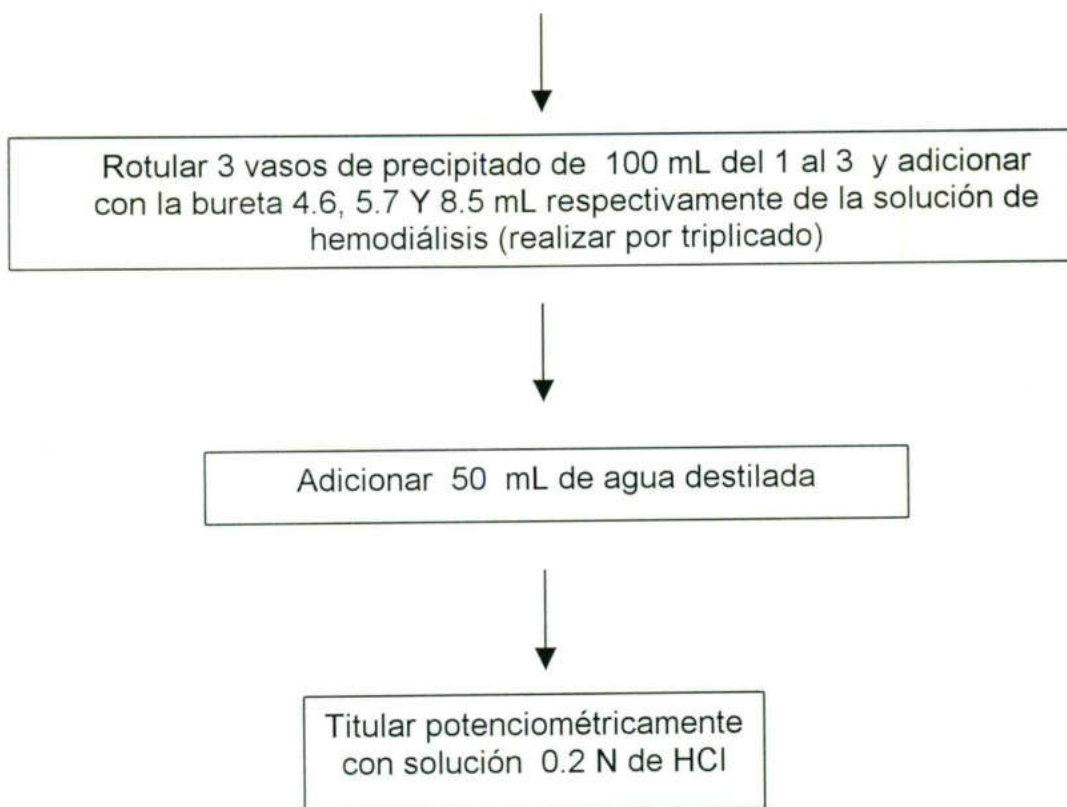
Adicionar 50 mL de agua destilada



Titular potenciométricamente con solución 0.2 N de HCl

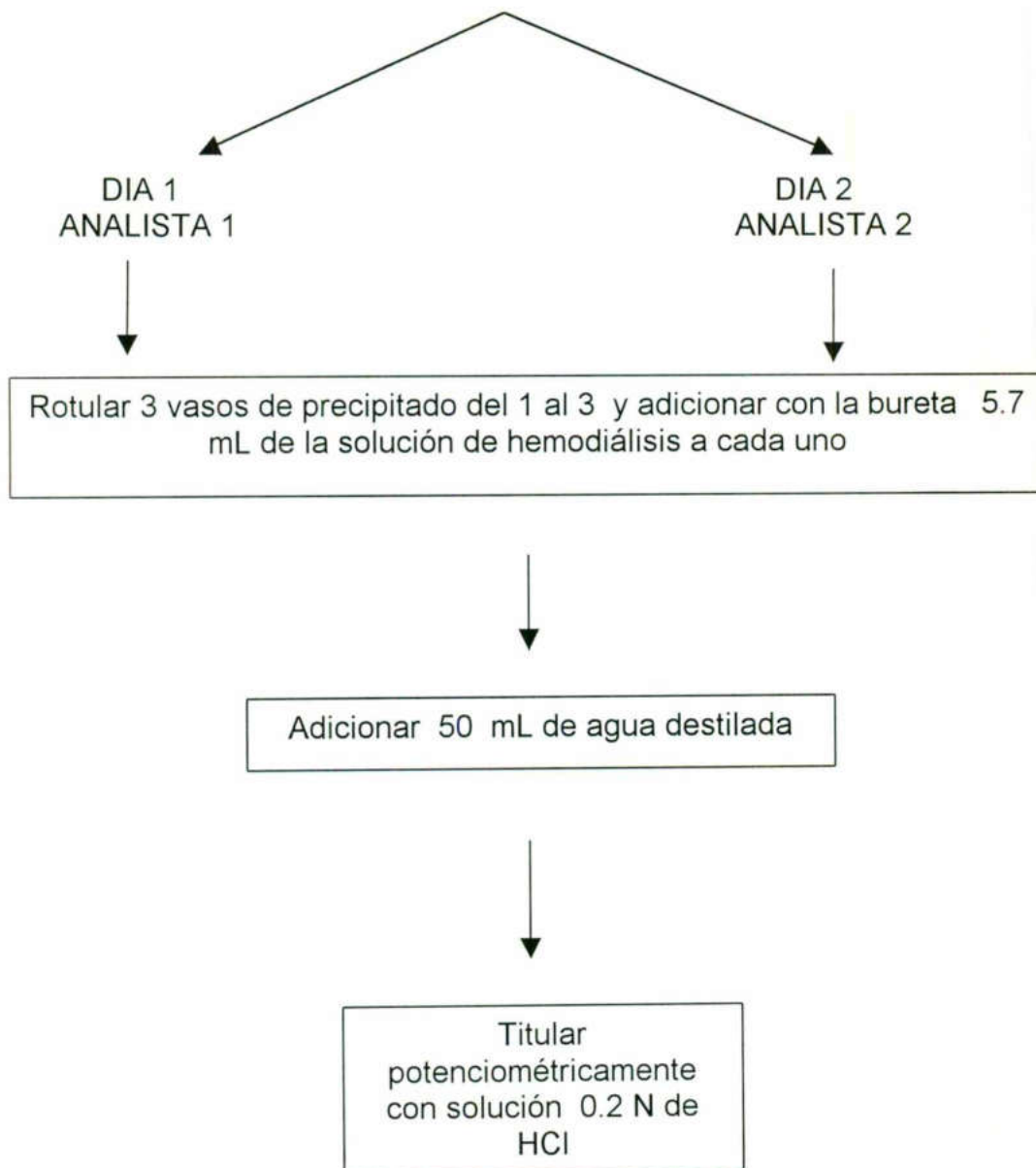
**Figura 2** : Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por el método ácido-base.

## LINEARIDAD DEL MÉTODO



**Figura 3 :** Determinación de la linealidad del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis.

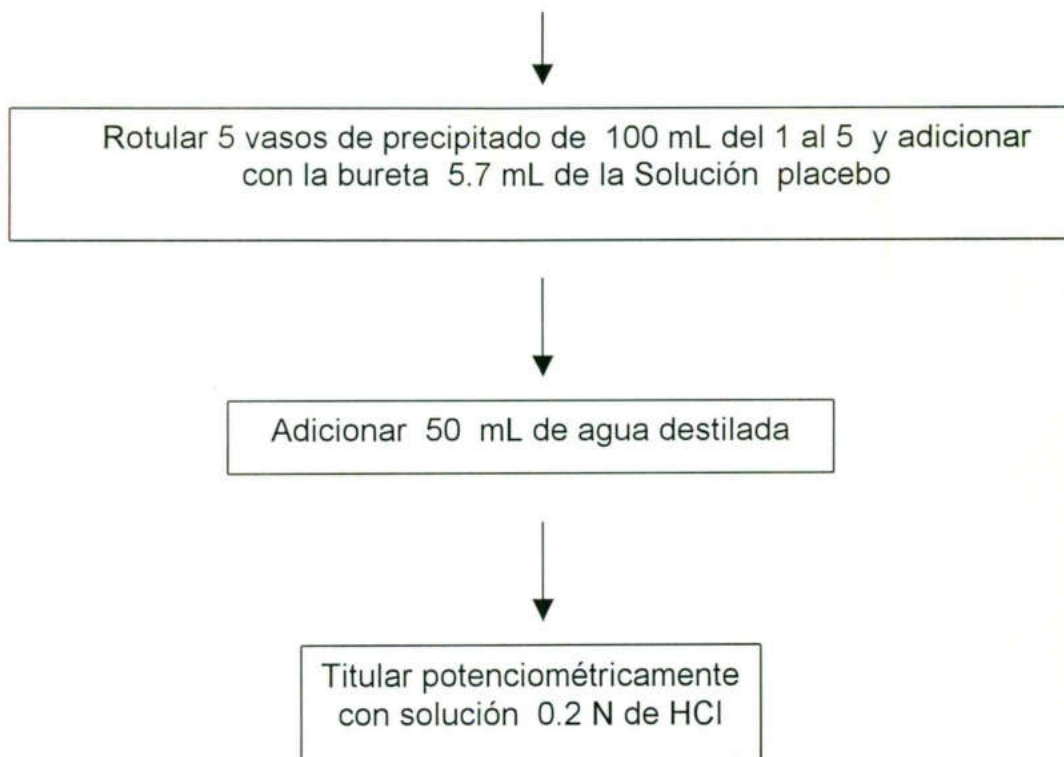
## EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %



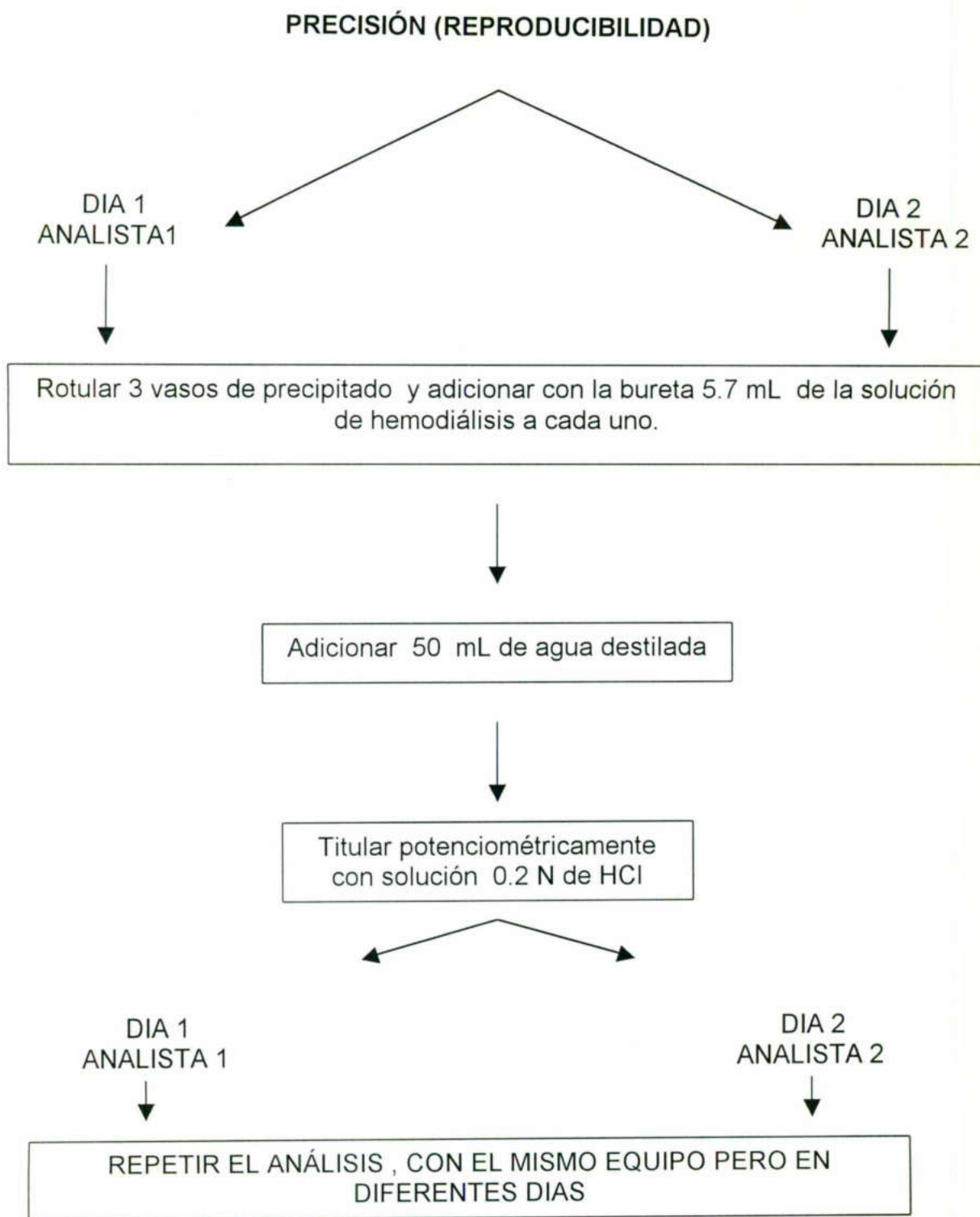
**Figura 4 :** Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis.



## ESPECIFICIDAD DEL METODO



**Figura 5 :** Determinación de la especificidad del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución placebo de hemodiálisis.



**Figura 6 :** Determinación de la precisión del método de cuantificación de acetato de sodio por el método ácido-base en la solución de hemodiálisis.

5. Validación del método de determinación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso

LINEARIDAD DEL SISTEMA

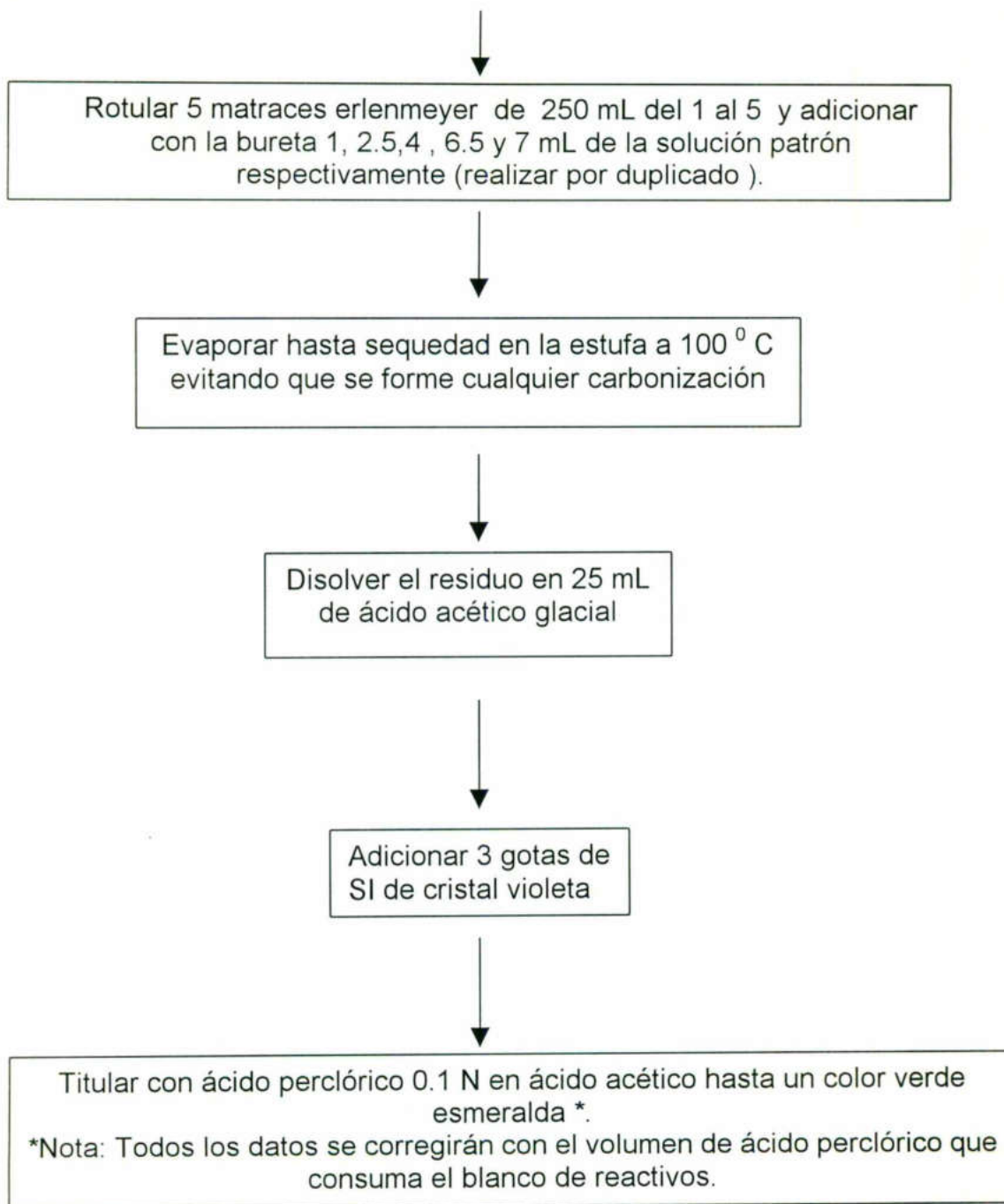
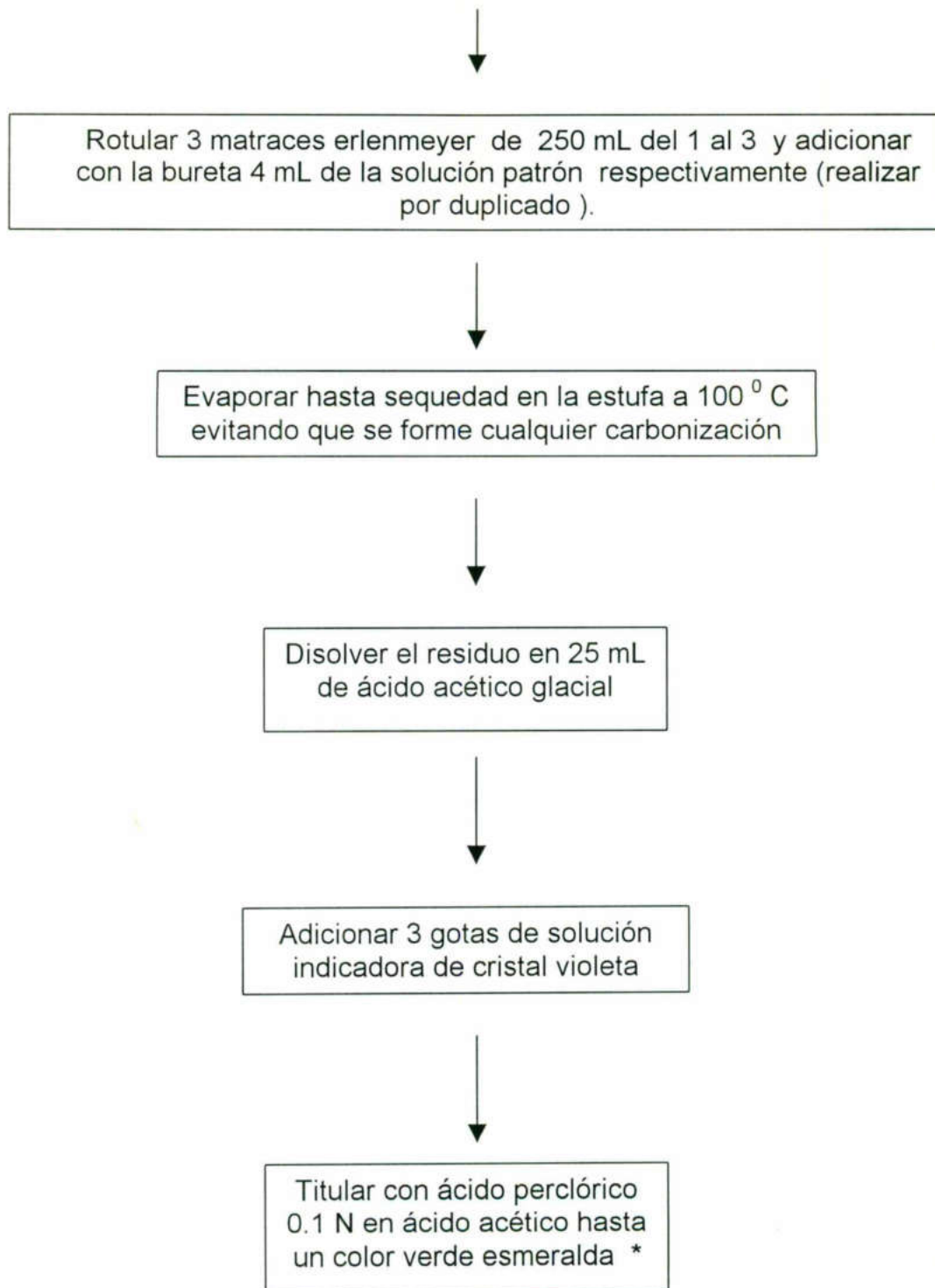


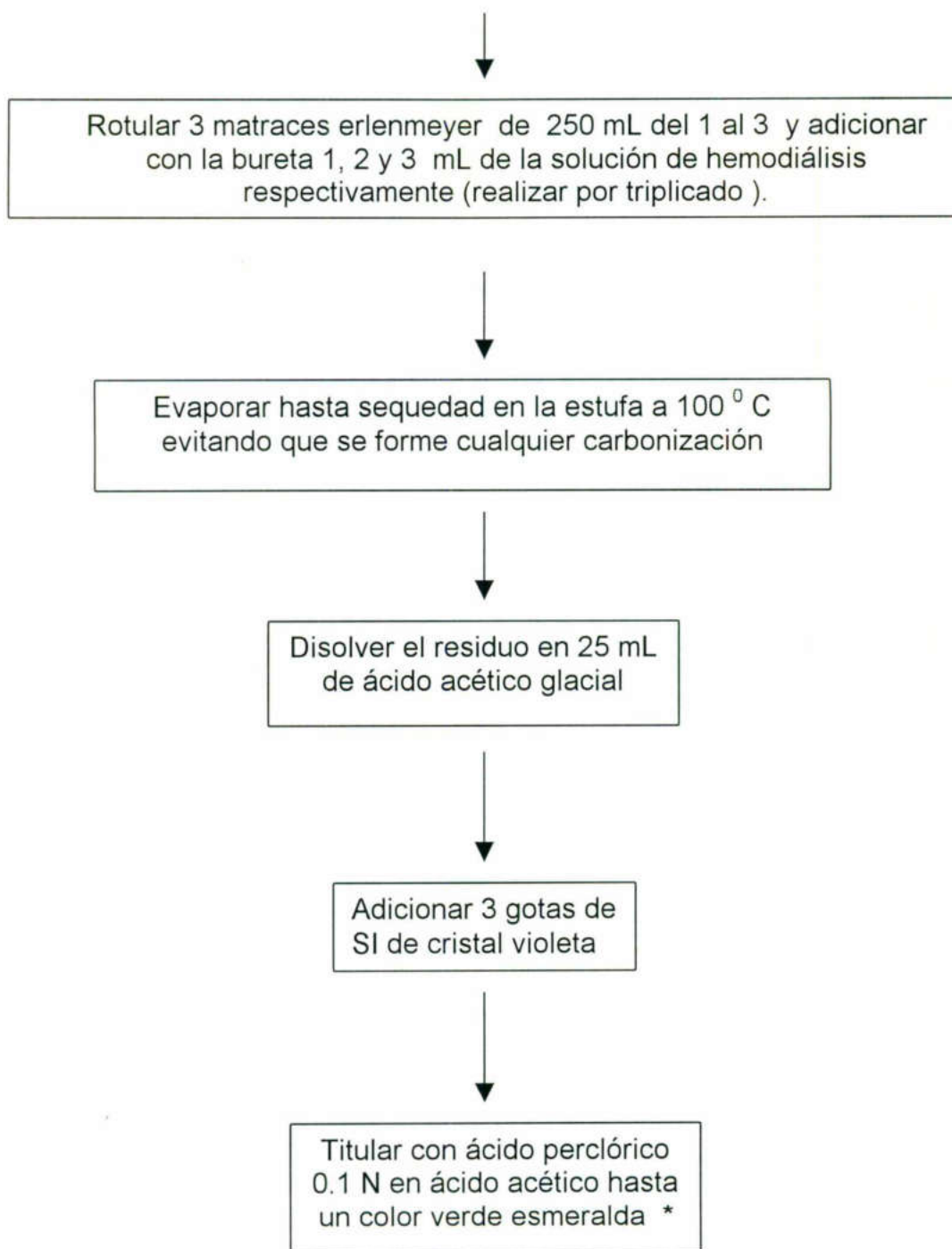
Figura 7 : Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso

## PRECISION DEL SISTEMA

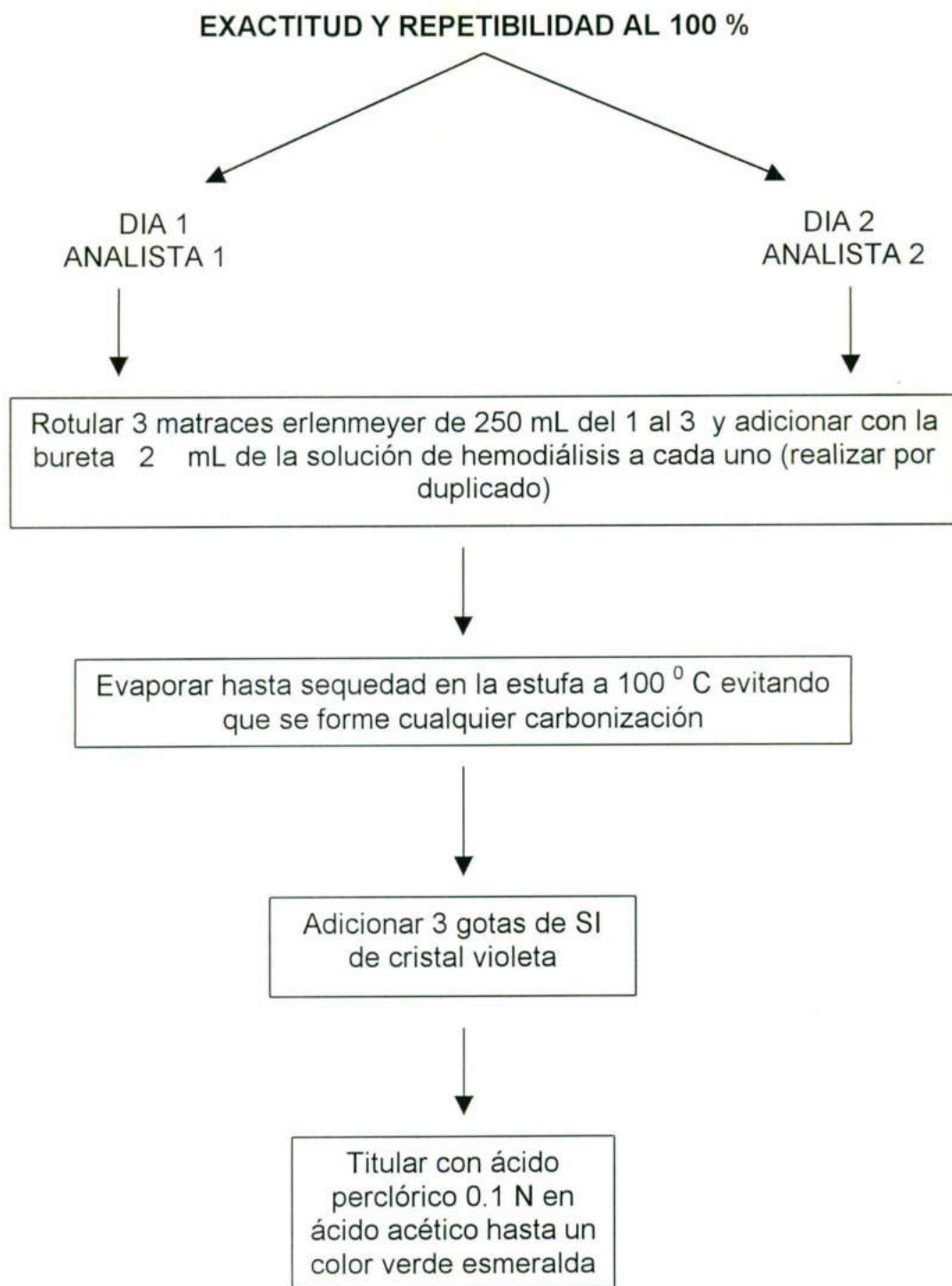


**Figura 8** : Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso

## LINEARIDAD DEL METODO



**Figura 9** : Determinación de la linealidad del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución de hemodiálisis.



