



46
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "**

FALLA DE ORIGEN

**VALIDACION DE TRES METODOS ANALITICOS
EN QUIMICA CLINICA.
(GLUCOSA, UREA Y ACIDO URICO)**

T E S I S

**DE LICENCIATURA
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P R E S E N T A N :
MAULEON SALINAS FELICITAS
PEDRAZA PANIAGUA JUANA**

MEXICO, D.F. 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A G R A D E C I M I E N T O S

Se agradece a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, en particular a la Unidad Multidisciplinaria de Atención Integral, Zaragoza. Campus I.

Un especial agradecimiento al Q.F.B. Juan Fco. Sanchez Ruiz por todo el apoyo prestado a la realización del presente trabajo, su excelente guía y aporte inagotable de conocimientos.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL JURADO

PRESIDENTE	Dr.	RUBEN MARROQUIN SEGURA
VOCAL	Q.F.B.	JUAN FCO. SANCHEZ RUIZ
SECRETARIO	Q.F.B.	CESAR O. JIMENEZ PIERRE
SUPLENTE	Q.B.P.	GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS
SUPLENTE	Q.F.B.	J. OSCAR GONZALEZ MORENO

D E D I C A T O R I A

Dedico esté trabajo.

A mis padres y hermanos por la alegría de ser una familia unida, los Quiero Mucho.

A la familia Becerril González por apoyarme incondicionalmente durante todo el tiempo que compartimos (Mi segunda familia).

A Martín Salcedo Rubio por el gran apoyo recibido cuando más lo necesitaba, eres a pesar de todo mi gran amigo. Te Quiero.

A mis amigos del trabajo, especialmente a Carolina y Ma. de Jesus Flores.

Y finalmente a mis sobrinos, Alejandra, Luis Enrique, Gerardo, José Luis y Dulce Mariana, porque algún día lleguen a terminar una carrera.

I N D I C E

INTRODUCCION	3
FUNDAMENTACION DEL TEMA (GENERALIDADES)	9
Valores de referencia	11
Métodos de referencia para Glucosa	12
Métodos de referencia para Urea	12
Métodos de referencia para Acido Urico	13
Validación	14
Definición	14
Exactitud	14
Precisión	15
Linealidad	15
Rango	15
Especificidad	15
Límite de detección	15
Estabilidad de la muestra	16
Espectrofotometría	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	21
HIPOTESIS	22

MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	46
DISCUSION	65
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXO	72

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad poco énfasis se ha hecho para evaluar la precisión y la exactitud de los métodos analíticos empleados en el Laboratorio clínico, de hecho pocos Laboratorios clínicos validan sus técnicas analíticas para la cuantificación rutinaria de metabolitos, debido a que no existe obligatoriedad en el Área clínica para validar sus métodos.

La validación de un método analítico consiste en determinar la exactitud y establecer la precisión de la técnica empleada para cuantificar un metabolito.

De acuerdo con la Ley General de Salud, en el artículo 139 de la sección primera del capítulo IX del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Prestación de Servicios de Atención Médica, se define a un Laboratorio clínico como un establecimiento ligado a algún servicio de atención médica que tenga como fin coadyuvar en el estudio, resolución y tratamiento de los problemas clínicos.

Entre otras funciones puede investigar los valores de referencia de la población, lo que cobra importancia porque en algunas determinaciones, los rangos no corresponden necesariamente a los informados en la literatura internacional.

El Laboratorio clínico colabora con el personal médico para el diagnóstico y tratamiento de los problemas de salud de los pacientes. Difícilmente puede haber un aspecto más importante del Laboratorio que la ejecución e interpretación de los datos obtenidos. De hecho, el requerimiento de una determinada prueba de Laboratorio genera una gran cantidad de maniobras, cuyo objetivo es la obtención de un informe analítico.

El diagnóstico por el Laboratorio es actualmente el soporte de la medicina moderna que fundamenta, confirma o corrige el diagnóstico clínico presuntivo, el pronóstico y el seguimiento de la evolución de las patologías detectadas. El Laboratorio clínico tiene, además, un papel significativo en la medicina preventiva, en lo que toca a la comprobación de la incidencia, prevalencia y morbilidad de enfermedades transmisibles y/o degenerativas.