**Figura 10** : Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución de hemodiálisis.

## ESPECIFICIDAD DEL METODO



Rotular 3 matraces erlenmeyer y adicionar con la bureta 2 mL de la solución de hemodiálisis a cada uno



Evaporar hasta sequedad en la estufa a 100 ° C evitando que se forme cualquier carbonización

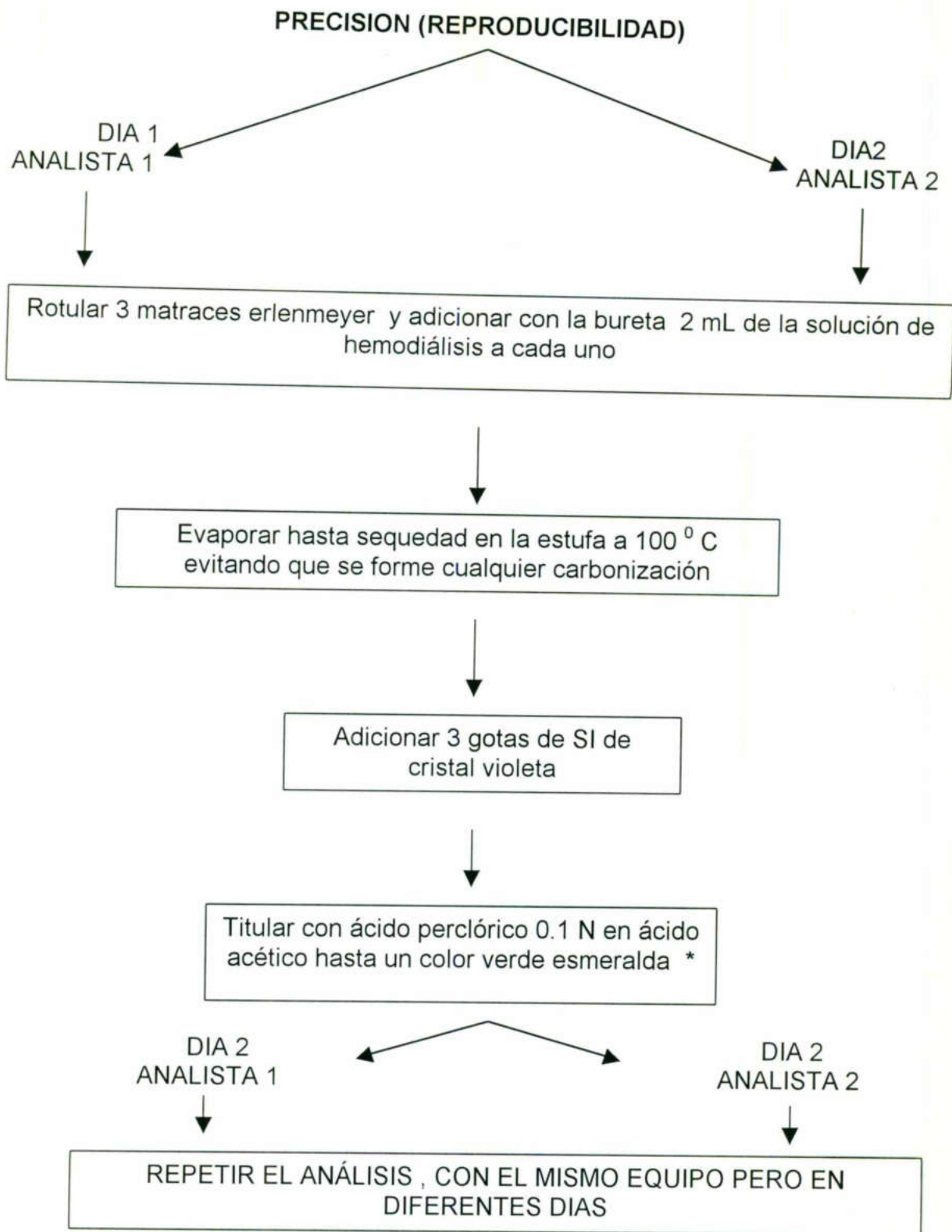


Adicionar 3 gotas de SI de cristal violeta



Titular con ácido perclórico 0.1 N en ácido acético hasta un color verde esmeralda \*

**Figura 11** : Determinación de la especificidad del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso en la solución placebo de hemodiálisis.



**Figura 12 :** Determinación de la precisión del método de cuantificación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso



## 6. Validación del método volumétrico para la determinación de calcio

### LINEARIDAD DEL SISTEMA

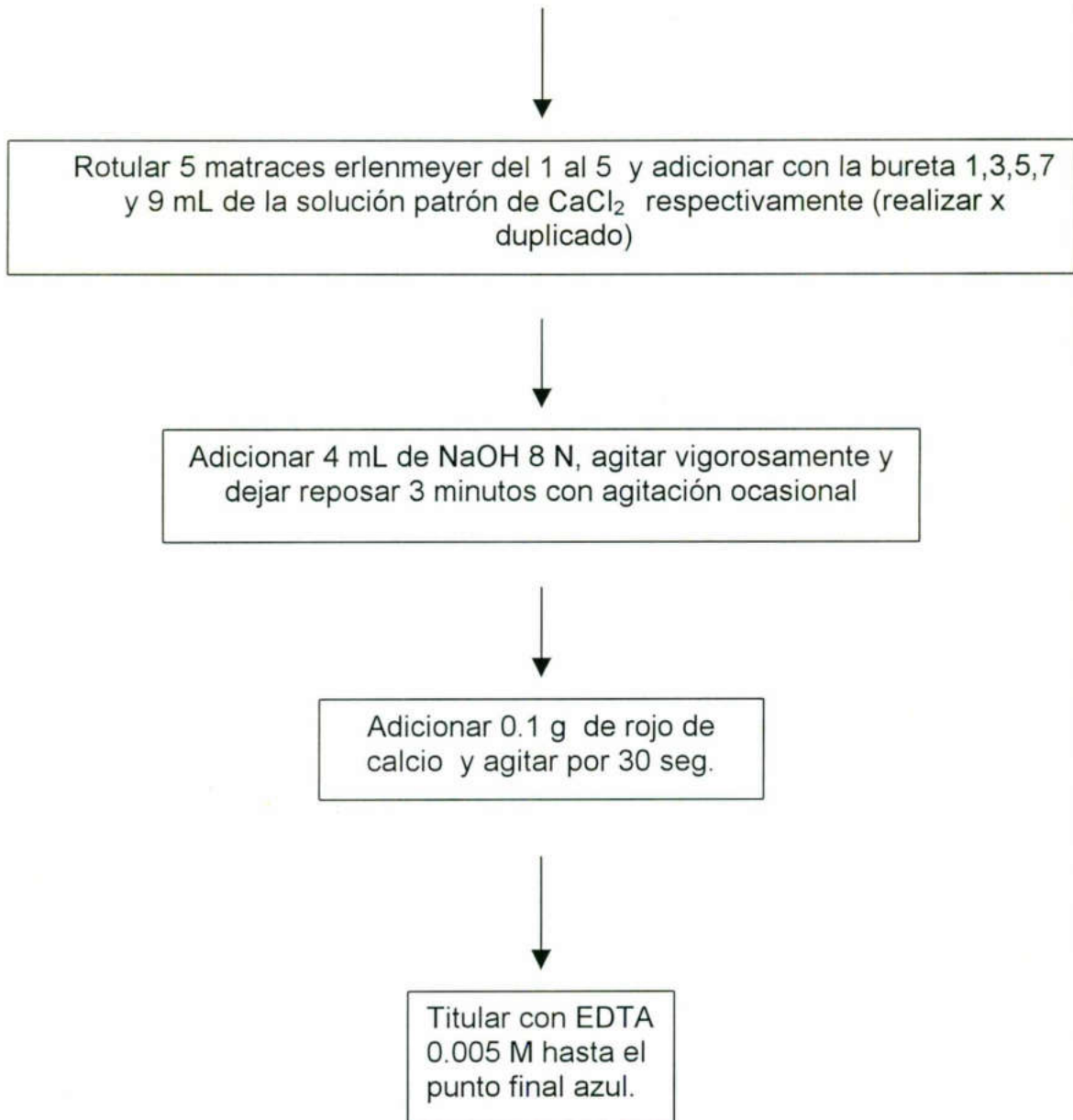
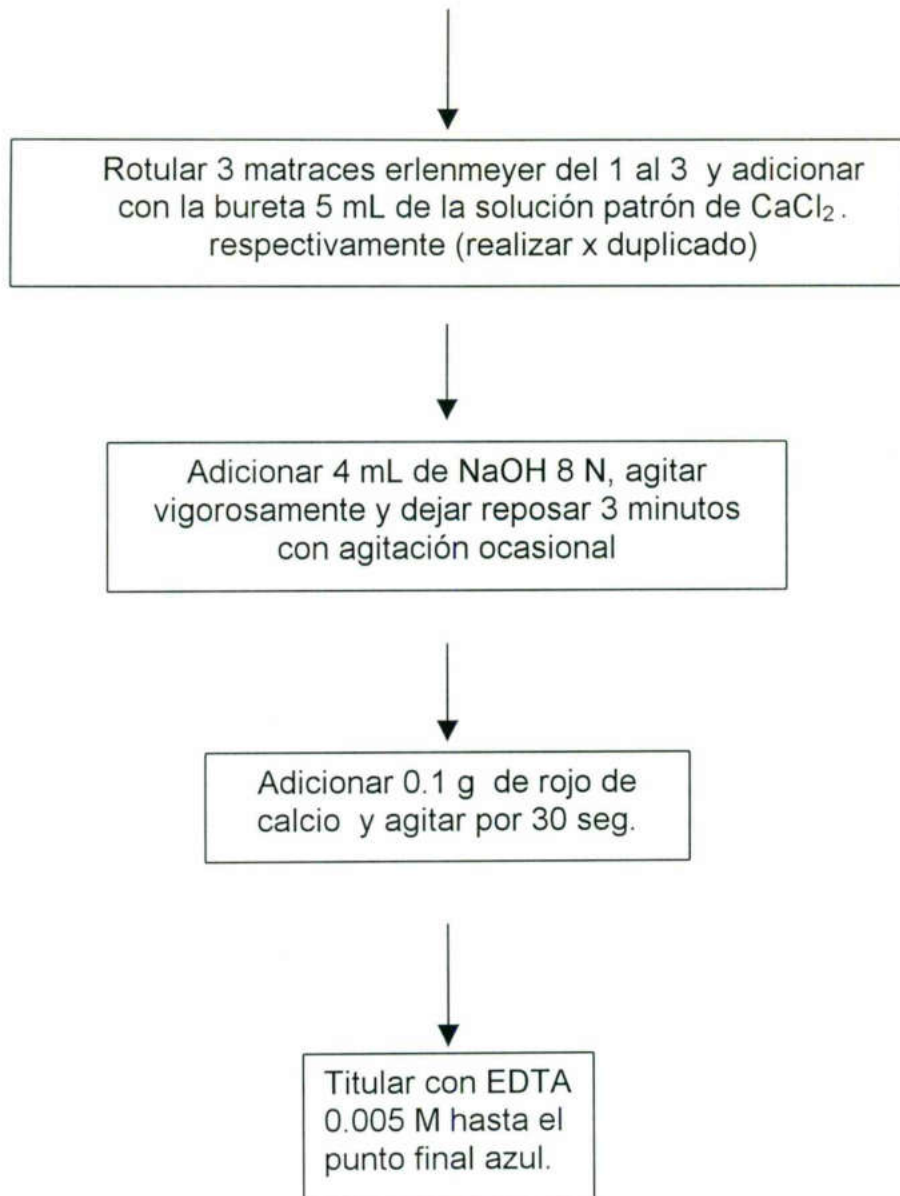


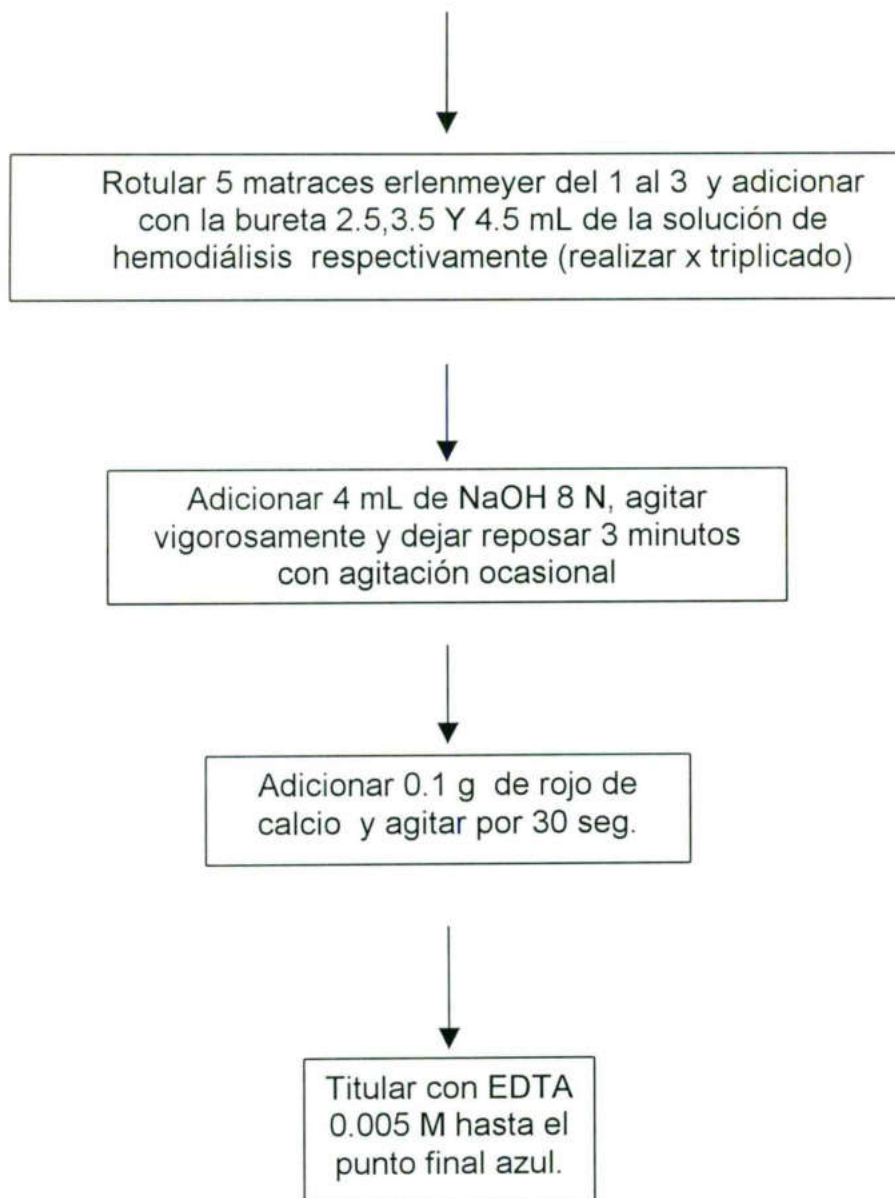
Figura 13 : Método para determinar la linealidad del sistema de medición de calcio.

## PRECISION DEL SISTEMA

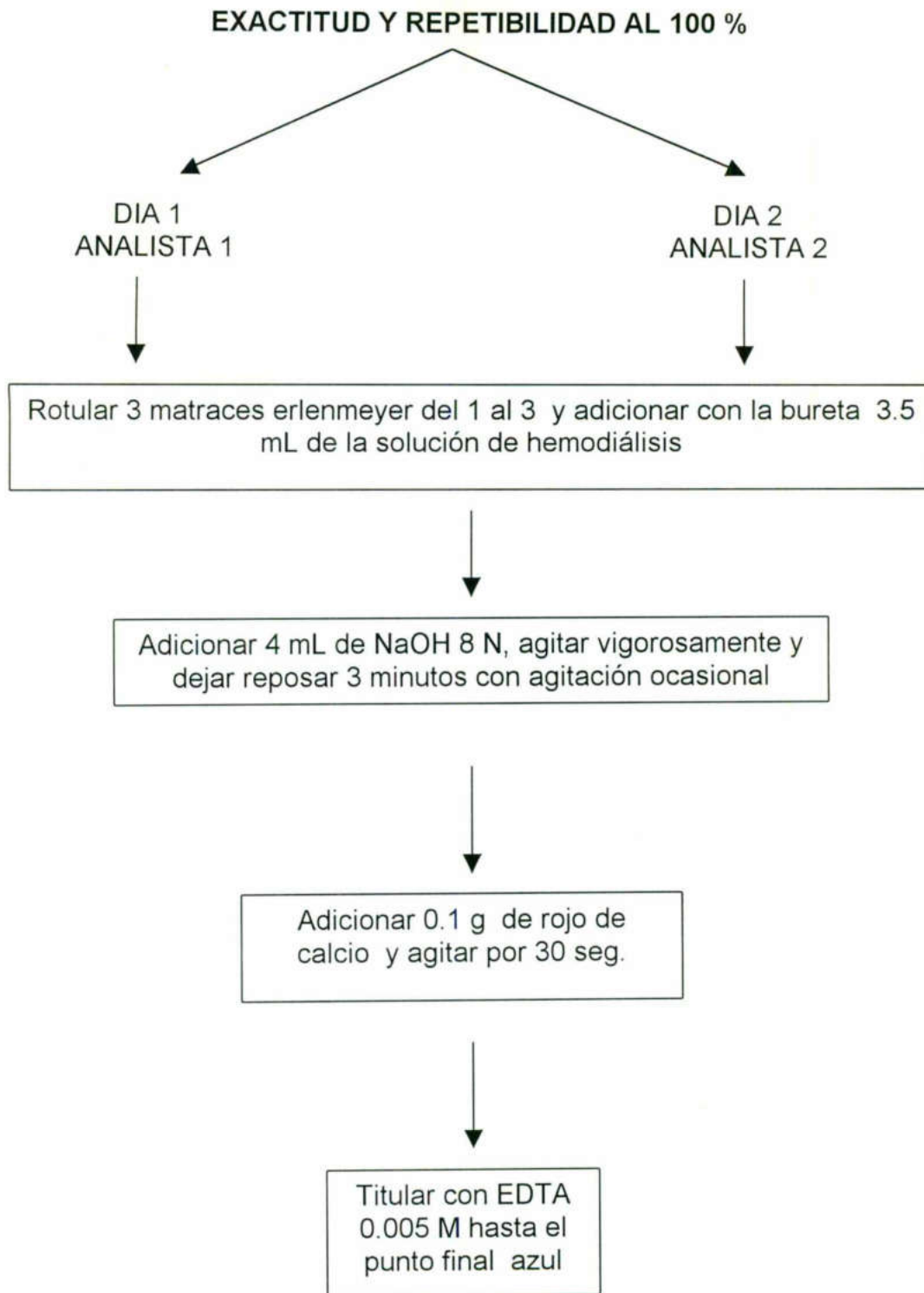


**Figura 14** : Método para determinar la precisión del sistema de medición de calcio

## LINEARIDAD DEL METODO



**Figura 15** : Determinación de la linealidad del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis.



**Figura 16 :** Método volumétrico para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis

## ESPECIFICIDAD DEL METODO

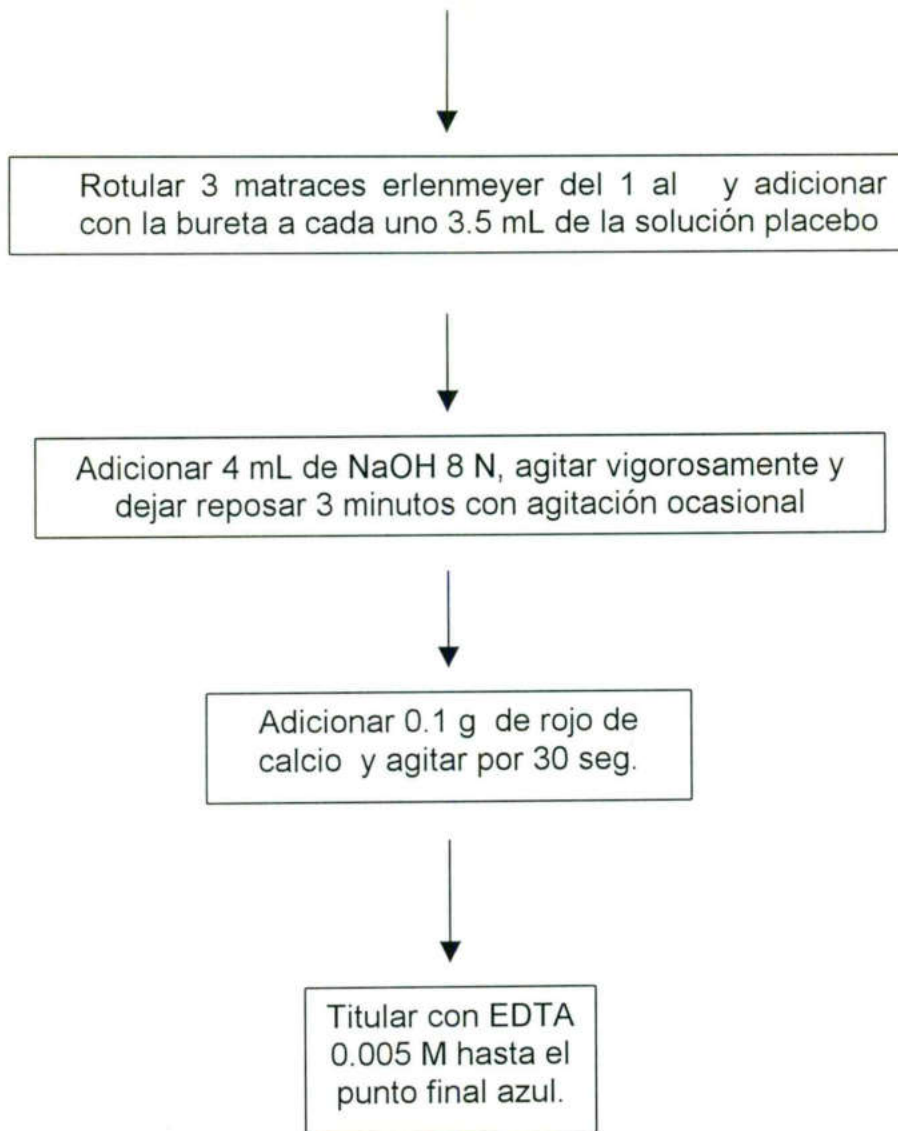
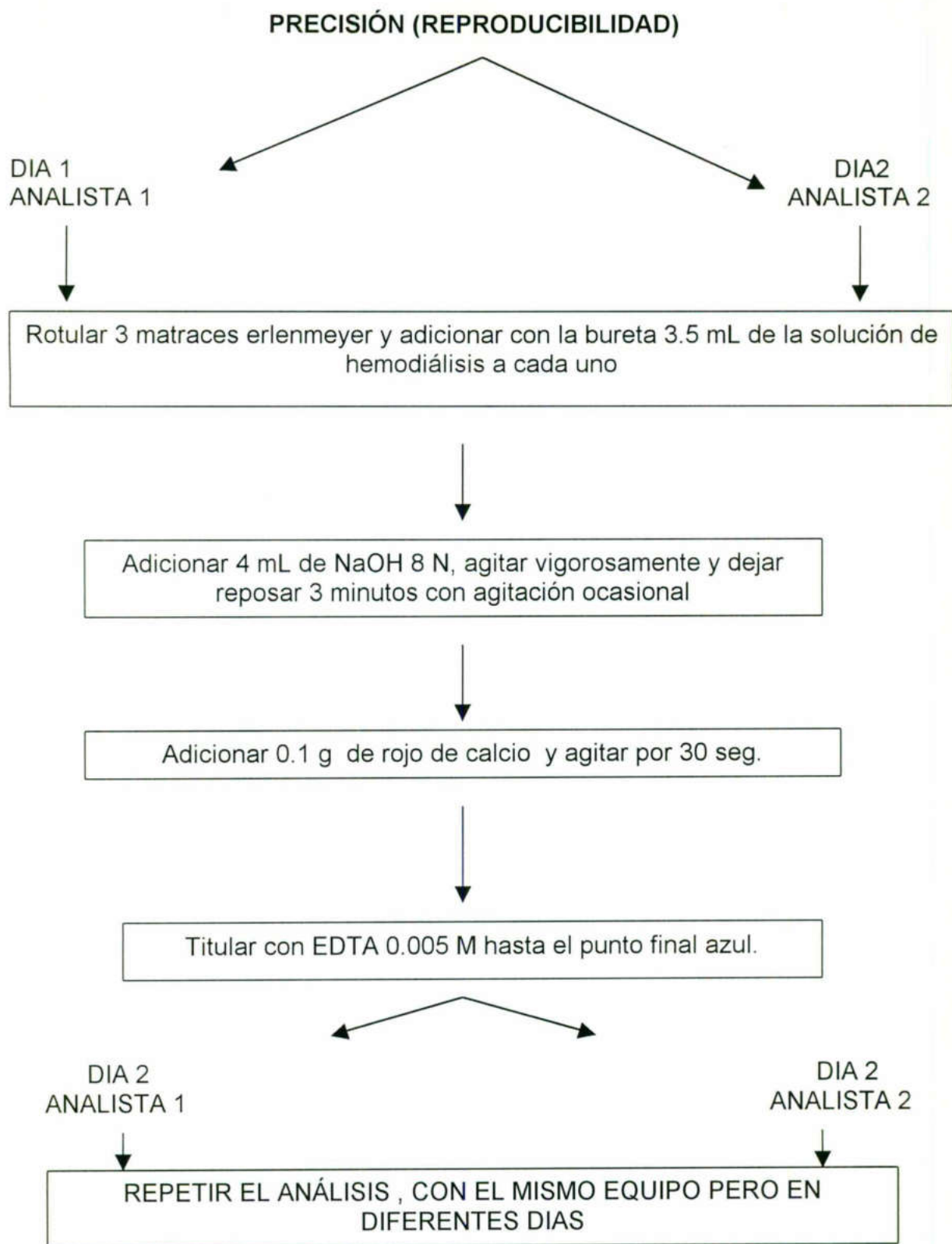


Figura 17 : Determinación de la especificidad del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis.



**Figura 18** : Determinación de la precisión del método de cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis.

## 7. Validación del método volumétrico para la determinación de cloruros

### LINEARIDAD DEL SISTEMA

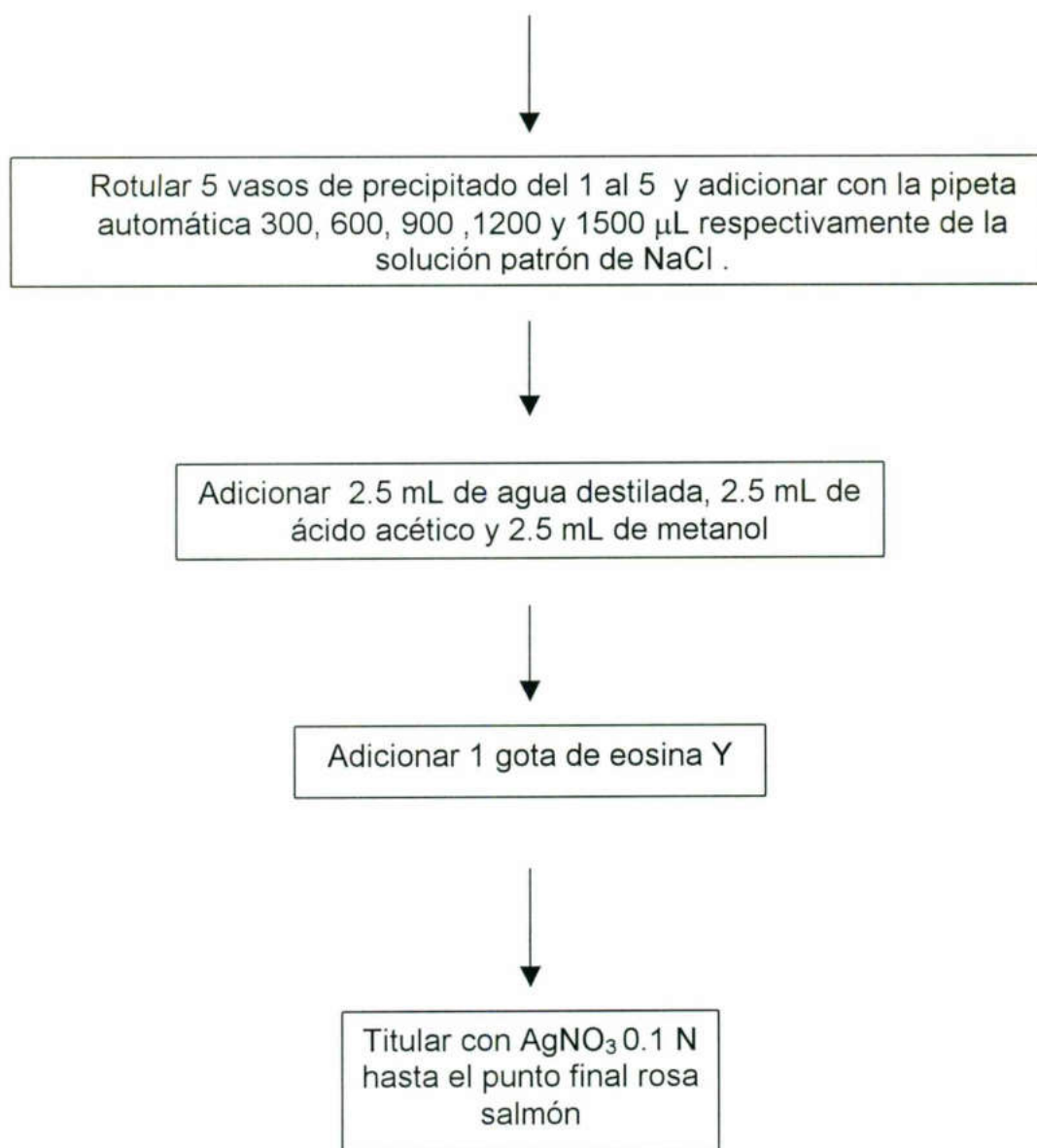


Figura 19 : Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de cloruros

## PRECISIÓN DEL SISTEMA

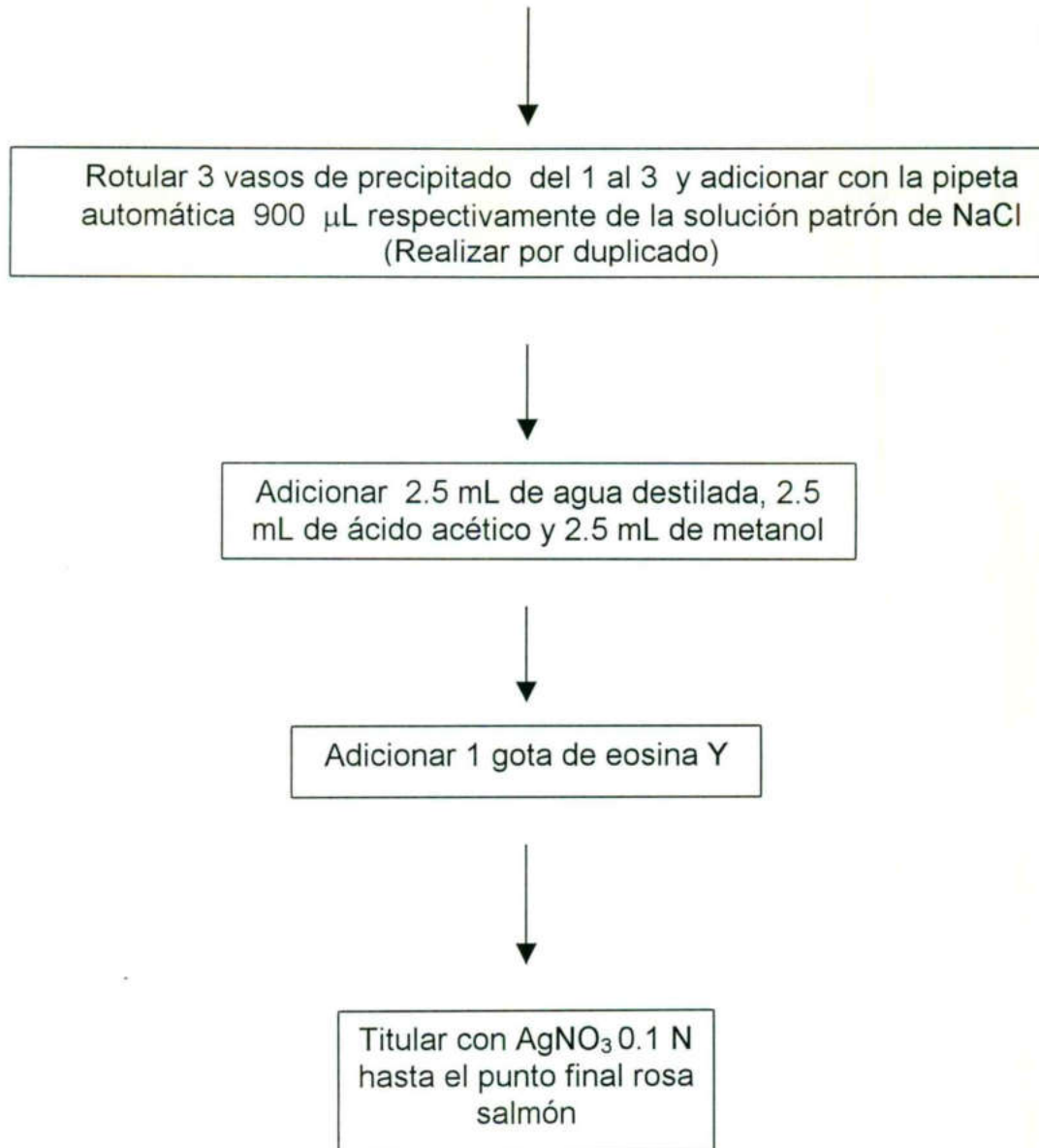
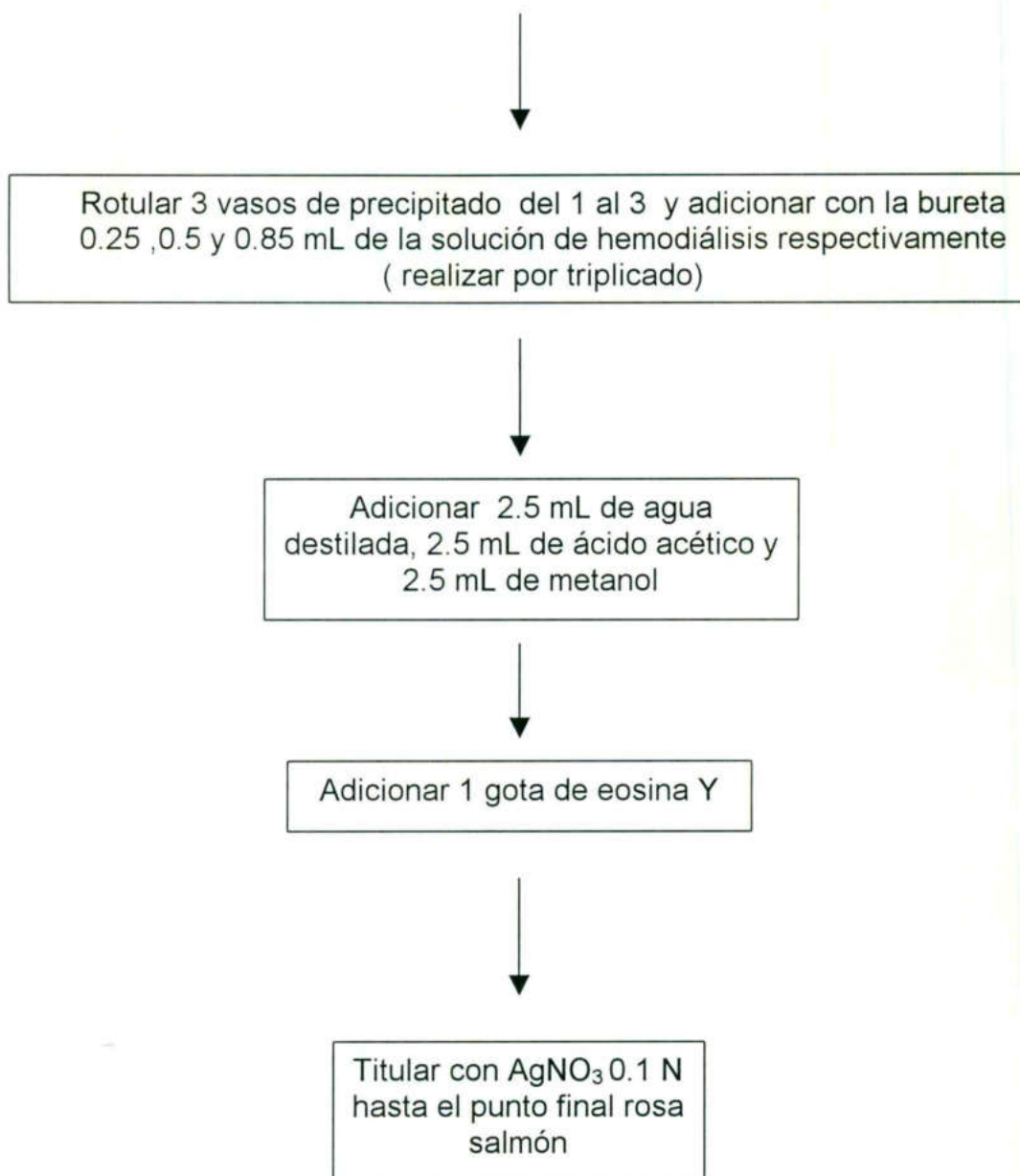


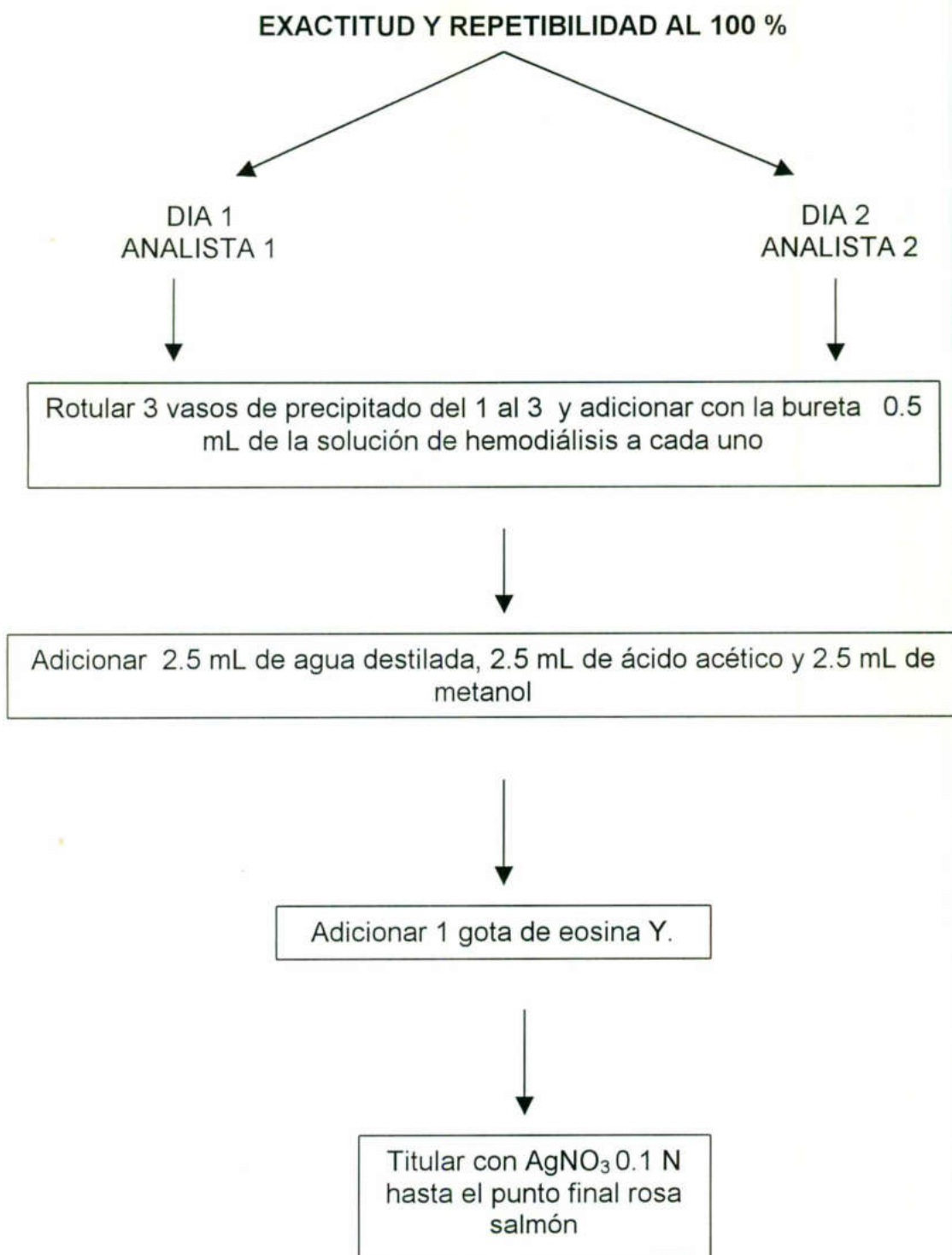
Figura 20 : Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de cloruros