Cada procedimiento dirigido a generar un resultado está constituido por una serie de pasos o fases. La comprensión adecuada de cada fase permite al profesional del Laboratorio alcanzar condiciones próximas al nivel óptimo y en consecuencia, mejorar la exactitud y precisión de cada determinación. La recolección, manipulación y procesamiento de la muestra antes de realizar el análisis son fundamentales. La validez de los datos obtenidos en la muestra depende en gran medida de la calidad de la técnica de Laboratorio, en la que influyen la adecuada manipulación del equipo, el empleo de reactivos lo suficientemente puros y el control ambiental.

Existen enfermedades, donde el valor exacto y preciso de un determinado metabolito, permite establecer un diagnóstico adecuado o determinar la gravedad del caso. por ello el Laboratorio clínico requiere, además de equipo y personal capacitado, técnicas analíticas confiables para la cuantificación de metabolitos.

En México la calidad de la ejecución analítica empezó a preocupar a partir de 1950, cuando se detectaron discrepancias y falta de reproducibilidad en los análisis clínicos practicados a un paciente en diferentes horarios de un mismo laboratorio del Sector Salud y en laboratorios privados. Por ello surgió la Asociación Nacional de Químicos de Laboratorio del I M S S A.C. que más tarde habría de integrar una parte de la recién formada Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica (A M B C). La Asociación Nacional de Químicos del Laboratorio del I M S S . A.C. y la A M B C . decidieron que la estrategia para asegurar una confiabilidad diagnóstica en los resultados del Laboratorio clínico era la capacitación, entrenamiento, mejor preparación básica y realización de un adecuado Control de Calidad durante la ejecución analítica.

Años después la A M B C , ingresó como miembro de la Federación Internacional de Química Clínica (I.F.C.C.,1969). Seleccionando la Asociación el sistema seguido por la Gran Bretaña implantado desde Wolfson Research Laboratories por su director, el profesor Thomas F. Whitehead que es el líder de la escuela inglesa de control de calidad. Este fue invitado a México para que diera un diagnóstico de la situación. Al final del año 1984 el Dr. Whitehead formuló un documento para presentar al Consejo Directo de la Federación Internacional de Química Clínica con el objeto de proponer un Proyecto México de Química Clínica con tres años de duración y seis programas simultáneos para mejorar la ejecución analítica en los Laboratorios clínicos, teniendo como meta llegar al nivel de excelencia. El punto primero y prioritario en tiempo, del Proyecto, fue el Curso Básico de Entrenamiento para Tutores en Química Clínica (teórico - práctico) habiéndose impartido el curso exclusivamente a directores de Laboratorio para asegurar que los conceptos impartidos se transmitieran a través de otros cursos similares " en cascada " a otros profesionales que a su vez tuvieran autoridad en sus respectivos centros de trabajo. Se buscó el efecto multiplicador para que el entrenamiento básico descendiera a través de la línea de personal del laboratorio hasta los ejecutantes directos de los análisis, por lo que los particulares aceptaron el compromiso de impartir al menos una vez al año el curso " en cascada " .

Desde hace varios años se ha señalado la importancia de los programas de control de calidad en el Laboratorio clínico, que siendo similares a los efectuados en las industrias, tienen diferente aplicación e interpretación; ya que en los estudios de control de calidad efectuados en los Laboratorios clínicos, debe tenerse siempre en cuenta la variabilidad fisiológica de los individuos y los factores múltiples desconocidos que pueden interferir en una determinación, y la imposibilidad de obtener un modelo adaptable a todas las condiciones.

Aunque existen diversas formas de llevar un control interno de calidad para la ejecución analítica de los metabolitos de rutina en un Laboratorio clínico, en ningún esquema de control se determina o establece la importancia de validar los métodos de análisis seguidos por el Laboratorio.

Cuando se realiza alguna variación en la técnica de medición, es necesario determinar nuevamente la linealidad del método de medición, la exactitud del método de medición, la linealidad del sistema de medición, la exactitud del sistema de medición así como determinar la repetibilidad y reproducibilidad.

La Química clínica ocupa en la actualidad un papel importante en el equipo de salud; requiere además de la aplicación de los principios de la Química y la medicina, contribuciones de otras disciplinas como matemáticas, física, farmacología y toxicología.

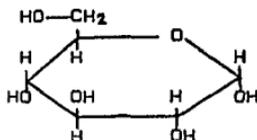
La Química clínica se ha desarrollado ligada a la Farmacia, a la química y a la medicina, por lo que sus orígenes se pierden en el pasado.

Una de las funciones principales de la Química clínica se basa en conocer la naturaleza química de los flúidos biológicos de personas sanas y poder diagnosticar alguna enfermedad de acuerdo a la variación y desviación de su composición.

Propiedades físicas y químicas.

GLUCOSA :

Glucosa, dextrosa
Fórmula molecular:
 $C_6 H_{12} O_6$
Peso molecular: 180.16 Dal-
tons
Clase química: hidrato de
carbono



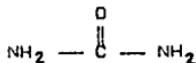
α -D-Glucosa

Químicamente la glucosa es una aldosa en la cual la forma aldehídica está en equilibrio con la forma enodiolica (que aparece más arriba). Esta última estructura es la favorecida a pH fisiológico. El equilibrio aldehído/enodiol permite que la glucosa pueda ser reducida y oxidada con facilidad.

Los métodos más antiguos establecidos para la determinación de glucosa sérica se basan en la capacidad de la glucosa de reducir directamente los iones cúpricos (Cu^{++}) a iones cuprosos monovalentes (Cu^{+}). En presencia de calor, los iones cuprosos reducidos forman óxido cuproso (Cu_2O), que pueden detectarse mediante diversos métodos.

UREA :

Urea (BUN, carbamina).
Peso molecular: 60.06 daltons.
Clase química: metabolito de
aminoácidos.



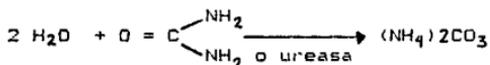
La urea es el principal producto final del metabolismo proteínico. Se forma en el hígado, se vierte a la sangre y es eliminada por el riñón.

Constituye aproximadamente el 45% del nitrógeno no protéico total del suero o plasma.

La cantidad producida está acelerada por la dieta con elevado contenido protéico o bien por un aumento del catabolismo protéico endógeno, debido a una desnutrición grave o a un daño hístico.

La capacidad normal del riñón para excretar urea es notable, y en presencia de una función renal normal, sólo las dietas extremadamente ricas en proteínas pueden originar un aumento de la uremia superior a los niveles de referencia.

La urea ha sido tradicionalmente cuantificada por análisis químico directo o indirectamente por conversión previa a amoniaco y posterior análisis. La mayoría de los métodos históricos implican la medición del nitrógeno del amoniaco (NH) luego de tratar las muestras mediante temperaturas elevadas (autoclave a 125°C) o por acción de la enzima ureasa:

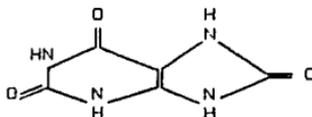


ACIDO URICO.

Fórmula molecular: $\text{C}_5 \text{H}_4 \text{N}_4 \text{O}_3$

Peso molecular: 168.11 Daltons.

Clase química: purina.



El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el hombre, y es una de las sustancias nitrogenadas no protéicas. Parte del circulante es endógeno y parte es exógeno. Principalmente se excreta por orina.

El ácido úrico y otros reductores del suero, en solución alcalina reducen los iones de Cu^{2+} a Cu^+ formando con el ácido batocuproindisulfónico un complejo color pardo rojizo. El valor verdadero se obtiene por la diferencia con un blanco de suero en el que se degrada específicamente el ácido úrico con uricasa a alantoina y peróxido de hidrógeno, siendo el primero un compuesto no reductor. El peróxido de hidrógeno se descompone con la catalasa para que no interfiera con la reacción al reducir también el Cu^{2+} .