## LINEARIDAD DEL METODO

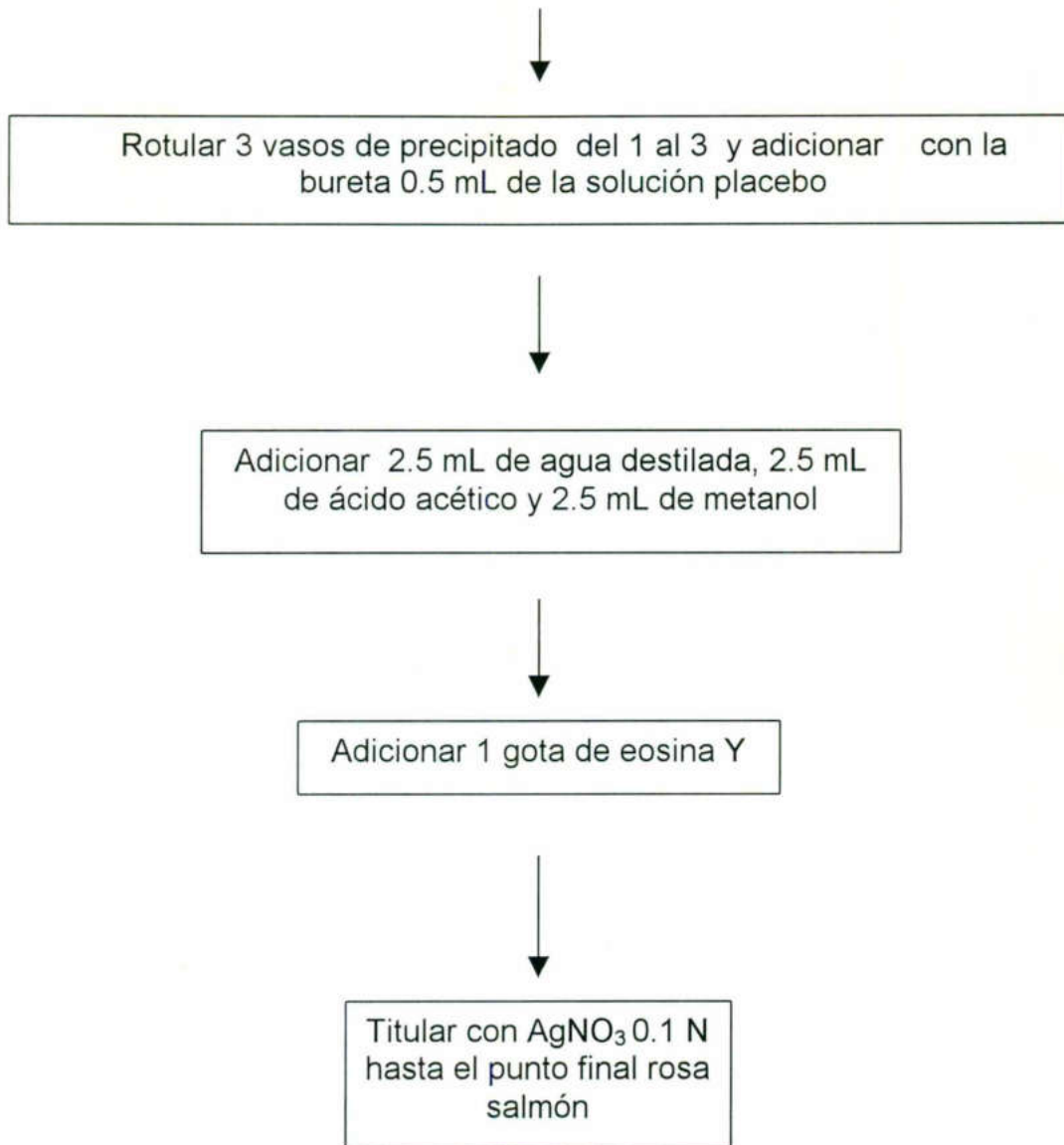


**Figura 21** : Determinación de la linealidad del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis.

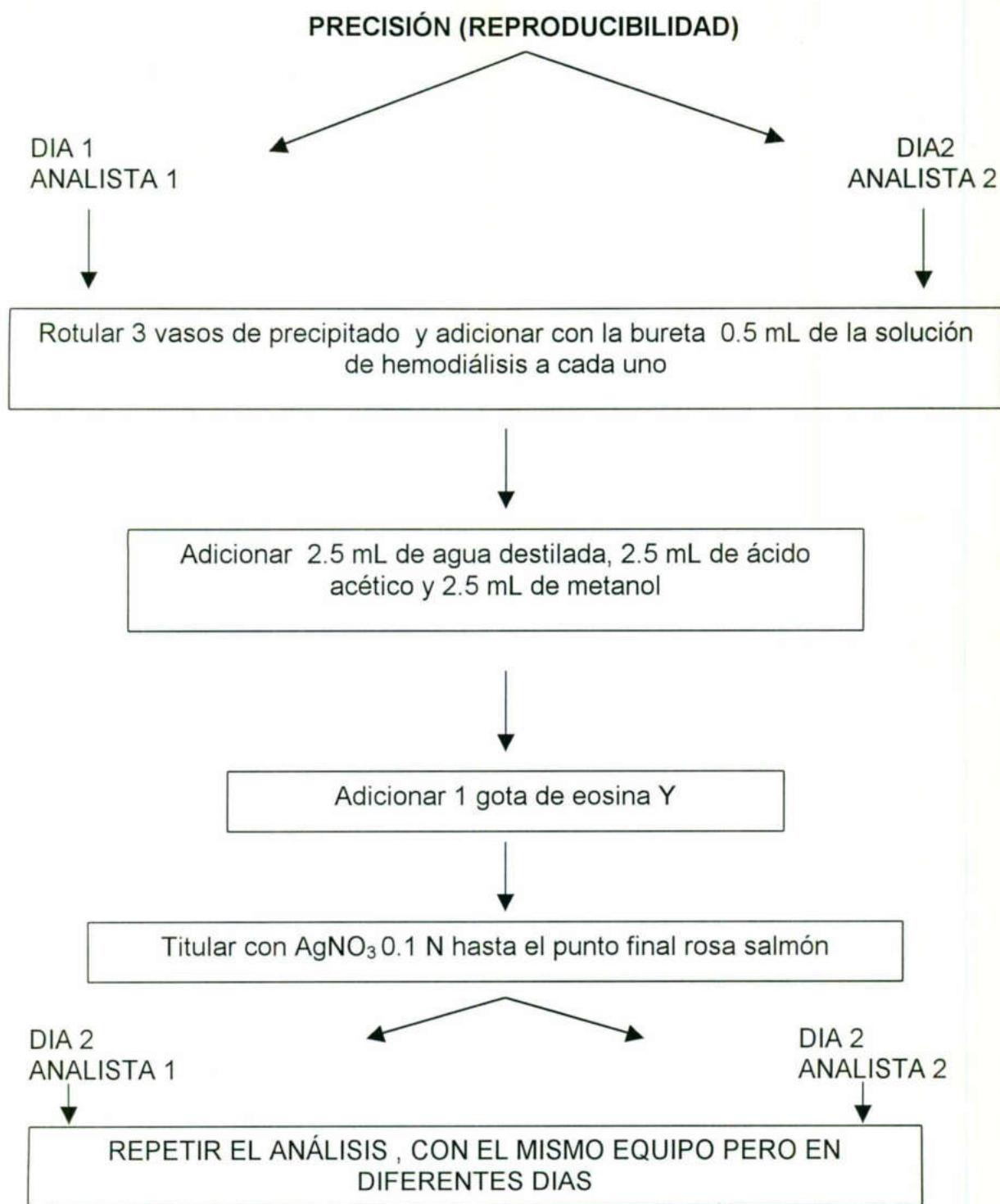


**Figura 22** : Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis

## ESPECIFICIDAD



**Figura 23 :** Determinación de la especificidad del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis.



**Figura 24 :** Determinación de la precisión del método de cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis

## 8. Validación del método espectrofotométrico para la determinación de dextrosa

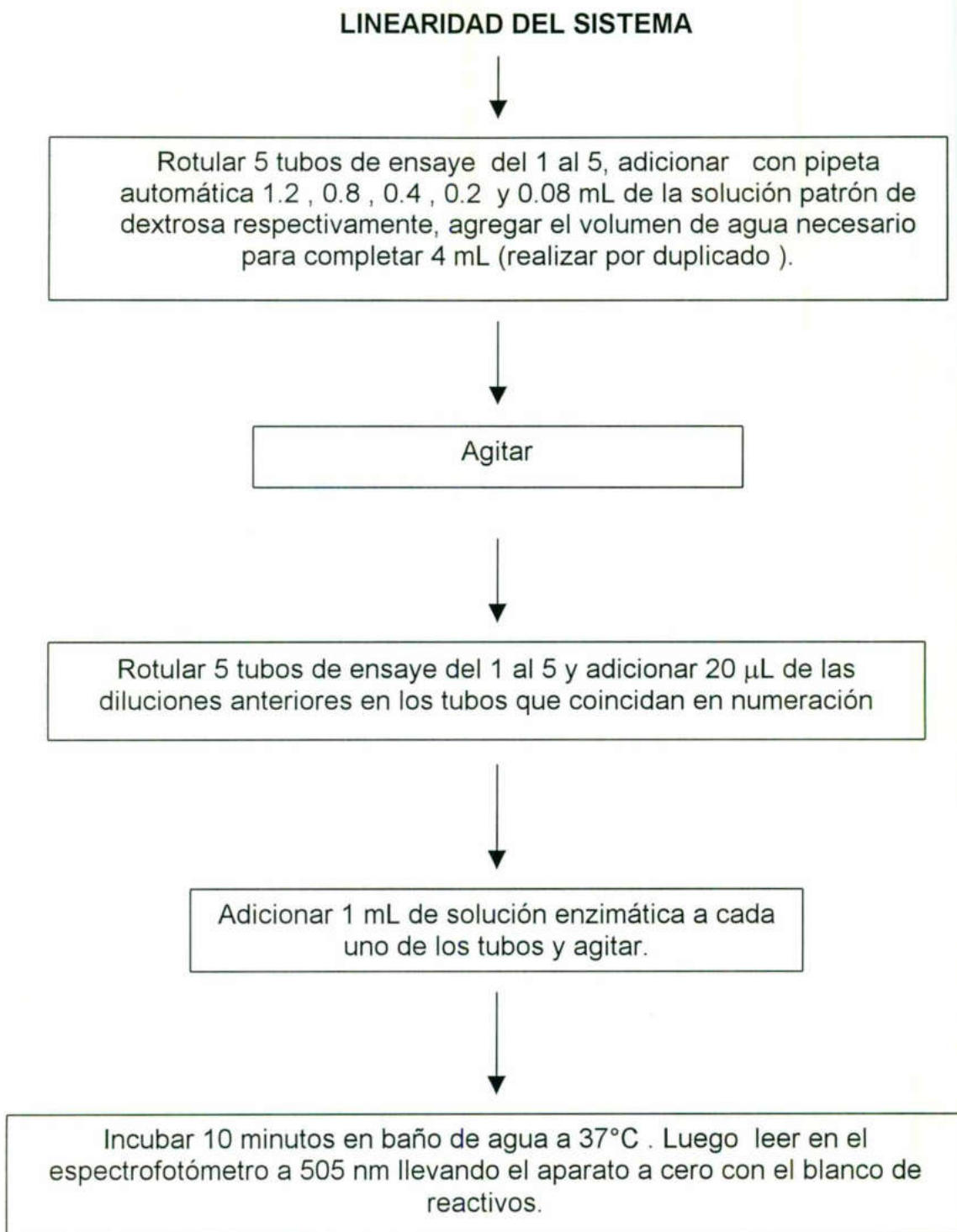


Figura 25 : Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de dextrosa

## PRESICIÓN DEL SISTEMA

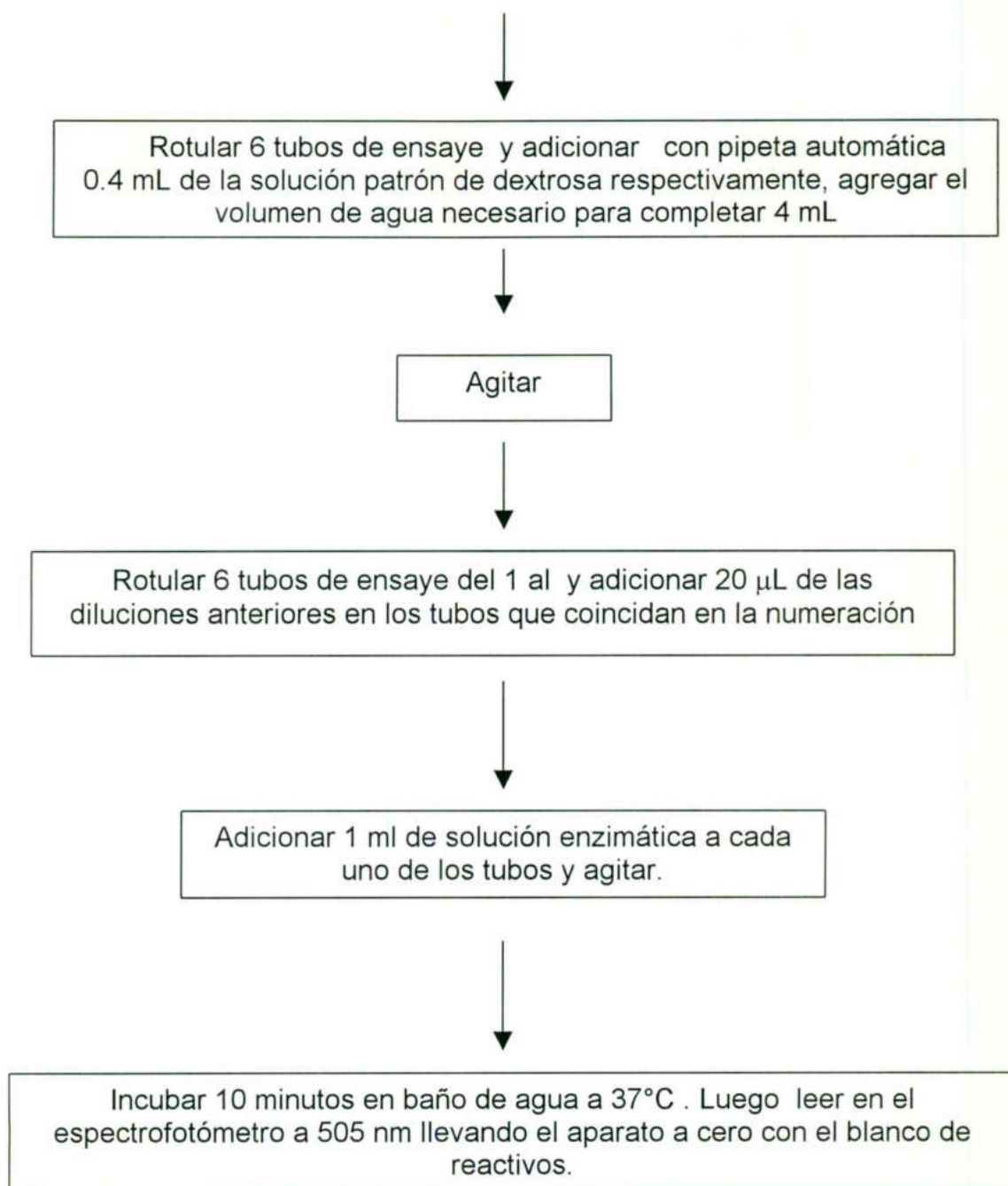
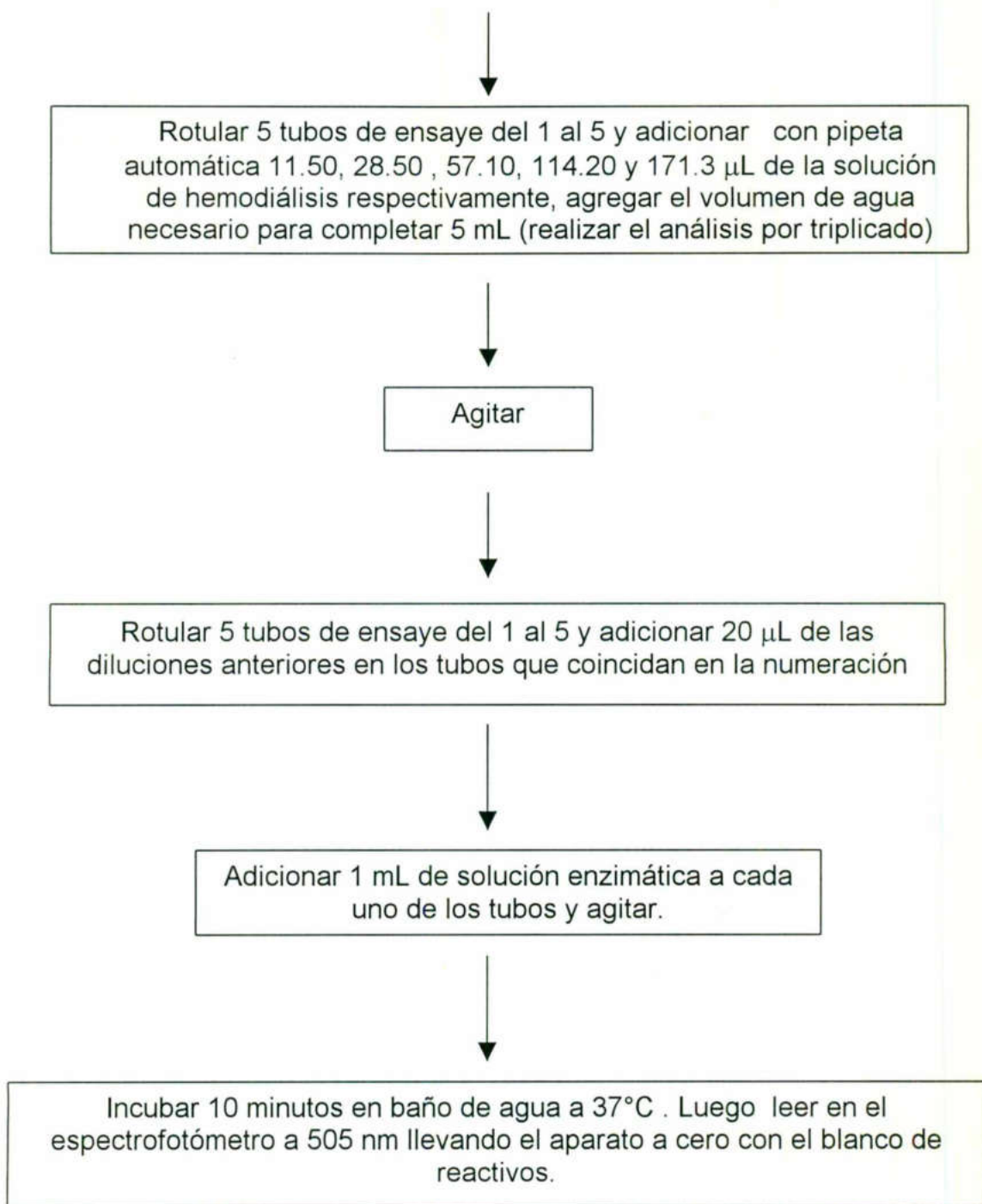
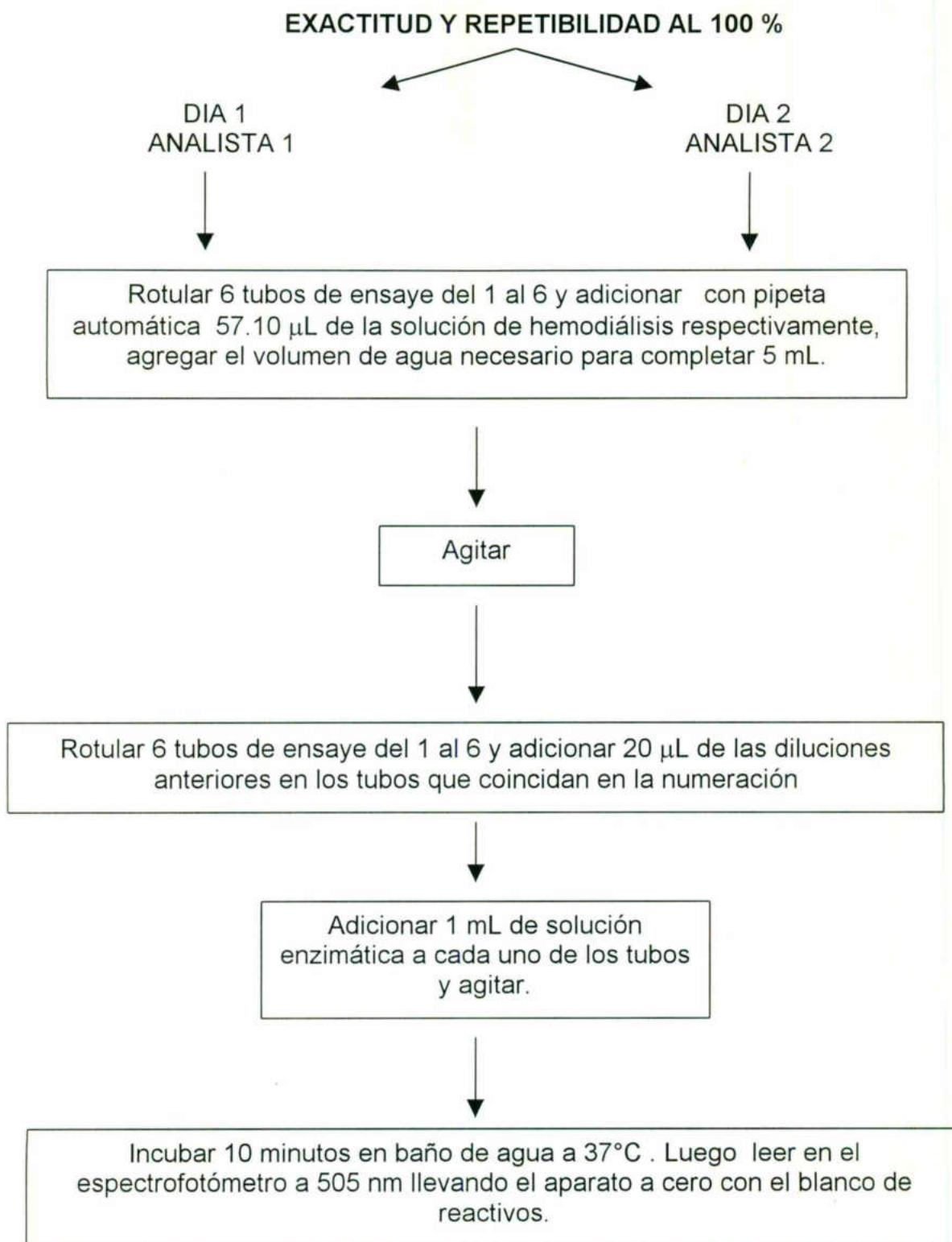


Figura 26 : Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de dextrosa

## LINEARIDAD DEL MÉTODO



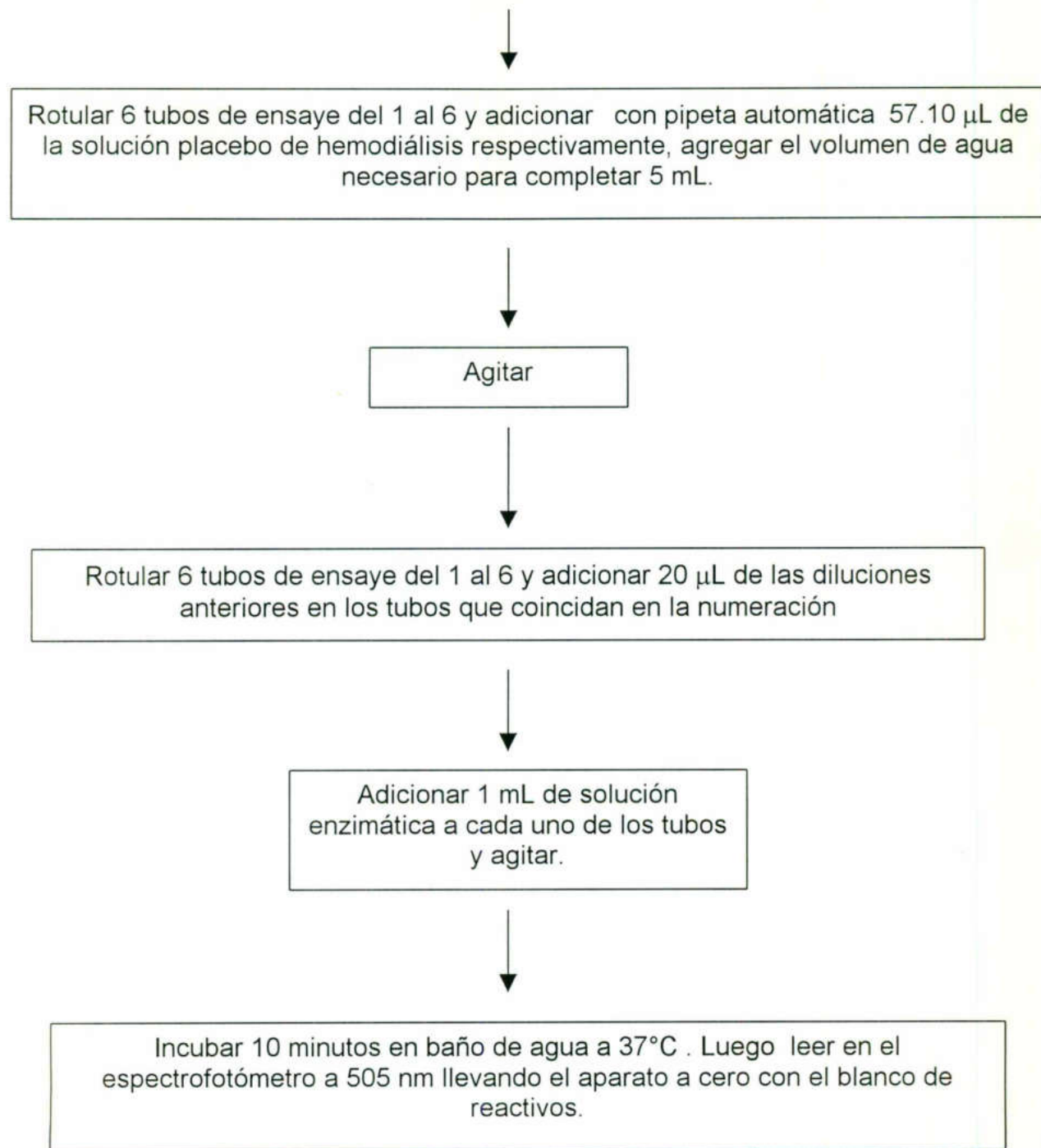
**Figura 27** : Determinación de la linealidad del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis



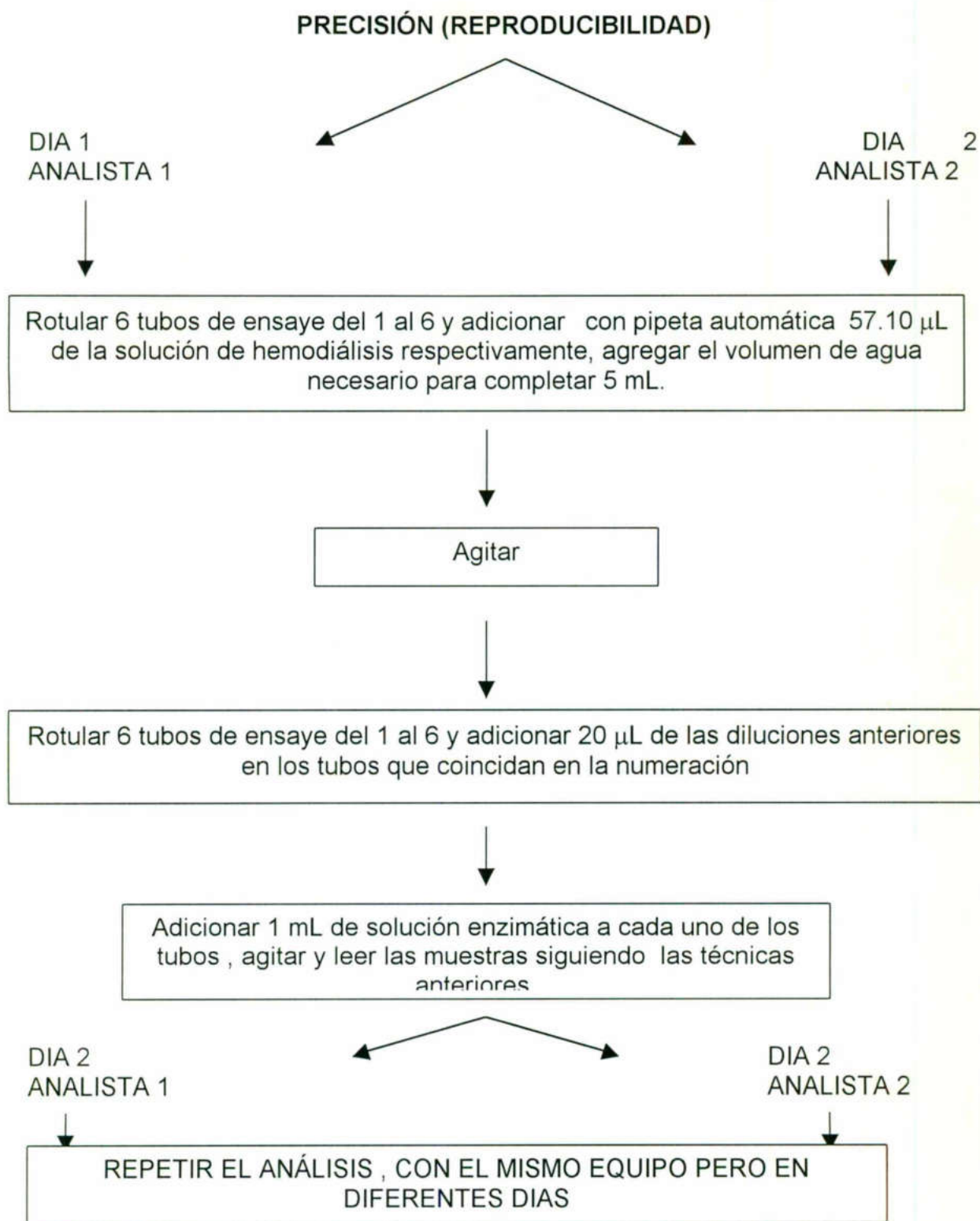
**Figura 28** : Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis



## ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO



**Figura 29** : Determinación de la especificidad del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis



**Figura 30 :** Determinación de la precisión del método de cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis.

## 9. Validación del método volumétrico para la determinación de magnesio

### LINEARIDAD DEL SISTEMA

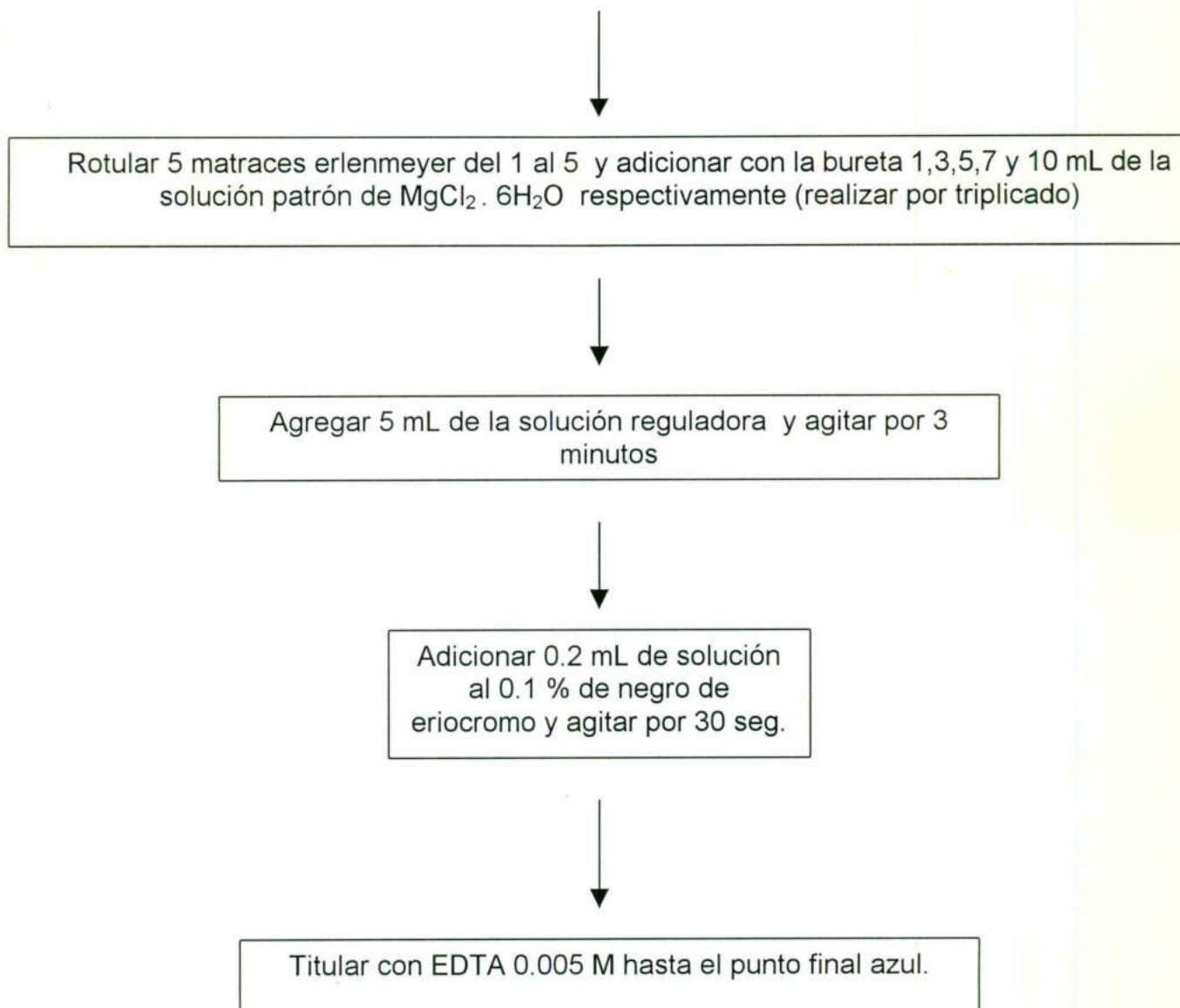


Figura 31 : Pasos para determinar la linealidad del sistema de medición de magnesio