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA. (GENERALIDADES)

La Ley General de Salud en el apartado quinto, artículo 1127, capítulo I, Título Vigésimoprimer, del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, menciona que para la Industria Farmacéutica, los establecimientos deberán contar en su caso, con las instalaciones, equipo necesario y manual de procedimientos para efectuar los controles analíticos de materias primas, productos en proceso, preparados farmacéuticos, productos terminados y material de acondicionamiento, debiéndose conservar constancia de todas las operaciones que se efectúen con la comprobación del resultado y la validación de cualquier técnica empleada.

En el Laboratorio clínico existe poco énfasis en la evaluación de la precisión y la exactitud de los métodos analíticos. de hecho, los Laboratorios clínicos no validan sus técnicas analíticas para la cuantificación rutinaria de los metabolitos, debido a que no existe obligatoriedad en el área clínica para validar los métodos.

Aunque hay para la industria farmacéutica, no existe hasta ahora una legislación en materia de validación analítica en el área de la bioquímica clínica, por ello es poco común que los laboratorios clínicos validen sus técnicas.

Algunas veces es muy pequeña la cantidad de la muestra para analizar un metabolito, como cuando se analiza líquido cefalorraquídeo o algún analito de un recién nacido. o cuando el reactivo o el patrón es demasiado caro y difícil de conseguir o cuando ya se va a acabar. Por ello no es posible a veces usar los métodos convencionales de análisis registrados o anotados en el instructivo del reactivo comercial.

Por ello en éstos, se innovan métodos de análisis para cuantificar un metabolito, generalmente el químico del laboratorio asume que el reducir a la mitad las cantidades de un método, este sigue comportándose igual. es decir, mantiene linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, límite de cuantificación, etc.

Un caso claro es que no necesariamente el guardar la proporcionalidad de las cantidades asegura un cumplimiento en las propiedades de cuantificación del método. Ejemplo: si se agregan 0.2 ml de ácido sulfúrico + 0.2 ml de agua, no ocurre nada pero si se aumenta de manera proporcional las cantidades, 20 ml de ácido + 20 ml de agua, ocurre algo distinto.

Para cuantificar un metabolito existen, de manera general, por lo menos dos métodos con fundamentos diferentes (glucosa o-toluidina y glucosa oxidasa), para cada método existen en el mercado varias marcas con reactivos diferentes y métodos distintos. Los aparatos de un Laboratorio clínico no necesariamente requieren para su lectura de la cantidad de muestra requerida en la técnica, muchas veces requiere menos y el dispendio de reactivos resulta oneroso, por ello en muchas ocasiones el Laboratorio clínico "ajusta" las técnicas de análisis a sus necesidades técnicas, de servicio y demanda.

Muchos de estos ajustes se realizan disminuyendo de manera proporcional las cantidades de reactivos, suero y patrón estipulados en la técnica, y se asume que el método se comportará de manera semejante.

Ante cualquier variación a lo estipulado en la técnica original, requiere de una validación analítica para asegurar la exactitud y precisión de nuestro método analítico. De nada sirve tener los mejores programas de control de calidad si nuestros métodos analíticos no arrojan resultados repetibles y reproducibles.

Los resultados obtenidos por cualquier analista poseen evidentemente un cierto grado de inseguridad o imprecisión debido a que todas las variables están sujetas a error. Es por ello que para tener una buena exactitud hay que utilizar material de referencia que sea certificado por organizaciones especializadas que garanticen que no sólo es una sustancia pura, sino una sustancia a la que se le ha determinado su concentración por un método específico (Método de referencia). Conocidos éstos como patrones primarios que poseen un valor teórico específico que difiere al calcularse por cualquier otro método.

Los patrones primarios por lo general se emplean para que a partir de ellos se calibren otros materiales similares pero que de ninguna manera poseen el mismo grado de pureza. Para ello puede emplearse cualquier método que se desee, valorando simultáneamente tanto el patrón primario (patrón de referencia) como el que se desea calibrar.

Por comparación del valor obtenido por el método de estudio, con el teórico, se asigna un valor característico al material que se desea emplear como referencia. A éste se le denominará patrón secundario.