## PRECISIÓN DEL SISTEMA DEL SISTEMA

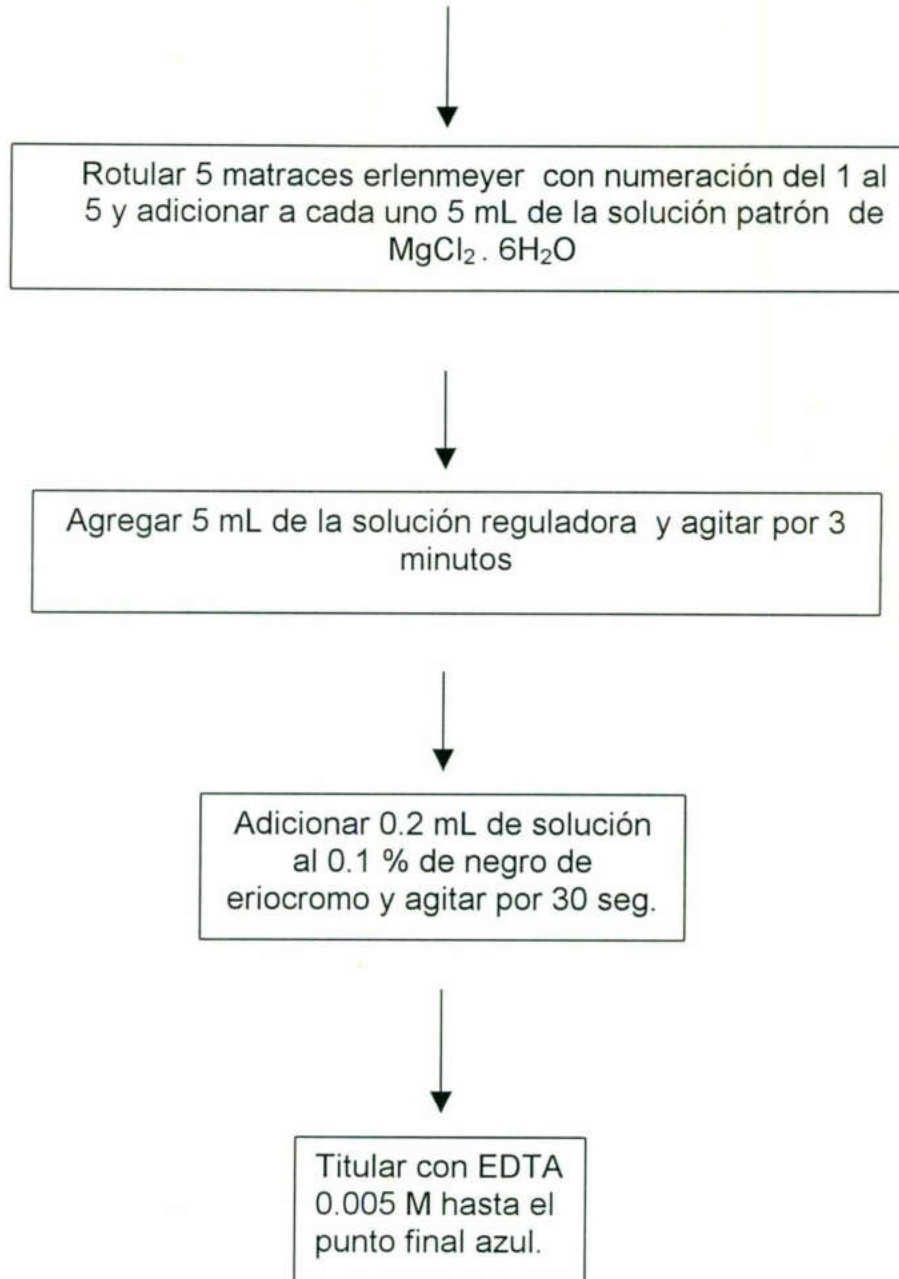


Figura 32 : Pasos para determinar la precisión del sistema de medición de magnesio

## LINEARIDAD DEL MÉTODO

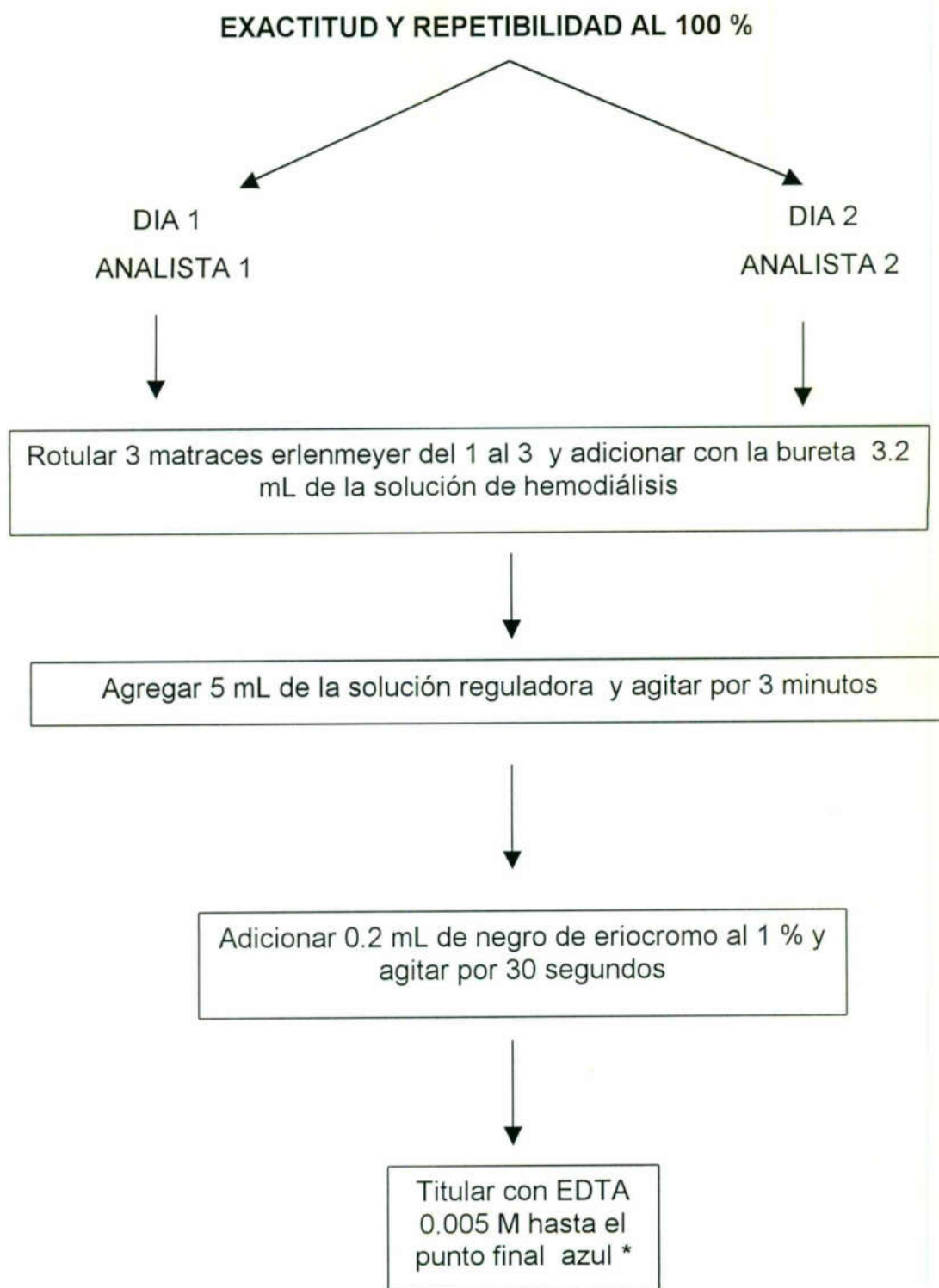
Rotular 4 matraces erlenmeyer con numeración del 1 al 4 y adicionar con la bureta 1,2,3 y 4 mL de la solución de hemodiálisis respectivamente (realizar por triplicado).

Agregar 5 mL de la solución reguladora y agitar por 3 minutos

Adicionar 0.2 mL de solución al 0.1 % de negro de eriocromo y agitar por 30 seg.

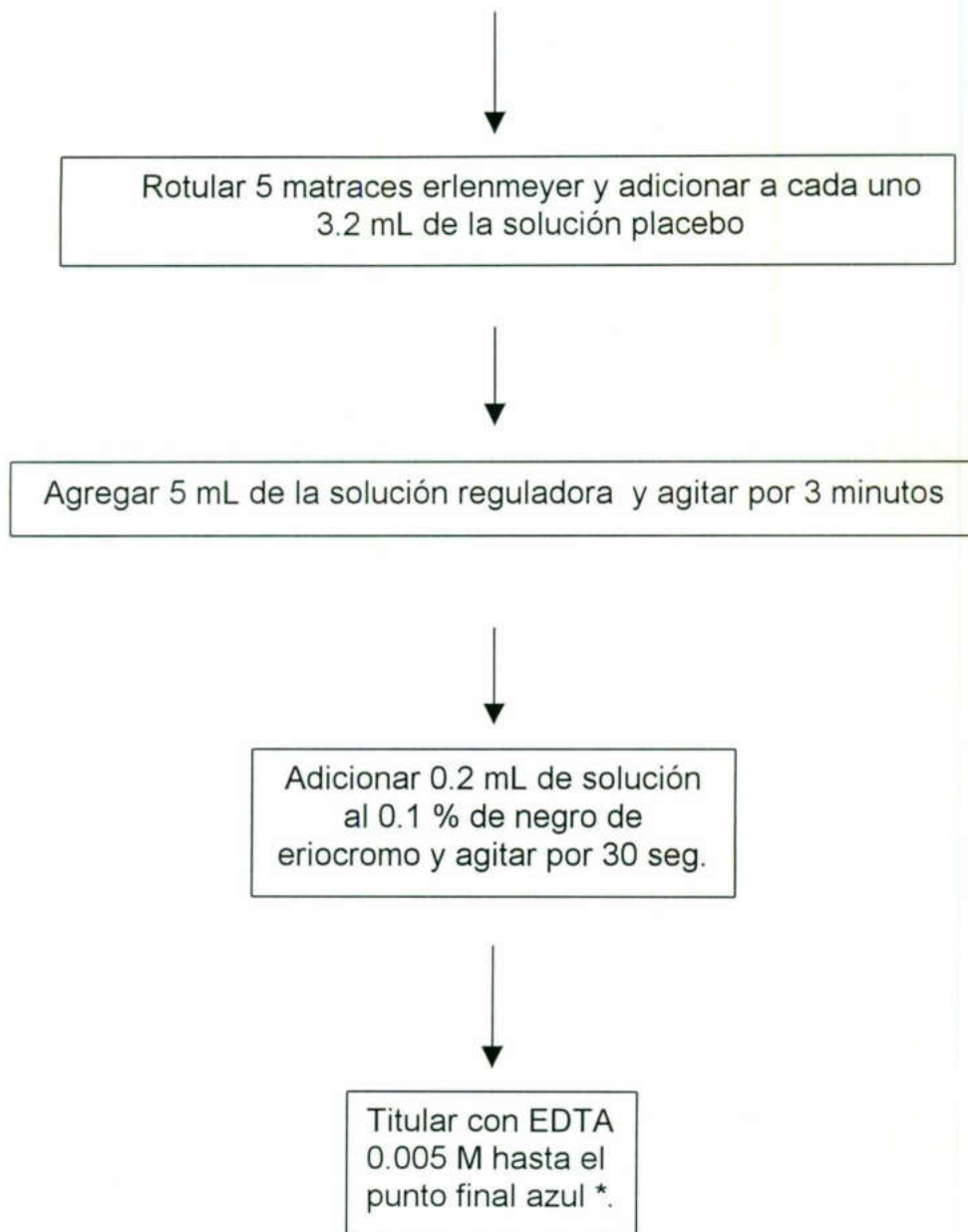
Titular con EDTA 0.005 M hasta el punto final azul \*.  
\*NOTA: Todos los resultados se corregirán con el blanco de reactivos para determinación de Ca.

**Figura 33 :** Determinación de la linealidad del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis

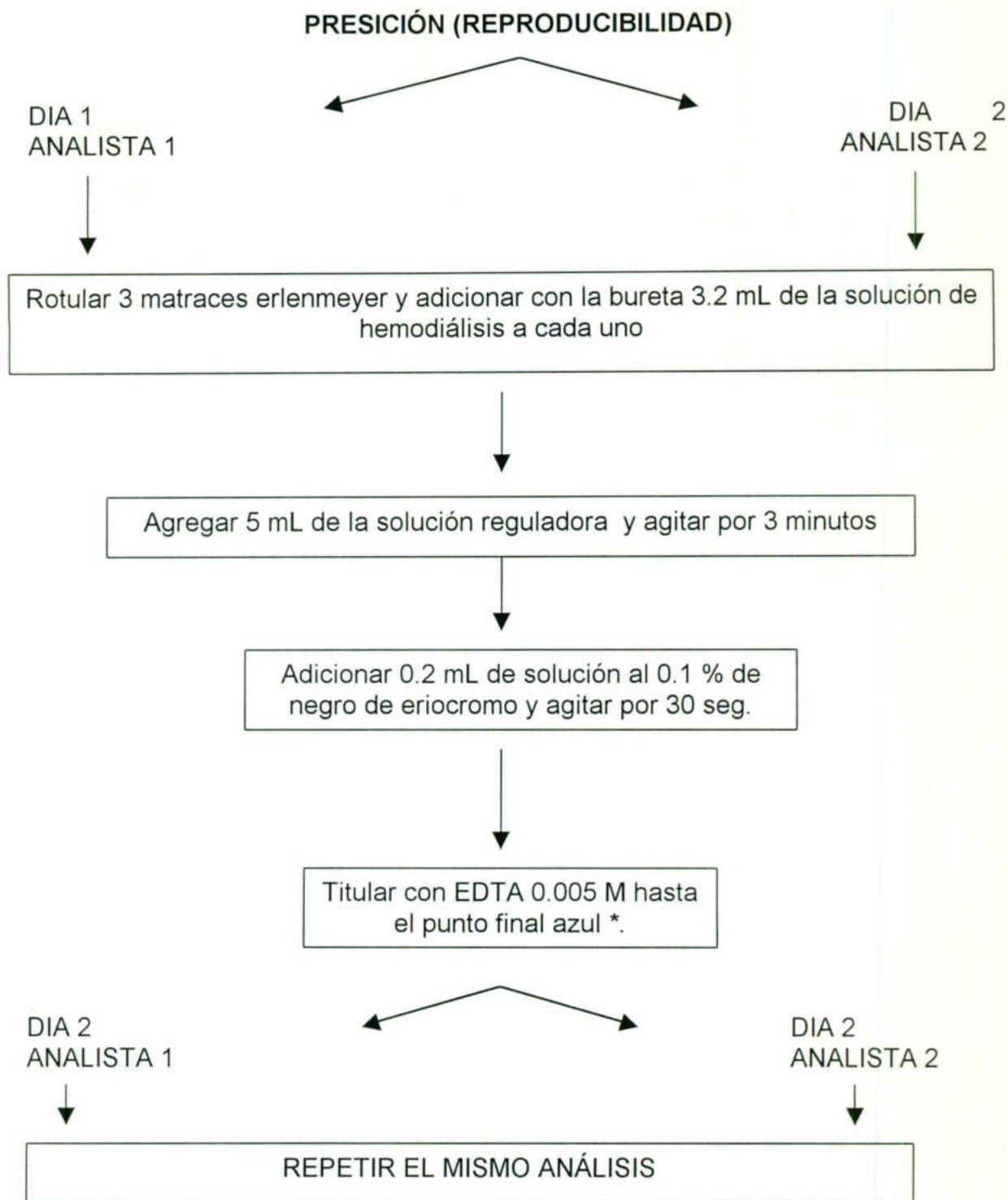


**Figura 34** : Pasos para determinar la exactitud y repetibilidad al 100 % de la cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis

## ESPECIFICIDAD



**Figura 35** : Determinación de la especificidad del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis



**Figura 36** : Determinación de la precisión del método de cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis



## 10. Procedimientos de cálculo

### a. Preparación de soluciones stock

Sabiendo que en el punto de equivalencia :

Número de moles de titulante = Número de moles de titulado

Numero de moles =  $mg / PA$

$mg / PA = M \times V$

$mg = M \times PA \times V$

Número de equivalentes de titulante = Número de equivalentes de titulado

Número de equivalentes =  $mg / PEq$

$mg / PEq = N \times V$

$mg = N \times PEq \times V$

En donde:

$mg$  = miligramos del elemento de interés ( Ca, Mg etc)

$M$  = concentración del titulante en Molaridad

$N$  = concentración del titulante en Normalidad

$PA$  = peso atómico del elemento de interés

$PEq$  = peso equivalente del elemento de interés

$V$  = volumen que se desea gastar en la titulación ( idealmente 40 ml para el 100 % ).

### b. Linealidad del sistema

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato ( Cuadro 13 )

Cuadro 13 : Formato para tabular los resultados de la linealidad del sistema

Solución patrón (x)	Concentración de la Propiedad medida (y)			
	X <sub>1</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>12</sub>	.....
X <sub>2</sub>	Y <sub>21</sub>	Y <sub>22</sub>	.....	Y <sub>2n</sub>
.	.	.		.
.	.	.		.
.	.	.		.
X <sub>t</sub>	Y <sub>t1</sub>	Y <sub>t2</sub>	.....	Y <sub>tn</sub>

t = número de diluciones.

n = número de replicaciones (propiedad medida ) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares para coeficientes de correlación y coeficiente de determinación:

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

3) Cálculos finales para el coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \sqrt{\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum y)^2][nt(\sum y^2) - (\sum x)^2]}}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum y)^2][nt(\sum y^2) - (\sum x)^2]}$$

4) Cálculos para la exactitud del sistema a partir del porcentaje recuperado

Calcular el porcentaje recuperado R para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = (y/x) 100$$

1. Tabular los resultados

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2 Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = (\sum R) / N$$

$$DE = \sqrt{\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)}}$$

3 . Cálculos finales:

Coeficiente de variación:

$$CV = ( DE / \bar{R} ) \times 100$$

**c. Exactitud y repetibilidad al 100 %**

1. Cálculos preliminares:

$$\begin{aligned}\Sigma R &= R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n \\ \Sigma R^2 &= R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2 \\ \bar{R} &= (\Sigma R) / N\end{aligned}$$

**d. Precisión del sistema**

1. Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$$

2. Cálculos preliminares.

$$\begin{aligned}\Sigma y &= y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n \\ \Sigma y^2 &= y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2\end{aligned}$$

$$y = \Sigma y / N$$

$$DE = \sqrt{\frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

### 3. Cálculos finales

Coefficiente de variación

$$CV = (DE / y) \times 100$$

### e. Linealidad del método

#### A. Cantidad Adicionada- Cantidad Recuperada

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato( Cuadro 14 )

**Cuadro 14** : Formato para tabular los resultados de la linealidad del método

Cantidad adicionada (x)				Cantidad recuperada (y)			
X <sub>11</sub> ,	X <sub>12</sub> ,	...	X <sub>1n</sub>	Y <sub>11</sub> ,	Y <sub>12</sub> ,	...	Y <sub>1n</sub>
X <sub>21</sub> ,	X <sub>22</sub> ,	...	X <sub>2n</sub>	Y <sub>21</sub> ,	Y <sub>22</sub> ,	...	Y <sub>2n</sub>
.	.	.	.	.	.	.	.
X <sub>t1</sub> ,	X <sub>t2</sub> ,	...	X <sub>tn</sub>	Y <sub>t1</sub> ,	Y <sub>t2</sub> ,	...	Y <sub>tn</sub>

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada , sean equivalentes.

#### 2.- Cálculos preliminares

$$\sum X = X_{11} + X_{12} + \dots + X_{1n} + X_{21} + X_{22} + \dots + X_{2n} + \dots + X_{t1} + \dots + X_{t2} + \dots + X_{tn}$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + \dots + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\sum x^2 = x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + \dots + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2$$

$$\sum y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\sum xy = x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} + \dots + x_{1n} y_{1n} + x_{21} y_{21} + x_{22} y_{22} + \dots + x_{2n} y_{2n} + \dots + x_{t1} y_{t1} + x_{t2} y_{t2} + \dots + x_{tn} y_{tn}$$

3.- Cálculos finales:

$$m = \frac{nt (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{nt (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - m (\sum x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)]^2}{[nt (\sum x^2) - (\sum x)^2] [nt (\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

B . Por ciento Recuperado

Calcular el porcentaje recuperado  $\bar{R}$  para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$\bar{R} = (y/x) 100$$

1. Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2 Cálculos preliminares:

$$\begin{aligned}\Sigma R &= R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n \\ \Sigma R^2 &= R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2\end{aligned}$$

$$\bar{R} = (\Sigma R) / N$$

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)}}$$

3 . Cálculos finales:

Coeficiente de variación:

$$CV = (DE / \bar{R}) \times 100$$

#### f. Exactitud y repetibilidad al 100 %

1. Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R) en base al siguiente formato  
 $R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$

2.- Cálculos preliminares:

$$\begin{aligned}\Sigma R &= R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n \\ \Sigma R^2 &= R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2 \\ \bar{R} &= (\Sigma R) / N\end{aligned}$$

$$DE = \sqrt{\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)}}$$

3. Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = (DE / \bar{R}) \times 100$$

**g. Precisión (reproducibilidad)**

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días , dos analistas y tres determinaciones.

Cuando se utilicen número distinto de días y/o a analistas y / o recobros por analista y día, se sugiere que se consulte a un estadístico.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato (Cuadro 15 )

**Cuadro 15 : Formato para tabular la precisión del método**

**ANALISTA**

		<b>1</b>	<b>2</b>
<b>D</b>	<b>1</b>	y <sub>111</sub>	y <sub>111</sub>
		y <sub>122</sub>	y <sub>212</sub>
		y <sub>113</sub>	y <sub>213</sub>
<b>I</b>	<b>2</b>	y <sub>121</sub>	Y <sub>221</sub>
		y <sub>122</sub>	Y <sub>222</sub>
		y <sub>123</sub>	Y <sub>223</sub>
<b>A</b>			



1. Cálculos preliminares:

$$y_{...} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} \\ + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\sum y^2_{...} = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 \\ + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$\bar{y} = y_{...} / N$$

$$DE = \sqrt{\frac{N (\sum y^2_{...}) - (\sum y_{...})^2}{N(N-1)}}$$

N = número total de determinaciones ( en este caso específico N = 12 )

3 . Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = ( DE / \bar{y} ) \times 100$$

**h. Anexo No. 2**

**Precisión (Reproducibilidad)**

En este anexo se describe una prueba estadística adicional para la prueba de precisión específicamente de la REPRODUCIBILIDAD.

En esta prueba se evalúa el método con el estudio de las siguientes variables: Analista, Equipo, Laboratorios, es decir, las variables que la persona que está validando el método considere que debe evaluarse.

Cuando se evalúe el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se está observando el comportamiento del método con dos factores fundamentales.

Un método es reproducible en cuanto a los factores que se analizan y no en otros.

Para el caso particular del análisis de 2 analistas en dos diferentes días y con tres repeticiones para cada uno, se realiza el análisis de varianza que se describe a continuación:

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = El ensayo de la sustancia de interés de la  $k$ ésima muestra analizada por el  $i$ ésimo analista en el  $j$ ésimo día.

$\mu$  = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra

$\alpha_i$  = Efecto del analista en el ensayo (donde  $i = 1 \dots a$ )

$\delta_{j(i)}$  = Efecto del día anidado por el analista (donde  $j = 1 \dots d$ )

$\varepsilon_{k(ij)}$  = Error del método analítico (donde  $k = 1 \dots r$ )

$a$  = número de analistas (donde  $a = 2$ )

$d$  = número de días. (donde  $d = 2$ )

$r$  = número de repeticiones (donde  $r = 3$ )

Procedimiento:

1.- Tabular los resultados de acuerdo al formato del cuadro 15

Cálculos preliminares

2.- Calcular la suma de las combinaciones analista-día (y<sub>ij</sub>):

$$y_{11\cdot} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12\cdot} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21\cdot} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22\cdot} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

3.- Calcular la suma para cada analista (y<sub>i..</sub>):

$$y_{1..} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{2..} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

4.- Calcular la suma total (y<sub>...</sub>):

$$y_{\dots} = y_{1..} + y_{2..}$$

5.- Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{ij}^2 = (y_{11\cdot})^2 + (y_{12\cdot})^2 + (y_{21\cdot})^2 + (y_{22\cdot})^2$$

6.- calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$(\sum y_{i..})^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

7.- Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

8.- Calcular la suma de cuadrados del analista (Sca) , efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$Sca = \sum y_i^2 / dr - y_{...}^2 / adr$$

9.- calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (Scd), con la siguiente fórmula :

$$Scd = \sum \sum y_{ij}^2 / r - \sum y_{i..}^2 / dr$$

10.- Calcular la suma de cuadrados del error (Sce) con la siguiente fórmula:

$$Sce = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum \sum y_{ij.}^2 / r$$

Cálculos finales

1.- Con los datos anteriores construir el cuadro 16 de análisis de la varianza (ANADEVA):

**Cuadro 16 :** Formato para tabular los resultados del análisis de varianza

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>Fcal</b>	<b>F 0.05 *</b>
<b>Analista (α)</b>	gla = a-1	Sca	Mca = Sca/ gla	Fa = Mca/ Mcd	Fgla/gld
<b>Día (δ)</b>	gld = (d-1)a	Scd	Mcd = Scd/gld	Fd = Mcd/Mce	Fgld/gle
<b>Error (ε)</b>	gle = (r-1)ad	Sce	Mce = Sce/gle	----	----

$F_{0.05}^*$  = Los valores de F0.05 se obtienen del cuadro de F, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para un  $\alpha = 0.05$

2.- Realizar la interpretación de los resultados:

Si  $Fa < F_{gla, gld; 0.05}$  El método analítico es reproducible por los analistas.

Si  $Fa \geq F_{gla, gld; 0.05}$  El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si  $F_d < F_{\alpha, \beta, g, d}$ ; 0.05 El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si  $F_d \geq F_{\alpha, \beta, g, d}$ ; 0.05 El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

### i. Comparación de dos métodos analíticos

#### 1. Información Requerida (Cuadro 17)

**Cuadro 17** : Formato para tabular la información requerida para la comparación de dos métodos analíticos

	<b>EXACTITUD AL 100 %</b>	<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>	<b>ESTUDIO DE PRECISION</b>
<b>DE1</b>	Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 1	Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 1	Desviación estándar del método 1
<b>DE2</b>	Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 2	Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 2	Desviación estándar del método 2
<b>N1</b>	Número de porcentajes recuperados del método 1	Número de porcentajes recuperados del método 2	
<b>N2</b>	Número de porcentajes recuperados del método 2	Número de porcentajes recuperados del método 2	

#### 2. Cálculos finales

a) Exactitud al 100 % o linealidad del método

Límite superior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LSIC):

$$\text{LSIC} = \text{DE}_1^2 / \text{DE}_2^2 \times F$$

F = Valor de la F de la Distribución de Fisher con (N1-1) grados de libertad en el numerador y (N2-1) grados de libertad en el denominador, y una probabilidad acumulada de 0.975.

Límite inferior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LIIC):

$$\text{LIIC} = \text{DE}_1^2 / \text{DE}_2^2 \times 1/F$$

F = Valor de la F de la Distribución de Fisher con (N1-1) grados de libertad en el numerador y (N2-1) grados de libertad en el denominador, y una probabilidad acumulada de 0.975

- b) Estudio de precisión: los cálculos aquí indicados se aplican cuando se utilizan 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

$$\text{LSIC} = \text{DE}_1^2 / \text{DE}_2^2 \times 4.43$$

$$\text{LIIC} = \text{DE}_1^2 / \text{DE}_2^2 \times 0.226$$

B. exactitud al 100 % y Linealidad del Método (porcentaje recuperado)

### Caso 1: Los métodos tienen la misma repetibilidad

#### 1. Información Requerida:

$\bar{R}_1$  = media aritmética del porcentaje recuperado del método 1

$\bar{R}_2$  = media aritmética del porcentaje recuperado del método 2

$N_1$  = Número de porcentajes recuperados del método 1

$N_2$  = Número de porcentajes recuperados del método 2

$DE_1$  = Desviación Estándar del porcentaje recuperado del método 1

$DE_2$  = Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 2

#### 2. Cálculos preliminares:

$$Dep = \sqrt{\frac{(N_1-1) DE_1^2 + (N_2-1) DE_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

#### 3. Cálculos finales

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado (LSIC).

$$LSIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) + t \times Dep \times \sqrt{(1/N_1) + (1/N_2)}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de la media aritméticas del porcentaje recuperado (LIIC)

$$LIIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) - t \times Dep \times \sqrt{(1/N_1) + (1/N_2)}$$

t= Valor de la t de la distribución t de Student con (N1 + N2 – 2) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Caso 2 .Los métodos no tienen la misma repetibilidad

1. Información Requerida

$\bar{R}_1$ = media aritmética del porcentaje recuperado del método 1

$\bar{R}_2$ = media aritmética del porcentaje recuperado del método 2

$N_1$  = Número de porcentajes recuperados del método 1

$N_2$  = Número de porcentajes recuperados del método 2

$DE_1$  = Desviación Estándar del porcentaje recuperado del método 1

$DE_2$  = Desviación estándar del porcentaje recuperado del método 2

2. Cálculos preliminares

$$gl = \frac{[DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2]^2}{\frac{[DE_1^2 / N_1]^2}{N_1 + 1} + \frac{[DE_2^2 / N_2]^2}{N_2 + 1}} - 2$$

3. Cálculos finales.

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado (LSIC)

$$LSIC = (R_1 - \bar{R}_2) + t \times \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2}$$



Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de la media aritméticas del porcentaje recuperado (LIIC)

$$LIIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) - t \times \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2}$$

t= Valor de la t de la distribución t de Student con gl grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

C. Linealidad del método (pendientes de la cantidad adicionada- cantidad recuperada)

1. Información Requerida ( Cuadro 18 )

**Cuadro 18** : Información requerida para tabular los resultados de la comparación de la linealidad de dos métodos analíticos

METODO 1	METODO 2
$\sum x_1$	$\sum x_2$
$\sum x_1^2$	$\sum x_2^2$
$\sum y_1$	$\sum y_2$
$\sum y_1^2$	$\sum y_2^2$
$\sum xy_1$	$\sum xy_2$
$m_1$	$m_2$
$b_1$	$b_2$
$t_1$	$t_2$
$n_1$	$n_2$

- El subíndice {indica la información requerida del método

## 2. Cálculos Preliminares

$$S_E^2 = \frac{[\sum y_1^2 - m_1 - \sum xy_1 - b_1 \sum y_1] + [\sum y_2^2 - m_2 - \sum xy_2 - b_2 \sum y_2]}{t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4}$$

a) Pendientes de la cantidad adicionada- cantidad recuperada

$$S_{dm}^2 = s_E^2 \times \left\{ 1 / \left[ \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 / n_1 t_1 \right] + 1 / \left[ \sum x_2^2 - (\sum x_2)^2 / n_2 t_2 \right] \right\}$$

## 3.-Cálculos Finales

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del por ciento recuperado (LSIC).

$$LSIC = (m_1 - m_2) + t \times (S_{dm}^2)^{1/2}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de la media aritméticas del por ciento recuperado (LIIC)

$$LIIC = (m_1 - m_2) - t \times (S_{dm}^2)^{1/2}$$

t= Valor de la t de la distribución t de Student con  $(t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

b) Ordenadas al origen de la cantidad adicionada- cantidad recuperada

$$S_{do}^2 = S_E^2 \times \left[ \frac{1}{n_1 t_1} + \frac{1}{n_2 t_2} + \frac{(\sum x_1)^2}{n_1^2 t_1^2 [\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 / n_1 t_1]} + \frac{(\sum x_2)^2}{n_2^2 t_2^2 [\sum x_2^2 - (\sum x_2)^2 / n_2 t_2]} \right]$$

1- Cálculos Finales.

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado (LSIC).

$$LSIC = (b_1 - b_2) + t \times (S_{do}^2)^{1/2}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado (LIIC)

$$LIIC = (b_1 - b_2) - t \times (S_{do}^2)^{1/2}$$

t= Valor de la t de la distribución de t de Student con  $(t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

t= Valor de la t de la distribución t de Student con (N1 + N2 - 2) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Caso 2 .Los métodos no tienen la misma repetibilidad

1. Información Requerida

$\bar{R}_1$ = media aritmética del porciento recuperado del método 1

$\bar{R}_2$ = media aritmética del porciento recuperado del método 2

$N_1$  = Número de porcintos recuperados del método 1

$N_2$  = Número de porcintos recuperados del método 2

$DE_1$  = Desviación Estándar del porciento recuperado del método 1

$DE_2$  = Desviación estándar del porciento recuperado del método 2

2. Cálculos preliminares

$$gl = \frac{[DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2]^2}{\frac{[DE_1^2 / N_1]^2}{N_1 + 1} + \frac{[DE_2^2 / N_2]^2}{N_2 + 1}} - 2$$

3. Cálculos finales.

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porciento recuperado (LSIC)

$$LSIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) + t \times \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de la media aritméticas del porcentaje recuperado (LIIC)

$$LIIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) - t \times \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2}$$

t= Valor de la t de la distribución t de Student con gl grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

C. Linealidad del método (pendientes de la cantidad adicionada- cantidad recuperada)

1. Información Requerida ( Cuadro 18 )

**Cuadro 18** : Información requerida para tabular los resultados de la comparación de la linealidad de dos métodos analíticos

METODO 1	METODO 2
$\Sigma x_1$	$\Sigma x_2$
$\Sigma x_1^2$	$\Sigma x_2^2$
$\Sigma y_1$	$\Sigma y_2$
$\Sigma y_1^2$	$\Sigma y_2^2$
$\Sigma xy_1$	$\Sigma xy_2$
$m_1$	$m_2$
$b_1$	$b_2$
$t_1$	$t_2$
$n_1$	$n_2$

- El subíndice {indica la información requerida del método

## 2. Cálculos Preliminares

$$S_E^2 = \frac{[\sum y_1^2 - m_1 - \sum xy_1 - b_1 \sum y_1] + [\sum y_2^2 - m_2 - \sum xy_2 - b_2 \sum y_2]}{t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4}$$

a) Pendientes de la cantidad adicionada- cantidad recuperada

$$S_{dm}^2 = s_E^2 \times \left\{ 1 / \left[ \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 / n_1 t_1 \right] + 1 / \left[ \sum x_2^2 - (\sum x_2)^2 / n_2 t_2 \right] \right\}$$

## 3.-Cálculos Finales

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del por ciento recuperado (LSIC).

$$LSIC = (m_1 - m_2) + t \times (S_{dm}^2)^{1/2}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de la media aritméticas del por ciento recuperado (LIIC)

$$LIIC = (m_1 - m_2) - t \times (S_{dm}^2)^{1/2}$$

t= Valor de la t de la distribución t de Student con  $(t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

b) Ordenadas al origen de la cantidad adicionada- cantidad recuperada

$$S_{do}^2 = S_E^2 \times \left[ \frac{1}{n_1 t_1} + \frac{1}{n_2 t_2} + \frac{(\sum x_1)^2}{n_1^2 t_1^2 [\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2 / n_1 t_1]} + \frac{(\sum x_2)^2}{n_2^2 t_2^2 [\sum x_2^2 - (\sum x_2)^2 / n_2 t_2]} \right]$$

1- Cálculos Finales.

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del por ciento recuperado (LSIC).

$$LSIC = (b_1 - b_2) + t \times (S_{do}^2)^{1/2}$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del por ciento recuperado (LIIC)

$$LIIC = (b_1 - b_2) - t \times (S_{do}^2)^{1/2}$$

t= Valor de la t de la distribución de t de Student con  $(t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

## V. RESULTADOS

A continuación se muestran los datos que nos permitieron evaluar los métodos empleados para cuantificar los componentes de la solución de hemodiálisis. Para facilitar su comprensión la mayoría de los resultados se presentan en tablas que muestran los datos y resumen los resultados de cada uno de los cálculos empleados. Para complementar se muestran las gráficas obtenidas de las pruebas de linealidad, ya que permiten apreciar los resultados de forma visual además de mostrar la ecuación de la línea recta junto con los resultados del análisis de regresión lineal.

Es importante señalar que para la mayoría de las pruebas estadísticas realizadas se hicieron con el número mínimo de análisis recomendado, solamente las pruebas que tuvieron más variación se hicieron con un número mayor de datos.

También es conveniente resaltar que para llegar a los resultados aquí mostrados fue necesario realizar experimentos previos con el propósito de identificar correctamente los puntos de equivalencia de cada reacción, así como estandarizar los detalles del método que permitieron adquirir la habilidad para realizarlos en forma consistente.

Los resultados de la calibración de los instrumentos no se incluyen en esta sección, por ser considerados como una parte de las operaciones previas mencionadas.

Para cada método (acetato de sodio medio acuoso, acetato de sodio medio no acuoso, calcio, cloruros, dextrosa y magnesio) se describirán por separado los resultados de la linealidad, exactitud y precisión del sistema de medición; y, luego la linealidad, exactitud, especificidad y precisión del método. Después se muestran los resultados de la comparación entre los dos métodos para la determinación del acetato de sodio. Finalmente se resumen todos los resultados de esta sección en el cuadro 64.



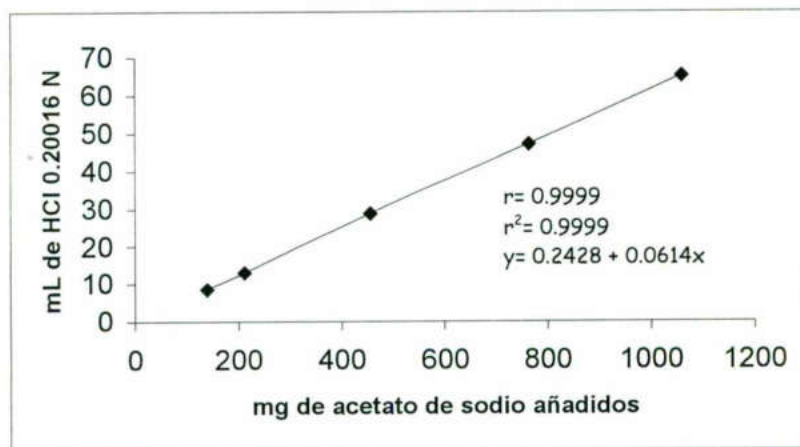
# 1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACETATO DE SODIO POR VOLUMETRÍA ÁCIDO-BASE EN MEDIO ACUOSO.

a. **Linealidad del sistema de medición.** Los resultados de la curva de calibración mg de acetato de sodio contra ml de HCl, en el rango de concentración estudiado realizándolas por duplicado se muestran en el cuadro 19. Con los 5 niveles de concentración estudiados se observó que el sistema de medición es lineal entre 100 a 1000 mg aproximadamente.

**Cuadro 19.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema de medición del acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso.

mg de Acetato de sodio (x)	ml HCl 0.20016 N		ml promedio de HCl (y)
139	8.45	8.55	8.50
211	12.9	13.1	13.0
455	28.1	27.9	28.0
764	47.0	47.0	47.0
1059	64.9	65.1	65.0

Los resultados de la regresión lineal del cuadro 19, muestran que en el rango de concentración seleccionado se observa un comportamiento lineal de las variables (figura 37).



**Figura 37.** Linealidad del sistema de medición de acetato de sodio en medio acuoso.

b. **Exactitud del sistema de medición.** A partir de los datos del cuadro 19, se obtuvieron los correspondientes mg y por cientos recuperados para cada nivel de concentración. En el cuadro 20 se observa que los resultados para la exactitud del sistema fueron excelentes, ya que el método recuperó el 100.85 % de acetato de sodio.

**Cuadro 20.** Datos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso.

Mg acetato de sodio añadidos (x)	mg acetato de sodio recuperados (y)	% recuperado (y/x) (100)
139	139.5	100.35
211	213.4	101.13
455	459.7	101.03
764	771.6	100.99
1059	1067.2	100.77
$\bar{R} = 100.85 \%$	$DE = 0.31$	$CV = 0.307\%$

c. **Precisión del sistema de medición.** La precisión del sistema de medición se determinó mediante el análisis por sextuplicado de la concentración correspondiente al 100 % de acetato de sodio (Cuadro 21).

**Cuadro 21.** Datos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría ácido-base en medio acuoso.

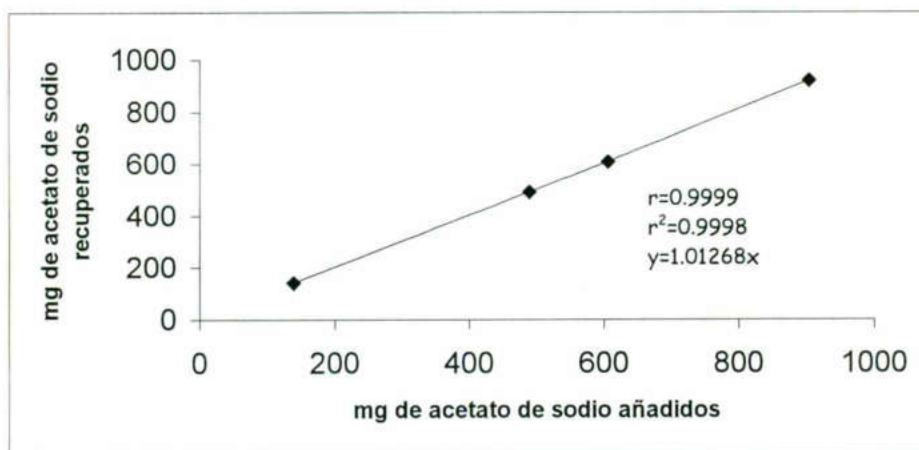
mg acetato de sodio	ml HCl 0.20016 N	RESULTADOS
455	28.2	$\bar{Y} = 28.01 \text{ ml}$ $DE = 0.116 \text{ ml}$ $CV = 0.42 \%$
455	28.0	
455	27.9	
455	28.0	
455	28.1	
455	27.9	

d. **Linealidad del método.** Para evaluar la linealidad del método se analizaron por triplicado alícuotas de la solución de hemodiálisis con cantidades conocidas de acetato de sodio para obtener 4 concentraciones (Cuadro 22) a partir de las cuales se hizo el análisis de regresión lineal y se graficaron los resultados (Figura 38).

**Cuadro 22.** Datos para determinar la linealidad del método de volumetría ácido-base en medio acuoso para cuantificar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

mg acetato de sodio adicionado (x)	mg acetato de sodio recuperados (y)			promedio mg acetato de sodio recuperados (y)
138.7	139.78	139.76	139.62	139.72
488.9	492.87	491.23	492.87	492.32
605.5	607.88	607.88	607.88	607.88
903.4	920.03	920.03	920.03	920.03

$\bar{R} = 100.92\%$   $DE = 0.58$   $CV = 0.58\%$



**Figura 38.** Linealidad del método de volumetría ácido-base en medio acuoso para la determinación de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis

e. **Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron nueve alícuotas de la solución de hemodiálisis y después de obtener el por ciento recuperado de cada muestra se observó que la exactitud del método cumple con los requisitos. La precisión en condiciones óptimas (repetibilidad) se determinó con los mismos datos y se tuvo un coeficiente de variación dentro de los límites esperados para esta prueba (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

mg acetato de sodio añadidos (x)	mg acetato de sodio recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
605.6	610.50	R <sub>1</sub> = 100.81
605.8	608.71	R <sub>2</sub> = 100.48
605.7	610.61	R <sub>3</sub> = 100.81
605.4	608.06	R <sub>4</sub> = 100.39
606.2	607.76	R <sub>5</sub> = 100.39
605.6	607.96	R <sub>6</sub> = 100.39
605.7	611.03	R <sub>7</sub> = 100.88
605.4	610.72	R <sub>8</sub> = 100.88
606.0	611.33	R <sub>9</sub> = 100.88
<b><math>\bar{R} = 100.66 \%</math>      <b>DE = 0.23</b>      <b>CV = 0.22 %</b></b>		

f. **Especificidad del método.** Tres muestras del placebo para acetato de sodio fueron sometidas al método analítico y se determinó que no consumieron HCl 0.20016 N, lo anterior significa que los componentes de la solución de hemodiálisis no interfieren en la determinación de acetato de sodio por el método de volumetría ácido-base en medio acuoso.

**g. Reproducibilidad del método.** Para evaluar la reproducibilidad del método se hizo un análisis de varianza con los resultados obtenidos en dos días por dos analistas (Cuadro 24 y 25).

**Cuadro 24.** Por cientos recuperados entre días y entre analistas para evaluar la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	99.83	98.60
		100.54	99.76
		100.15	97.45
	2	99.76	100.54
		98.60	97.45
		100.54	99.38
$\bar{R} = 99.38$		DE = 1.11	CV = 1.12 %

**Cuadro 25** . Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
<b>Analista (i)</b>	gla = 1	Sca=3.2448	Mca=3.2448	7.698	Fgla/gld = 38.51
<b>Día (j)</b>	gld =2	SCd=0.843	MCd=0.4215	0.3476	Fgld/gle = 6.06
<b>Error (ε)</b>	gle =8	Sce=9.699	Mce=1.2124	-----	-----

**F<sub>cal</sub> 7.698 < F<sub>Tablas</sub> 38.51** El método analítico es reproducible entre los analistas

**F<sub>cal</sub> 0.3476 < F<sub>Tablas</sub> 6.06** El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.

## 2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACETATO DE SODIO POR VOLUMETRÍA EN MEDIO NO ACUOSO.

- a. **Linealidad del sistema de medición.** De acuerdo a los métodos descritos se obtuvo una curva de calibración empleando 4 cantidades de acetato de sodio en un rango de concentración de 30–195 mg realizándolas por duplicado, los resultados se muestran en el cuadro 26. Los niveles de concentración se eligieron en base a que por arriba de 195 mg la respuesta ya no era lineal.

**Cuadro 26.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de determinación de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso.

mg de acetato de sodio (x)	mL ácido perclórico 0.1081 N		mL promedio (y)
30.1	3.4	3.3	3.35
75.3	8.4	8.5	8.45
120.6	13.5	13.3	13.4
195.9	22.3	22.4	22.35

Los resultados del análisis de regresión lineal de los datos del cuadro 26, muestran en la figura 39. Como se puede corroborar se obtuvo una línea recta que pasa muy cercana al origen con una pendiente de 0.11443, la ecuación que define la recta se indica en la misma figura.

- b. **Exactitud del sistema de medición.** Los datos del cuadro 26 se utilizaron para calcular los mg recuperados para cada concentración y sus respectivos por cientos recuperados (recobros). Los resultados se muestran en el cuadro 27, y como se puede apreciar el método cumple satisfactoriamente con las recomendaciones para esta prueba.

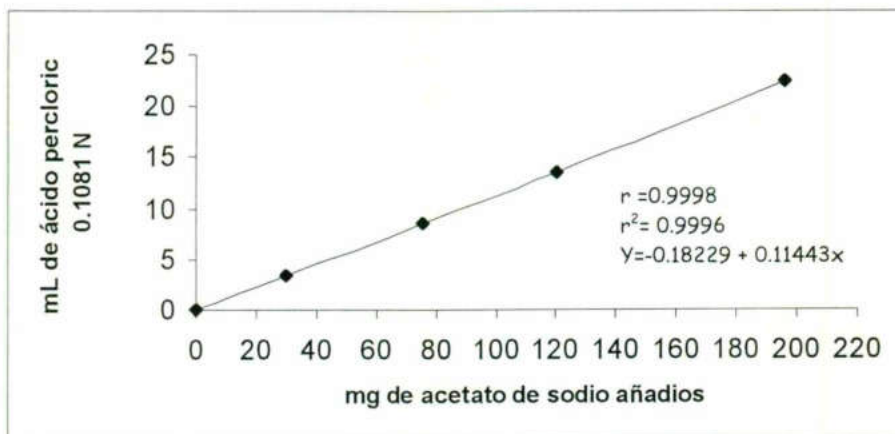


Figura 39. Linealidad del sistema de medición de acetato de sodio en medio no acuoso.

Cuadro 27. Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición del método de acetato de sodio en medio no acuoso.

mg acetato de sodio añadidos (x)	mg acetato de sodio recuperados (y)	% recuperado (y/x) (100)
30.1	29.71	98.69
75.3	74.93	99.51
120.6	118.82	98.52
195.9	198.19	101.17
$\bar{R} = 99.47 \%$	$DE = 1.21$	$CV = 1.21 \%$

c. **Precisión del sistema de medición.** La precisión del sistema se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una sola concentración de acetato de sodio, los resultados se muestran en el cuadro 28.



**Cuadro 28.** Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso.

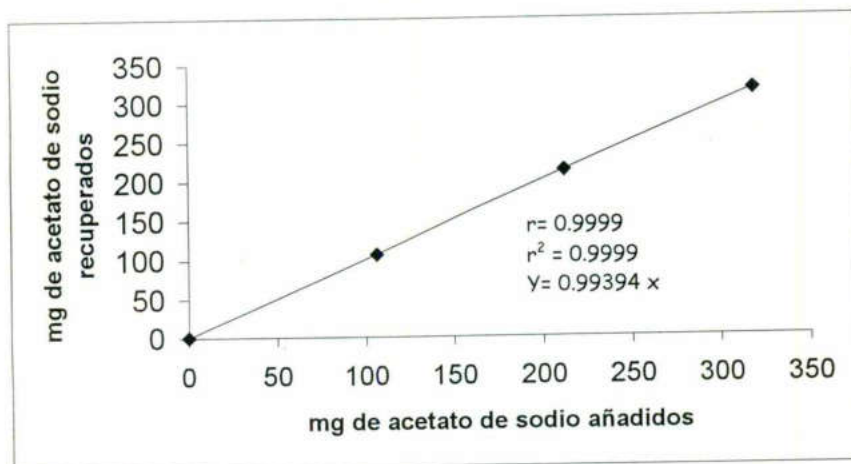
mg de acetato de sodio	mL de ácido perclórico 0.1081 N	RESULTADOS
120.6	13.5	$\bar{Y} = 13.37 \text{ mL}$ <b>DE = 0.0816 mL</b> <b>CV = 0.611 %</b>
120.6	13.3	
120.6	13.4	
120.6	13.3	
120.6	13.3	
120.6	13.4	

**d. Linealidad del método.** Para determinar la linealidad del método se analizaron por triplicado alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de cantidades conocidas de acetato de sodio para obtener 3 concentraciones diferentes. En el cuadro 29, se muestran los datos obtenidos los cuales se utilizaron para determinar el análisis de regresión lineal.

**Cuadro 29.** Observaciones para determinar la linealidad del método de análisis de acetato de sodio por volumetría en medio no acuoso.

mg acetato de sodio adicionados (x)	mg acetato de sodio recuperados (y)			promedio mg de acetato de sodio recuperados (y)
106.22	106.64	107.46	106.64	106.91
212.14	212.45	211.63	212.45	212.18
318.66	313.35	315.81	317.04	315.4
<b>R= 99.88 DE= 0.823 CV= 0.82 %</b>				

En la figura 40 se muestra la gráfica obtenida con los datos del cuadro 29 y de acuerdo a los resultados del análisis de regresión lineal, vemos que tienen un ajuste perfecto a una línea recta con una pendiente de 0.99394.



**Figura 40.** Linealidad del método para la determinación de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

**e. Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron nueve alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de la cantidad de acetato de sodio que corresponden al 100 % de dosis. Después de obtener el por ciento recuperado para cada análisis se observó que la exactitud del método cumple con los requisitos de recuperar más del 97 %. A partir de estos datos también se determinó la precisión en condiciones óptimas (repetibilidad o variación intraensayo) y se tuvo un coeficiente de variación dentro de los límites recomendados para esta prueba (Cuadro 30).

Cuadro 30. Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

mg acetato de sodio añadido (x)	mg acetato de sodio recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
212.14	212.45	R <sub>1</sub> = 100.40
212.14	211.63	R <sub>2</sub> = 101.17
212.14	212.45	R <sub>3</sub> = 100.40
212.14	212.14	R <sub>4</sub> = 100.00
212.14	211.31	R <sub>5</sub> = 99.61
212.14	212.14	R <sub>6</sub> = 100.00
212.14	212.14	R <sub>7</sub> = 100.00
212.14	210.23	R <sub>8</sub> = 99.10
212.14	211.06	R <sub>9</sub> = 99.49
$\bar{R} = 100.02 \%$		$DE = 0.60$
		$CV = 0.60\%$

- f. **Especificidad del método.** Las muestras de placebo fueron sometidas al método analítico y se determinó que consumieron el equivalente al blanco de reactivos del método y dicho valor en mL se resta del total de cada muestra, lo anterior significa que los componentes de la solución de hemodiálisis no interfieren en la determinación de acetato de sodio en su valoración con ácido perclórico.
- g. **Reproducibilidad del método.** Los datos para evaluar la reproducibilidad del método fueron obtenidos de acuerdo a los protocolos señalados en la sección de métodos y se resumen en el cuadro 31. Con los datos del por ciento recuperado de este cuadro se calculo el CV total que nos indica la variabilidad del método. Sin embargo para establecer la fuente de variación, estos datos también se sometieron a un análisis de varianza y como se puede observar en los resultados, el método para la valoración de acetato de sodio en una solución de hemodiálisis es reproducible entre días y entre analistas (Cuadro 32).

**Cuadro 31.** Por cientos recuperados entre días y entre analistas para evaluar la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

		ANALISTA ( i )	
		1	2
DIA ( J )	1	99.83	98.60
		100.54	99.76
		100.15	97.45
	2	99.76	100.54
		98.60	97.45
		100.54	99.38
<b>R=99.95</b>		<b>DE=0.94</b>	<b>CV=0.94</b>

**Cuadro 32.** Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar acetato de sodio en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
Analista(i)	gla = 1	Sca= 3.2448	Mca=3.2448	7.6982	Fgla/gld = 38.51
Día (j)	Gld =2	Scd= 0.843	Mcd= 0.4215	0.3477	Fgld/gle = 6.06
Error (ε)	Gle =8	Sce= 9.6996	Mce= 1.2125	-----	-----

$F_{cal} 7.6982 < F_{Tablas} 38.51$  El método analítico es reproducible entre los analistas

$F_{cal} 0.3477 < F_{Tablas} 6.06$  El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.

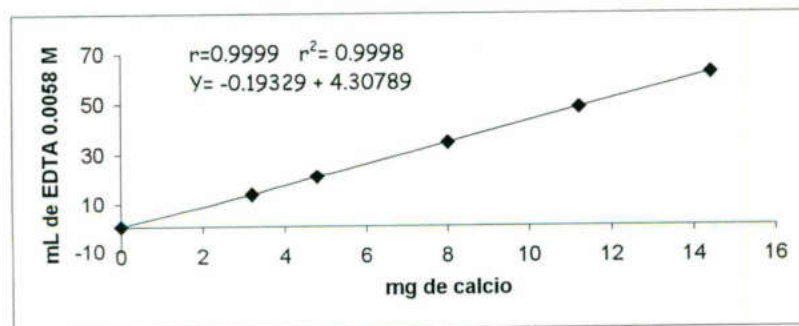
### 3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO.

a. **Linealidad del sistema de medición.** Los resultados de la curva de calibración empleando 5 cantidades de cloruro de calcio equivalentes a un rango de concentración de 3.2-14.4 mg de calcio realizándolas por duplicado se muestran en el cuadro 33.

**Cuadro 33.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de calcio.

mg de Calcio (x)	ml de EDTA 0.0058 M		ml promedio (y)
3.2064	13.5	13.6	13.55
4.8096	20.5	20.7	20.6
8.016	34.4	34.3	34.35
11.2224	48.2	48.1	48.15
14.4288	61.9	62.0	61.95

Los resultados del análisis de regresión lineal de los datos del cuadro 6, muestran que en el rango de concentración seleccionado se observa un comportamiento lineal de las variables (figura 41). Como se puede corroborar se obtuvo una línea recta que pasa muy cercana al origen y la pendiente fue de 4.30789, la ecuación que define la recta se indica en la misma figura.



**Figura 41.** Linealidad del sistema de medición de calcio.

**b. Exactitud del sistema de medición.** A partir de los datos del cuadro 33, se obtuvieron los mg recuperados para cada concentración y sus respectivos por cientos recuperados. En el cuadro 34 se observa que los resultados para la exactitud fueron aceptables con un por ciento recuperado mayor de 98 %.

**Cuadro 34.** Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema.

mg calcio añadidos (x)	mg calcio recuperados (y)	% recuperado (y/x) (100)
3.2064	3.1436	98.04
4.8096	4.7792	99.34
8.016	7.9692	99.42
11.2224	11.1708	99.53
14.4288	14.3724	99.61
$\bar{R} = 99.188 \%$	$DE = 0.65$	$CV = 0.655 \%$

**c. Precisión del sistema de medición.** En el cuadro 35 se muestran los resultados de la precisión del sistema el cual se determinó mediante el análisis por sextuplicado de la concentración de calcio correspondiente al 100 %.

**Cuadro 35.** Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de calcio.

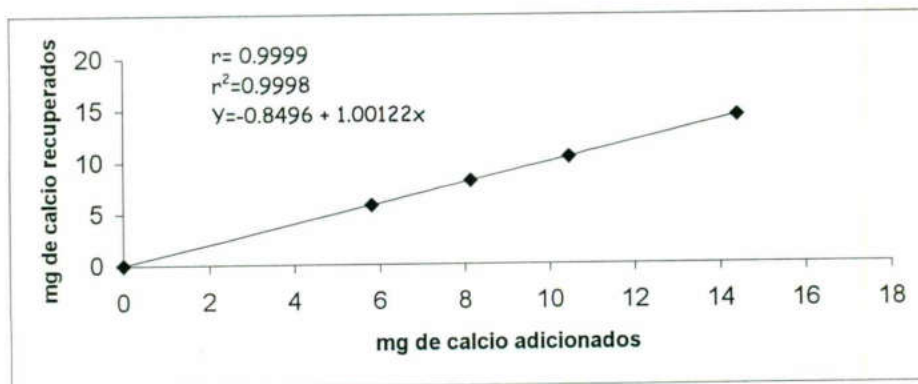
Mg de Calcio	mL de EDTA 0.0058 M	RESULTADOS
8.016	34.4	$\bar{Y} = 34.283 \text{ mL}$ $DE = 0.0752 \text{ mL}$ $CV = 0.196 \%$
8.016	34.2	
8.016	34.3	
8.016	34.2	
8.016	34.3	
8.016	34.3	

**d. Linealidad del método.** Para determinar la linealidad del método se analizaron por triplicado alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de cantidades conocidas de calcio para obtener 4 concentraciones diferentes. En el cuadro 36, se muestran los datos obtenidos los cuales se utilizaron para determinar su ajuste a una ecuación lineal mediante el análisis de regresión lineal.

**Cuadro 36.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de calcio.

mg calcio adicionado (x)	mg calcio recuperados (y)			promedio mg calcio recuperados (y)
5.8051	5.7186	5.7419	5.7186	5.7264
8.127	8.0433	8.0665	8.0665	8.0587
10.449	10.3679	10.3679	10.3679	10.3679
14.389	14.3359	14.3161	14.3217	14.3246
$\bar{R} = 99.15\%$ $DE = 0.36$ $CV = 0.37\%$				

En la figura 42 se muestra la gráfica obtenida con los datos del cuadro 36 y resultado del análisis de regresión lineal.



**Figura 42.** Linealidad del método para la determinación de calcio en una solución de hemodiálisis.

e. **Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron nueve alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de la cantidad de calcio que corresponde al 100 %. Después de obtener el por ciento recuperado para cada análisis se observó que la exactitud del método cumple con los requisitos de recuperar más del 97 %. A partir de estos datos también se determinó la precisión en condiciones óptimas (repetibilidad) y se tuvo un coeficiente de variación dentro de los límites esperados para esta prueba (Cuadro 37).

**Cuadro 37.** Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de calcio en una solución de hemodiálisis.

mg calcio añadidos (x)	mg calcio recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
8.1465	8.0251	R <sub>1</sub> = 98.51
8.1465	8.0577	R <sub>2</sub> = 98.91
8.1465	8.0251	R <sub>3</sub> = 98.51
8.1465	8.0626	R <sub>4</sub> = 98.97
8.1465	8.0862	R <sub>5</sub> = 99.26
8.1465	8.0862	R <sub>6</sub> = 99.26
8.1465	8.0829	R <sub>7</sub> = 99.22
8.1465	8.0829	R <sub>8</sub> = 99.22
8.1465	8.0829	R <sub>9</sub> = 99.22
$\bar{R} = 99.009 \%$ $DE = 0.31$ $CV = 0.31 \%$		

f. **Especificidad del método.** Las muestras de placebo para calcio fueron sometidas al método analítico y se encontró que no consumieron EDTA 0.0058 M.

g. **Reproducibilidad del método.** Los datos para evaluar la reproducibilidad del método se resumen en el cuadro 38. Con los datos del por ciento recuperado de este cuadro se calculó el CV total y se hizo un análisis de varianza. (Cuadro 39).



Cuadro 38. Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar calcio en una solución de hemodiálisis.

		ANALISTA ( i )	
		1	2
DIA ( j )	1	100.11	100.69
		100.11	100.40
		99.83	100.11
	2	100.11	100.40
		100.11	100.69
		100.40	100.40
<b>R= 100.28 % DE= 0.26 CV= 0.26 %</b>			

Cuadro 39. Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar calcio en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
Analista (i)	gla = 1	Sca = 0.34	Mca = 0.34	10	Fgla/gld = 38.51
Día (j)	gld = 2	SCd = 0.068	MCd = 0.034	0.8173	Fgld/gle = 6.06
Error (ε)	gle = 8	Sce = 0.333	Mce = 0.041	-----	-----

$F_{cal} 10 < F_{Tablas} 38.51$  El método analítico es reproducible entre los analistas

$F_{cal} 0.8173 < F_{Tablas} 6.06$  El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.

#### 4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE CLORUROS.

a. **Linealidad del sistema de medición.** Los cloruros provienen del cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de sodio. Así, la validación del método fue para la determinación de cloruros totales. Como se describe en los métodos primero se estudió al cloruro de sodio como materia prima y después se analizaron los cloruros en la solución de hemodiálisis. En el caso de la linealidad del sistema de medición se construyó una curva de calibración empleando 4 cantidades de cloruro de sodio equivalentes a un rango de concentración de 18.2-72.8 mg de cloruros realizándolas por duplicado, los resultados de estos análisis se muestran en el cuadro 40. En el caso de la curva de calibración de cloruros el rango de concentración estudiado fue asignado de acuerdo a la disponibilidad del reactivo titulante (nitrato de plata).

**Cuadro 40.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema de medición de cloruros.

<b>mg de Cloruros (x)</b>	<b>ml de nitrato de plata 0.10206 N</b>		<b>ml promedio (y)</b>
18.2	4.9	5.2	5.05
36.4	10.3	10.4	10.35
54.6	15.5	15.3	15.4
72.8	20.4	21.0	20.7

En la figura 43 se muestra la gráfica resultante del análisis de regresión lineal de los datos del cuadro 40.

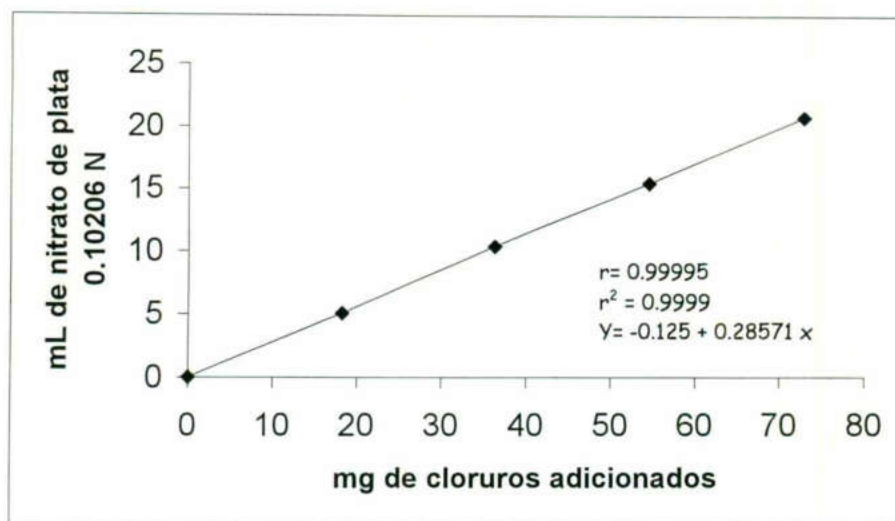


Figura 43. Linealidad del sistema de medición de cloruros

b. **Exactitud del sistema de medición.** A partir de los datos del cuadro 40, obtuvieron los mg y los por cientos recuperados para cada punto. En el cuadro 41 se observa que los resultados para la exactitud del sistema fueron satisfactorios.

Cuadro 41. Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de cloruros.

mg cloruros añadidos (x)	mg cloruros recuperados (y)	% recuperado (y/x) (100)
18.2	18.27	100.38
36.4	37.45	102.88
54.6	55.68	101.99
72.8	74.89	102.89
$\bar{R} = 102.04 \%$	$DE = 1.18$	$CV = 1.16 \%$

c. **Precisión del sistema de medición.** Después del análisis por sextuplicado de una sola concentración de cloruros (correspondiente al 100 %), se obtuvieron los siguientes resultados (Cuadro 42).

**Cuadro 42.** Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de cloruros.

mg de Cloruros	ml de nitrato de plata 0.10206 N	RESULTADOS
54.6	15.3	$\bar{Y} = 15.47$ mL
54.6	15.6	
54.6	15.4	
54.6	15.5	
54.6	15.8	
54.6	15.2	
		DE = 0.216 mL
		CV = 1.39 %

d. **Linealidad del método.** Para determinar la linealidad del método se analizaron por triplicado alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de cantidades conocidas de cloruros para obtener 4 concentraciones diferentes (Cuadro 43).

**Cuadro 43.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del método del análisis de cloruros.

mg cloruros adicionado (x)	mg cloruros recuperados (y)			promedio mg cloruros recuperados (y)
18.3	18.31	18.45	18.35	18.37
31.6	32.20	31.84	32.20	32.08
63.1	64.04	63.32	63.68	63.68
107.3	106.07	106.74	107.10	106.63
<b>R= 100.33% DE= 1.01 CV= 1.01%</b>				

En la figura 44 se muestra la gráfica obtenida con los datos del cuadro 43.

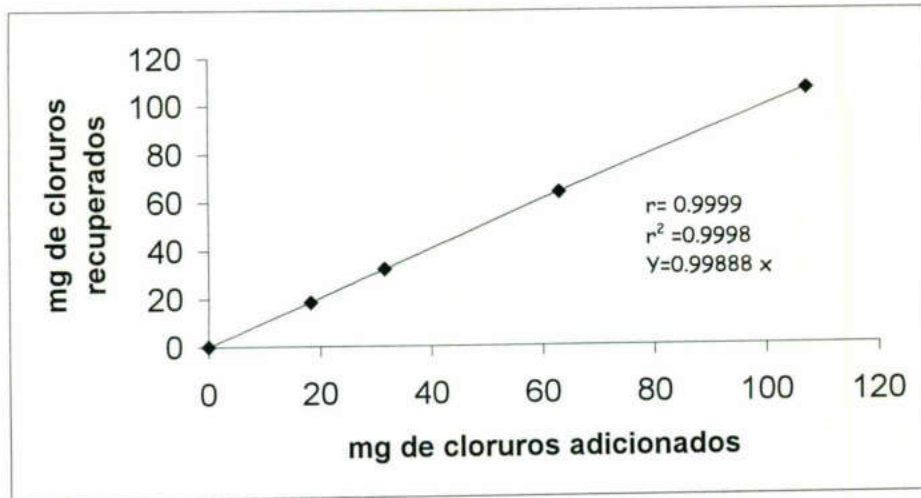


Figura 44. Linealidad del método para la determinación de cloruros en una solución de hemodiálisis.

- e. **Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron nueve alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de la cantidad de cloruros correspondiente al 100 %. Después de obtener el por ciento recuperado para cada análisis se observó que la exactitud del método cumple con los requisitos de aceptación para esta prueba. A partir de estos datos también se determinó la precisión en condiciones óptimas (repetibilidad) y se tuvo un coeficiente de variación dentro de los límites esperados para esta prueba (Cuadro 44).

**Cuadro 44.** Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de cloruros en una solución de hemodiálisis.

mg cloruros añadidos (x)	mg cloruros recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
54.6	55.68	R <sub>1</sub> = 101.99
54.5	54.96	R <sub>2</sub> = 100.85
54.3	55.38	R <sub>3</sub> = 101.99
54.7	55.48	R <sub>4</sub> = 101.43
54.6	54.75	R <sub>5</sub> = 100.28
54.4	54.86	R <sub>6</sub> = 100.85
54.5	53.86	R <sub>7</sub> = 98.82
54.8	54.49	R <sub>8</sub> = 99.44
54.6	54.48	R <sub>9</sub> = 99.78
$\bar{R} = 100.60$	DE = 1.1162	CV = 1.11 %

**f. Especificidad del método.** Las muestras del placebo para cloruros fueron sometidas al método analítico y se determinó que no consumieron nitrato de plata 0.10206 N, por lo que podemos decir que los demás componentes de la solución de hemodiálisis no interfieren en la determinación de cloruros.

**g. Reproducibilidad del método.** Los datos para evaluar la reproducibilidad del método fueron obtenidos de acuerdo a los protocolos señalados en la sección de métodos y se resumen en el cuadro 45. con los datos del por ciento recuperado de esta Cuadro se puede calcular un CV total que nos indicaría la variabilidad del método en condiciones de rutina o variabilidad Inter-ensayo, sin embargo con estos datos se hizo un análisis de varianza con lo cual como ya se ha mencionado tiene como finalidad determinar la fuente de variación. Como se puede observar en los resultados, el método para la valoración de cloruros en la solución de hemodiálisis fue reproducible entre días y entre analistas (Cuadro 46).

**Cuadro 45.** Resultados de la reproducibilidad del método para determinar cloruros en una solución de hemodiálisis.

DIA (j)		ANALISTA (i)	
		1	2
1		103.72	99.14
		106.01	100.85
		104.02	100.28
2		104.29	99.14
		105.44	101.42
		104.87	100.28
R= 102.46% DE= 2.52 CV= 2.52%			

**Cuadro 46.** Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar cloruros en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
Analista (i)	gla = 1	Sca= 0.8348	Mca=0.8348	9.55	Fgla/gld = 38.51
Día (j)	gld = 2	SCd= 0.1747	MCd=0.0874	0.088	Fgld/gle = 6.06
Error (ε)	gle = 8	Sce=7.8747	Mce=0.9843	-----	

$F_{cal} 9.55 < F_{Tablas} 38.51$  El método analítico es reproducible entre los analistas

$F_{cal} 0.088 < F_{Tablas} 6.06$  El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.

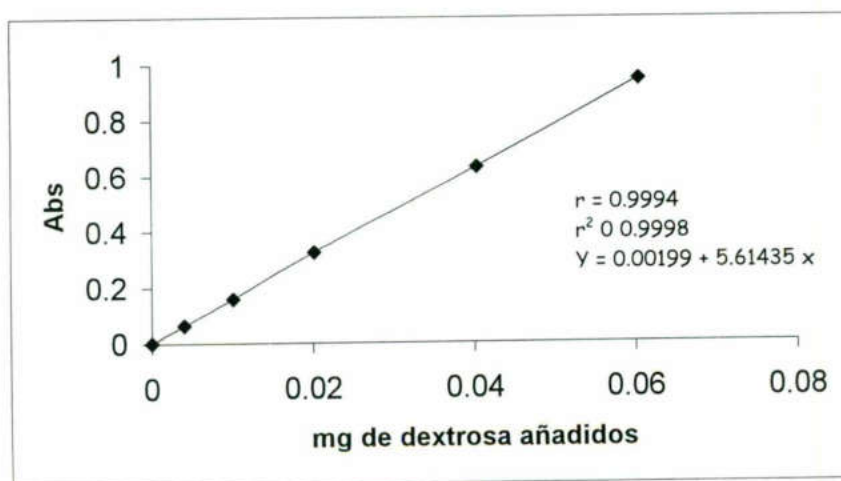
## 5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEXTROSA.

a. **Linealidad del sistema de medición.** En el cuadro 47 se muestran los resultados de la curva de calibración en un rango de concentración de 4 – 60 µg de dextrosa realizándolas por duplicado.

**Cuadro 47.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de dextrosa.

mg de dextrosa (x)	Absorbancia		Absorbancia promedio (y)
0.004032	0.063	0.063	0.063
0.01008	0.156	0.158	0.157
0.02016	0.322	0.325	0.3235
0.04032	0.629	0.630	0.6295
0.06048	0.945	0.947	0.946

La figura 45 muestra los resultados del análisis de regresión lineal de los datos anteriores.



**Figura 45:** Linealidad del sistema de medición de dextrosa.



b. **Exactitud del sistema de medición.** Con los datos del cuadro 47, se calcularon los mg y los respectivos por cientos recuperados para cada nivel concentración. En el cuadro 48 se muestran los estos resultados.

**Cuadro 48.** Datos obtenidos para la determinación de la exactitud del sistema de medición de calcio.

mg dextrosa añadidos (x)	mg dextrosa recuperados (y)	% recuperado (y/x) (100)
0.004032	0.00394	97.66
0.01008	0.0098	97.22
0.02016	0.02022	100.29
0.04032	0.0393	97.58
0.06048	0.05912	97.76
$\bar{R} = 98.10 \%$	$DE = 1.23$	$CV = 1.26 \%$

c. **Precisión del sistema de medición.** Para determinar la precisión del sistema se midió por sextuplicado una sola concentración de dextrosa (Cuadro 49).

**Cuadro 49.** Datos obtenidos para determinar la precisión del sistema de medición de dextrosa.

Mg de Dextrosa	Absorbencia	RESULTADOS
0.02016	0.322	$\bar{Y} = 0.3238$
0.02016	0.325	
0.02016	0.328	
0.02016	0.322	
0.02016	0.322	
0.02016	0.324	
		$DE = 0.0024$
		$CV = 0.74 \%$

d. **Linealidad del método.** Se analizaron por triplicado alícuotas de la solución de hemodiálisis para obtener cuatro niveles de concentración y con estos resultados se determinó la linealidad (Cuadro 50).

Cuadro 50. Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de dextrosa.

mg dextrosa adicionados (x)	mg dextrosa recuperados (y)			promedio mg dextrosa recuperados (y)
0.0039	0.003875	0.003875	0.0040	0.0039
0.0097	0.009687	0.009687	0.00993	0.0098
0.0195	0.01968	0.020	0.0201	0.0199
0.0585	0.05938	0.06013	0.060	0.0598
<b>R= 101.40 % DE= 1.44 CV= 1.44 %</b>				

La figura 46 muestra la gráfica obtenida (mg adicionados contra mg añadidos de dextrosa).

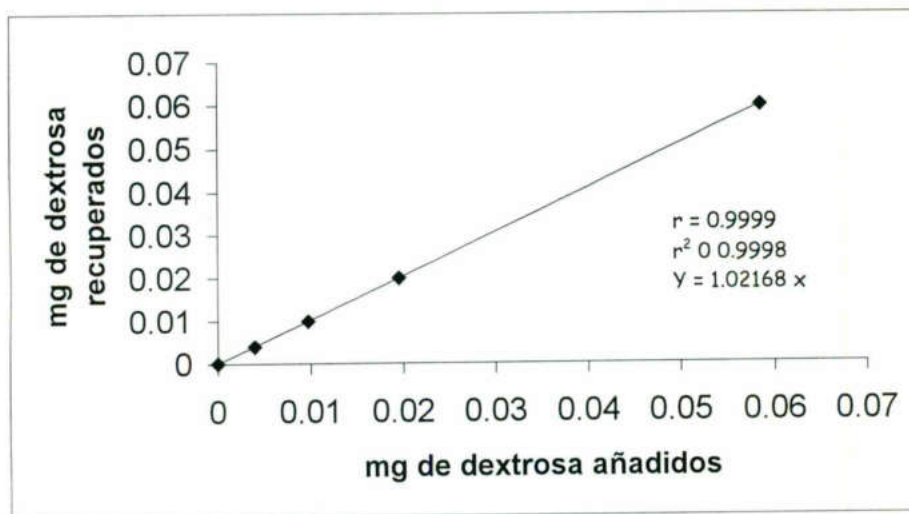


Figura 46. Linealidad del método para la determinación de dextrosa en una solución de hemodiálisis.

e. **Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron doce alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de la cantidad de dextrosa correspondiente al 100 % (Cuadro 51).

**Cuadro 51.** Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de dextrosa en una solución de hemodiálisis.

mg dextrosa añadidos (x)	mg dextrosa recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
0.0195	0.0194	R <sub>1</sub> = 99.36
0.0195	0.0194	R <sub>2</sub> = 99.36
0.0195	0.0199	R <sub>3</sub> = 102.56
0.0195	0.0194	R <sub>4</sub> = 99.87
0.0195	0.0194	R <sub>5</sub> = 99.87
0.0195	0.0199	R <sub>6</sub> = 102.37
0.0195	0.0197	R <sub>7</sub> = 100.92
0.0195	0.0199	R <sub>8</sub> = 102.56
0.0195	0.0200	R <sub>9</sub> = 103.07
0.0195	0.0198	R <sub>10</sub> = 101.50
0.0195	0.0200	R <sub>11</sub> = 102.79
0.0195	0.0199	R <sub>12</sub> = 102.56
<b>R = 101.40</b>	<b>DE = 1.44</b>	<b>CV = 1.42 %</b>

f. **Especificidad del método.** El placebo de dextrosa se preparó para su análisis espectrofotométrico y los resultados mostraron que no hubo ninguna absorbencia a 505 nm.

g. **Reproducibilidad del método.** En el cuadro 52 se resumen los datos que se utilizaron para calcular la reproducibilidad del método. Con los datos de los porcentajes recuperados se calculó CV total. La Cuadro 53 muestra los resultados del análisis de varianza respectivo.

**Cuadro 52.** Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar dextrosa en una solución de hemodiálisis.

		ANALISTA ( i )	
		1	2
DIA ( j )	1	97.76	97.44
		100.96	102.56
		104.16	100.96
	2	106.41	102.56
		103.2	103.84
		104.8	103.53
R= 102.35 % DE= 2.68 CV= 2.68 %			

**Cuadro 53.** Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar dextrosa en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
Analista (i)	gla = 1	Sca=3.4133	Mca=3.4133	0.1919	Fgla/gld = 38.51
Día (j)	gld =2	Scd=35.5670	MCd=17.7835	3.5350	Fgld/gle = 6.06
Error (ε)	gle =8	Sce=40.2455	Mce= 5.0306	-----	-----

**F<sub>cal</sub> 0.1919 < F<sub>Tablas</sub> 38.51** El método analítico es reproducible entre los analistas

**F<sub>cal</sub> 3.5350 < F<sub>Tablas</sub> 6.06** El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.

## 6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE MAGNESIO.

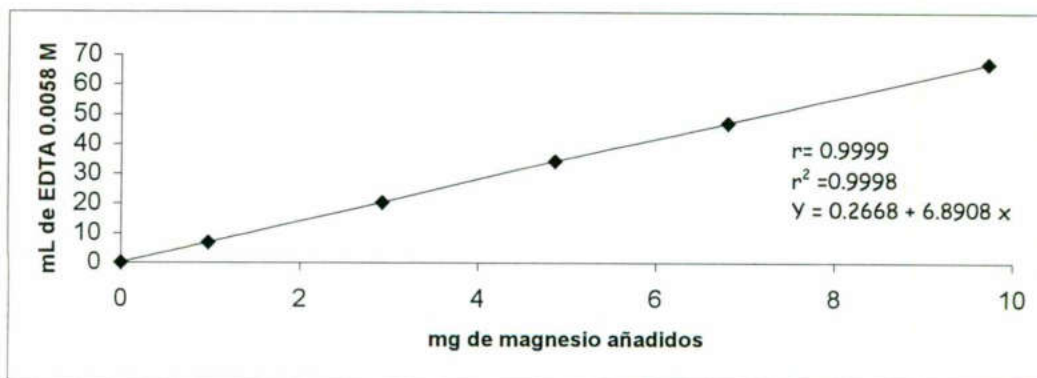
a. **Linealidad del sistema de medición.** En el cuadro 54 se muestran los resultados de la curva de calibración en un rango de concentración de 3.2-14.4 mg de magnesio realizándolas por duplicado.

**Cuadro 54.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema del método de magnesio.

mg de magnesio (x)	ml de EDTA 0.0058 M		ml promedio (y)
0.9724	6.80	6.80	6.80
2.9172	20.3	20.4	20.35
4.8620	34.4	34.0	34.2
6.8068	47.0	47.0	47.0
9.7240	67.2	67.2	67.2

En la figura 47 se muestran los resultados del análisis de regresión lineal de los datos anteriores.

b. **Exactitud del sistema de medición.** A partir de los datos del cuadro 54, se obtuvieron los mg y los respectivos por cientos recuperados. En el cuadro 55 se muestran los resultados para obtener la exactitud del sistema.



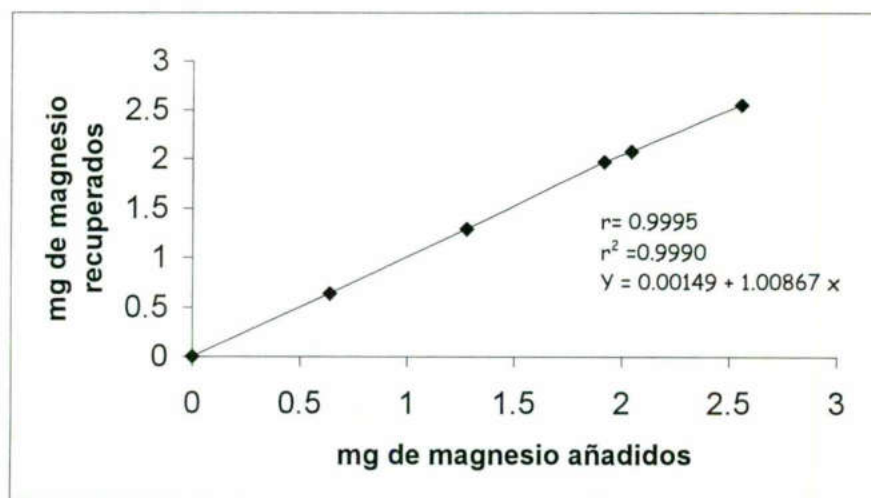
**Figura 47.** linealidad del sistema de medición de magnesio.

**Cuadro 57.** Datos obtenidos para determinar la linealidad del método de análisis de magnesio.

mg magnesio adicionado (x)	mg magnesio recuperados (y)			promedio mg magnesio recuperados (y)
0.6386	0.6345	0.6345	0.6345	0.6345
1.2772	1.2832	1.2691	1.2973	1.2861
1.9158	1.9695	1.9542	1.9860	1.9669
2.0440	2.0728	2.0728	2.0728	2.0728
2.5544	2.5241	2.5241	2.5664	2.5502

**R= 100.69 % DE= 1.5 CV = 1.5%**

En la figura 48 se muestra la gráfica mg adicionados vs mg añadidos de magnesio y de acuerdo a los resultados del análisis de regresión lineal, vemos que los datos tienen un ajuste perfecto a una línea recta.



**Figura 48.** Linealidad del método para la determinación de magnesio en una solución de hemodiálisis.

- e. Exactitud y Repetibilidad al 100 %.** Para esta prueba se analizaron doce alícuotas de la solución de hemodiálisis adicionadas de la cantidad de magnesio correspondiente al 100 % (Cuadro 58).

**Cuadro 58.** Datos para determinar la exactitud y repetibilidad del método de valoración de magnesio en una solución de hemodiálisis.

mg magnesio añadidos (x)	mg magnesio recuperados (x)	% recuperado ( R ) (y/x)
1.9158	1.9035	R <sub>1</sub> = 99.36
1.9158	1.9035	R <sub>2</sub> = 99.36
1.9158	1.9035	R <sub>3</sub> = 99.36
1.9158	1.9248	R <sub>4</sub> = 100.47
1.9158	1.9037	R <sub>5</sub> = 99.37
1.9158	1.9458	R <sub>6</sub> = 101.57
1.9158	1.9600	R <sub>7</sub> = 102.31
1.9158	1.9600	R <sub>8</sub> = 102.31
1.9158	1.9740	R <sub>9</sub> = 103.04
1.9158	1.9428	R <sub>10</sub> = 101.41
1.9158	1.9428	R <sub>11</sub> = 101.41
1.9158	1.9428	R <sub>12</sub> = 101.41
$\bar{R} = 100.95 \%$		$DE = 1.32$
		$CV = 1.31 \%$

f. **Especificidad del método.** El placebo de magnesio se valoró con EDTA 0.0058 M y se determinó el calcio y este dato se utilizó como blanco de reactivos.

g. **Reproducibilidad del método.** En el cuadro 59 se muestran los datos que se utilizaron para evaluar la reproducibilidad del método. Con los datos del por ciento recuperado de esta Cuadro se calculó CV total. La Cuadro 60 nos muestra los resultados del análisis de varianza que identificó las fuentes de variación del método respecto a días y analistas.

**Cuadro 59.** Datos para evaluar la reproducibilidad del método para determinar magnesio en una solución de hemodiálisis.

DIA ( j )		ANALISTA ( i )	
		1	2
1		101.41	99.96
		99.96	99.96
		99.96	99.28
2		99.96	99.28
		100.65	99.96
		99.96	100.65
<b>R= 100.08 % DE= 0.58 CV= 0.58 %</b>			

**Cuadro 60.** Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método para determinar magnesio en una solución de hemodiálisis.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub> *
Analista (i)	gla = 1	Sca=0.6580	Mca=0.6580	7.49	Fgla/gld = 38.51
Día (j)	gld =2	Scd=0.1756	MCd=0.0878	0.2368	Fgld/gle = 6.06
Error (ε)	gle =8	Sce=2.9658	Mce=0.3707	-----	-----

**F<sub>cal</sub> 7.49 < F<sub>Tablas</sub> 38.51** El método analítico es reproducible entre los analistas  
**F<sub>cal</sub> 0.2368 < F<sub>Tablas</sub> 6.06** El método analítico es reproducible entre distintos días por un mismo analista.



## 7. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

### a. Comparación de la repetibilidad de los métodos

Para determinar si los métodos para la valoración del acetato de sodio tenían la misma repetibilidad se determinó una prueba de F con las varianzas de los porcentos recuperados obtenidas durante las pruebas de exactitud, linealidad y precisión de los respectivos métodos (Cuadro 61).

**Cuadro 61.** Datos requeridos para la determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma repetibilidad.

	<b>Método1</b>	<b>Método 2</b>
	<b>Valoración medio acuoso</b>	<b>Valoración en medio no acuoso</b>
<b>Exactitud</b>	DE1 <sup>2</sup> = 0.05290	DE2 <sup>2</sup> = 0.36
<b>Número % recuperados</b>	N1 = 9	N2 = 9
<b>Linealidad método</b>	DE1 <sup>2</sup> = 0.3364	DE2 <sup>2</sup> = 0.6855
<b>Número % recuperados</b>	N1 = 12	N2 = 9
<b>Precisión</b>	DE1 <sup>2</sup> = 1.2321	DE2 <sup>2</sup> = 0.8836
<b>Número % recuperados</b>	N1 = 12	N2 = 12

Los resultados de la razón de varianzas mostraron que los métodos no tienen la misma repetibilidad ya que en el intervalo de confianza obtenido no se encontró el valor de 1 para ninguno de los casos.

Para probar la repetibilidad con los datos de las varianzas obtenidas en la prueba de exactitud de los métodos tenemos:

$$F(8,8) = 4.43 \text{ con } 0.975 \text{ confianza}$$

## 7. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

### a. Comparación de la repetibilidad de los métodos

Para determinar si los métodos para la valoración del acetato de sodio tenían la misma repetibilidad se determinó una prueba de F con las varianzas de los porcentos recuperados obtenidas durante las pruebas de exactitud, linealidad y precisión de los respectivos métodos (Cuadro 61).

**Cuadro 61.** Datos requeridos para la determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma repetibilidad.

	Método1	Método 2
	Valoración medio acuoso	Valoración en medio no acuoso
<b>Exactitud</b> Número % recuperados	DE1 <sup>2</sup> = 0.05290 N1 = 9	DE2 <sup>2</sup> = 0.36 N2 = 9
<b>Linealidad método</b> Número % recuperados	DE1 <sup>2</sup> = 0.3364 N1 = 12	DE2 <sup>2</sup> = 0.6855 N2 = 9
<b>Precisión</b> Número % recuperados	DE1 <sup>2</sup> = 1.2321 N1 = 12	DE2 <sup>2</sup> = 0.8836 N2 = 12

Los resultados de la razón de varianzas mostraron que los métodos no tienen la misma repetibilidad ya que en el intervalo de confianza obtenido no se encontró el valor de 1 para ninguno de los casos.

Para probar la repetibilidad con los datos de las varianzas obtenidas en la prueba de exactitud de los métodos tenemos:

$$F(8,8) = 4.43 \text{ con } 0.975 \text{ confianza}$$

$$\text{LSIC} = 0.6509$$

$$\text{LIIC} = 0.225$$

Para probar la repetibilidad con los datos de las varianzas obtenida en la prueba de linealidad de los métodos tenemos:

$$F(11,8) = 4.243 \text{ con } 0.975 \text{ confianza}$$

$$\text{LSIC} = 2.0821$$

$$\text{LIIC} = 0.1160$$

Para probar la repetibilidad con los datos de las varianzas obtenida en la prueba de precisión de los métodos tenemos:

$$F(11,11) = 3.474 \text{ con } 0.975 \text{ confianza}$$

$$\text{LSIC} = 4.8441$$

$$\text{LIIC} = 0.4013$$

#### **b. Comparación de la exactitud de los métodos**

Para determinar si los métodos para la valoración del acetato de sodio tenían la misma exactitud se determinó una prueba de t con los promedios de los porcentos recuperados obtenidos durante las pruebas de linealidad, exactitud y precisión de los respectivos métodos. En nuestro caso sólo se hizo la prueba de t a partir de los promedios de los porcentos recuperados obtenidos durante las pruebas de linealidad de cada una de los métodos a probar. En el cuadro 62 se muestran los datos que se requieren para esta prueba.

**Cuadro 62.** Datos requeridos para la determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma exactitud.

	Método 1	Método 2
	Valoración medio acuoso	Valoración en medio no acuoso
<b>Promedio del por ciento recuperado</b>	$\bar{R} = 100.917 \%$	$\bar{R} = 99.88 \%$
<b>Número % recuperados</b>	$N1 = 12$	$N2 = 9$
<b>Varianza de los métodos</b>	$DE1^2 = 0.3364$	$DE2^2 = 0.6855$

$$gl = = 14.9$$

$t = 2.1314$  valor de la distribución t con gl grados de libertad y una prob. de 0. 975

$$LSIC = 1.725$$

$$LIIC = 0.3419$$

En el intervalo de confianza de la diferencia de promedios no se encontró el valor de 0, por lo cual los métodos no tienen la misma exactitud.

### c. Linealidad

Para determinar si los métodos para la valoración del acetato de sodio tenían la misma linealidad se determinó una prueba de t para las pendientes y las ordenadas al origen obtenidas durante la prueba de linealidad de los métodos. En el cuadro 63 se muestran los datos que se requieren para esta prueba.

**Cuadro 63.** Datos requeridos para la determinar si los métodos de valoración de acetato de sodio tienen la misma linealidad.

	<b>Método 1</b>	<b>Método 2</b>
	<b>Valoración medio acuoso</b>	<b>Valoración en medio no acuoso</b>
<b>Cantidades adicionadas</b>	$\Sigma X1 = 6,409.5$	$\Sigma X2 = 1,911.06$
<b>Cantidades recuperadas</b>	$\Sigma X1^2 = 4,323,068.13$	$\Sigma X2^2 = 473,490.079$
<b>Adicionadas x recuperadas</b>	$\Sigma Y1 = 6,479.86$	$\Sigma Y2 = 1,903.47$
<b>Pendiente</b>	$\Sigma Y1^2 = 4,433.633.524$	$\Sigma Y2^2 = 467,787.78$
<b>Ordenada al origen</b>	$\Sigma XY1 = 4,377,907.451$	$\Sigma XY2 = 470,631.31$
<b>Número de repeticiones</b>	$M1 = 0.9939$	$m2 = 1.013$
<b>Número de concentraciones</b>	$b = 0$	$b = 0$
	$n = 3$	$n = 3$
	$n = 4$	$n = 3$

Cálculos preliminares:

$$SE^2 = 4,321.7$$

$$S^2_{dm} = 0.06859$$

$$t = 2.11 \text{ para } gl = 17$$

$$LSIC = 0.53352$$

$$LIIC = -0.57172$$

Ya que en el intervalo de confianza para la diferencia de las pendientes se localiza el valor de cero, se concluye que estos parámetros analíticos de los métodos son equivalentes.

La prueba estadística de ordenadas al origen no se realizó debido a que en los dos métodos dieron el valor de cero.

Para facilitar su comprensión en el cuadro 64 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas para la validación de los métodos analíticos propuestos.

**Cuadro 64 :** Resumen de los resultados obtenidos de la validación de los métodos analíticos empleados en la valoración de los principios activos de una solución de hemodíalisis.

Acetato de sodio medio acuoso	Acetato de sodio medio no acuoso	Calcio	Cloruros	Dextrosa	Magnesio
<b>Linealidad del sistema de medición</b>					
$r^2 = 0.9999$ $m = 0.0614$	$r^2 = 0.9996$ $m = 0.1144$	$r^2 = 0.9998$ $m = 4.3079$	$r^2 = 0.9999$ $m = 0.2857$	$r^2 = 0.9998$ $m = 5.61$	$r^2 = 0.9998$ $m = 6.89$
<b>Exactitud del sistema</b>					
R = 100.85 % CV = 0.31 %	R = 99.48 % CV = 1.21 %	R = 99.19 % CV = 0.66 %	R = 102.04 % CV = 1.16 %	R = 98.10 % CV = 1.26 %	R = 98.18 % CV = 0.79 %
<b>Precisión del sistema</b>					
CV = 0.42 %	CV = 0.61 %	CV = 0.20 %	CV = 1.39 %	CV = 0.74 %	CV = 0.49 %
<b>Linealidad del método</b>					
$r^2 = 0.9999$ $m = 1.0127$ $b = 0$	$r^2 = 0.9999$ $m = 0.9939$ $b = 0$	$r^2 = 0.9998$ $m = 1.0012$ $b = -0.0849$	$r^2 = 0.9998$ $m = 0.9988$ $b = 0$	$r^2 = 0.9998$ $m = 1.0210$ $b = 0$	$r^2 = 0.9998$ $m = 1.0087$ $b = 0.0015$
<b>Exactitud y repetibilidad del método</b>					
R = 100.66 % CV = 0.22 %	R = 100.02 % CV = 0.60 %	R = 99.01 % CV = 0.31 %	R = 100.60 % CV = 1.11 %	R = 101.40 % CV = 1.42 %	R = 100.95 % CV = 1.31 %
<b>Especificidad</b>					
Si	Si	Si	Si	Si	Requiere blanco de reactivos de calcio
<b>Reproducibilidad</b>					
R = 99.38 % CV = 1.12 %	R = 99.95 % CV = 0.94 %	R = 100.28 % CV = 0.26 %	R = 102.96 % CV = 2.52 %	R = 102.35 % CV = 2.68 %	R = 100.08 % CV = 0.58 %
<b>Reproducibile entre días y entre analistas</b>					
Si	Si	Si	Si	Si	Si

## VI. DISCUSIÓN

Es conveniente que antes de iniciar cualquier trabajo que implique la utilización de un método analítico se valide dicho método. Lo anterior es una actividad implicada en cualquier área en donde ejerza su profesión el químico analista. El Químico Farmacéutico Biólogo debe hacer conciencia de esta práctica, por lo que este trabajo constituye un material de consulta básico para cualquier egresado de esta área en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Una vez que se asegura que tenemos un método de análisis confiable podremos asegurar la calidad de los resultados generados durante el análisis. Así, en este manual se demostró que los métodos para la valoración de los componentes de la solución de hemodiálisis permiten cuantificarlos con exactitud y precisión.

Como se puede observar en la tabla presentada al final de la sección de resultados, todos los métodos cumplen con los límites recomendados para cada uno de los parámetros estadísticos calculados.

En el caso de los métodos evaluados para la determinación del acetato de sodio, se observó que el método de valoración en medio acuoso tuvo mejor desempeño en cuanto a la exactitud y precisión. En este caso se decidió recomendar para su uso rutinario este método basándonos no sólo en su mejor desempeño sino en el costo del análisis, ya que resulta obvio que es más caro el método de titulación en medio no acuoso debido a que utiliza ácido acético como medio de reacción y como medio de extracción utiliza cloroformo, Además este método también presenta otra desventaja desde el punto de vista toxicológico, ya que se requiere trabajar durante toda la práctica en una campana de extracción.

De cualquier manera este ejercicio de analizar el acetato de sodio por dos métodos se incluyó en este trabajo como ya se ha mencionado, con el objetivo de ejemplificar la comparación entre métodos. Como se observó en esta comparación los métodos no fueron equivalentes respecto a la exactitud y precisión.

Respecto al análisis del calcio y magnesio fue todo un reto para este trabajo, ya que debido a que estos dos componentes de la formulación se titularon con EDTA, en un principio se pensó que esto podría afectar la especificidad de esta determinación. Después del análisis de datos podemos decir que los métodos analíticos para la valoración de calcio en presencia de magnesio, o de magnesio en presencia de calcio en una solución de hemodiálisis mediante volumetría con EDTA resultaron métodos lineales en el intervalo de concentraciones estudiado, exactos, específicos y precisos. Así, los estudios realizados califican a estos métodos como confiables para determinar calcio en presencia de magnesio a partir de soluciones acuosas. Sin embargo sabemos que para cada formulación en la que se pretendan usar estos métodos de cuantificación se tendrá que validar la metodología analítica.

Para los cloruros se utilizó un método de valoración de titulación directo con nitrato de plata como titulante en medio de reacción con metanol, ácido acético y agua. Aunque el objetivo de este análisis no fue el de comparar métodos vimos que por razones del consumo de nitrato de plata este método es una buena alternativa para sustituir el clásico método para determinar cloruros con nitrato de plata por retroceso con sulfocianuro de amonio como titulante. Por lo anterior podemos decir que a pesar de utilizar metanol y ácido acético en el medio de reacción esto se justifica porque ajustamos el consumo de nitrato de plata a volúmenes menores de 15 ml, lo cual coloca a este método como recomendable por su economía y calidad.



El análisis de dextrosa por el método enzimático fue una propuesta para cambiar el clásico método polarimétrico para determinar dextrosa en productos farmacéuticos. Los resultados fueron evidentemente mejores, por lo que se recomienda utilizar este método para cuantificar dextrosa a partir de soluciones acuosas de manera exacta, precisa y muy específica.

Los resultados muestran que los métodos cumplen todas las pruebas a las que se deben de someter los métodos que se utilizan para valorar materias primas y producto terminado de acuerdo a las recomendaciones de la USP XXIII.

## VII .CONCLUSIONES

El método de volumetría ácido-base en medio acuoso empleado para la cuantificación de acetato de sodio en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible entre días y entre analistas en el rango de mg estudiado (138 – 904).

El método de volumetría ácido-base en medio no acuoso empleado para la cuantificación de acetato de sodio en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible en el rango estudiado (106 –319 mg).

El método de volumetría con EDTA para la cuantificación de calcio en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible entre días y analistas en el rango estudiado (6 - 15 mg).

El método de volumetría para la cuantificación de cloruros en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible entre días y analistas en el rango estudiado (18.3 – 107.3 mg).

El método de espectrofotométrico (colorimétrico) para la cuantificación de dextrosa en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible entre días y analistas en el rango estudiado (0.0039 – 0.0585 mg).

El método de volumetría con EDTA para la cuantificación de magnesio en la solución de hemodiálisis fue lineal, exacto, específico, repetible, y reproducible entre días y analistas en el rango estudiado (0.6386 – 2.5544 mg).

El resultado de la comparación de los dos métodos analíticos empleados para cuantificar el acetato de sodio mostró que no son métodos equivalentes en cuanto a

su exactitud y precisión, pero la linealidad fue equivalente. Se recomienda utilizar para su uso rutinario el método de valoración en medio acuoso debido a que mostró menor CV en las pruebas en las que se calculó.

Se logró describir en forma muy detallada todo el procedimiento de validación para para cada uno de los métodos analíticos por lo que este será un documento que servirá de guía para adaptar esta metodología a cualquier tipo de análisis.

Finalmente, todos los métodos aquí estudiados fueron validados por lo que podemos concluir que son confiables para determinar el contenido de los analitos estudiados, por lo cual podrán ser utilizados para el control durante el proceso de fabricación de este producto.

## VIII.- APÉNDICE

### 1.- Abreviaturas

SI = Solución indicadora

N = Normalidad

M = Molaridad

Peq= Peso equivalente

m / v = Masa / Volumen

b = Ordenada al origen o intercepto

r = Coeficiente de correlación

$r^2$  = Coeficiente de determinación

CV = Coeficiente de variación

IC = Intervalo de confianza al 95 %

$\Sigma$  = Sumatoria

m = Pendiente

n = Número de replicaciones

t = número de diluciones o número de cantidades adicionadas

$\bar{y}$  = Media aritmética

N = Número total de determinaciones

$S^2$  = Varianza

DE = Desviación estándar

x = Dilución o cantidad adicionada

y = Propiedad medida o cantidad recuperada

$\bar{R}$  = Porcentaje recuperado

R = Promedio aritmético del porcentaje recuperado

t = Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975

t\* = Valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0.975

$sp^2$  = Varianza ponderada

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza al 95 %

F = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0.975

Dep = Desviación estándar ponderada

Gl = Grados de libertad

y... = y total

Se<sup>2</sup> = Varianza error de regresión

Sdm<sup>2</sup> = Varianza de la diferencia de pendiente

Sdo<sup>2</sup> = Varianza de la diferencia de ordenadas

## IX. BIBLIOGRAFIA

Aires H. Gilbert. Análisis Químico Cuantitativo. 4<sup>a</sup> ed. México :Oxford University Press ,1968: 9-94,209-235,267-375.

Castañeda P. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud de la Secretaría de Salud. México: Asociación Farmacéutica Mexicana , 1995 : 1-73

Centro Asociación Farmacéutica . Programa de Validación Estadística de Métodos Analíticos (VALIDA).México: Estudios tecnológicos, 1998: Versión 1

CIPAM. Monografía técnica No. 2 , 4<sup>a</sup> ed. México,1989:5-12

Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Validación de Métodos Analíticos. México: Secretaría de Salud,2000 : 3-83.

Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de lo Estados Unidos Mexicanos. México: Secretaría de Salud,1994 :145,210-212,232-233-264,1146-1447.

Hoffman F. Statistical validation. Basle : La Roche, 1987: 1-9

Swartz Michael, Krull S. Ira. Analytical Method Development and Validation New York:Marcel Dekker, Inc, 1997:53-71

Tortora J. Gerard, Anagnostakos P. Nicholas. Principios de Anatomía y Fisiología. 6<sup>a</sup> ed.México: Harla,1993: 1060

United States Pharmacopeia Convención . United States Pharmacopeia-NF 18. 23 ed. Washington, D.C: Board of Trustees, 1995 : 1982-1984.

U.S. Departament of Health and human Services Food and Drug Administration. Guiance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validati6n, 2000 : 1-29