Para el Laboratorio clínico se ofrece una gran variedad de materiales como sustancias de "comparación" (controles de concentración conocida), de los cuales se ofrecen niveles de concentración diferentes que generalmente se preparan de manera especial, dependiendo del fabricante que los produzca, por lo tanto, aún cuando pudieran contener una mínima concentración teórica del compuesto a analizar (analito) su valor dependerá del método y condiciones empleadas (concentraciones distintas de los reactivos, modificaciones en el volumen de la muestra o del reactivo, cambios en la longitud de onda recomendada, tiempos de incubación, etc.). Esto indica que los métodos con el mismo nombre y fundamento se consideran distintos si existe una variación en ellos.

VALORES DE REFERENCIA.

En una representación gráfica (curva normal) mientras más cercanos al valor medio sean los resultados que se obtengan en una serie de determinaciones, se dirá que son más precisos o que se aproximan más al valor promedio.

La desviación estándar constituye por lo tanto una medida de la dispersión de los valores o grado de precisión obtenido por un analista, (Control de calidad). Sin embargo no necesariamente sus resultados son exactos. Mientras que la precisión en el sistema de trabajo puede controlarse de manera relativamente fácil, éste es más difícil para la exactitud, ya que depende del material de referencia y de métodos específicos de que se disponga para determinar el valor de los mismos.

Los valores normales que se obtengan, en una población " Clínicamente sana " dependerán también del método y condiciones empleadas. Por lo que las modificaciones pueden repercutir en estos valores.

Los sueros control o sueros de referencia son muy diferentes en cuanto a su composición, niveles de componentes (analitos, enzimas, estabilizadores, activadores, etc.) y de ninguna manera corresponde a un patrón primario o patrón de referencia por lo que no pueden emplearse para establecer curvas de calibración.

Por esta razón se recomienda que el material que deba manejarse como referencia (patrón secundario) se " calibre " para el método y condiciones en que se va a usar.

**NUEVO SISTEMA DE UNIDADES SI - VALORES DE REFERENCIA EN SUERO
Merckotest y Merck-1-Test**

ANALITOS	UNIDADES ANTIGUAS	UNIDADES SI
Glucosa (o-toluidina)	60 - 110 mg/100ml	3.33-6.10 mmol/dl
Urea (DAM), (Berthelot)	20 - 40 mg/dl	3.3 -6.7 mmol/dl
Acido Urico	H 2.5-7.0 mg/100ml	149 - 416 umol/l
	M 1.5-6.0 mg/100ml	89 - 357 umol/l

METODOS DE REFERENCIA PARA GLUCOSA

El método de la o-toluidina es de exactitud y precisión aceptables, presenta las desventajas de la naturaleza nociva de sus reactivos y de la reacción inespecífica con la urea y otras hexosas, en especial manosa y galactosa. Ofrece sólo ventaja económica sobre los métodos enzimáticos.

Los métodos de glucosa oxidasa, que utilizan fenilaminofenazona como indicador final, demostraron la siguiente menor parcialidad total. Los ensayos de glucosa oxidasa-índice de oxígeno demostraron una parcialidad mayor, al igual que el de la o-toluidina. Los métodos de ferricianuro y neocuproína presentan una parcialidad inaceptablemente elevada.

Los mejores métodos disponibles para la medición automatizada de rutina de glucosa en líquidos orgánicos resultan ser los enzimáticos, utilizados en la forma de análisis cinéticos. Los métodos de análisis cinéticos probablemente se utilicen cada vez con mayor frecuencia para la determinación de glucosa.

METODOS DE REFERENCIA PARA UREA

Los métodos para cuantificar urea por Nesslerización y reacciones de Berthelot son rara vez utilizados hoy en día. Ambas reacciones se han llevado a cabo como procedimientos de punto final, lo cual los hace susceptibles a una conversión incompleta de urea a amoníaco.

La reacción de Nesslerización ha demostrado presentar mayores dificultades. La primera es la sensibilidad a la presencia de niveles de acetona que pueden estar presentes en pacientes con cetoacidosis diabética. La formación de turbidez a medida que precede la reacción es también un problema importante que plantea el ensayo.

La reacción de la diacetilmonoxima ha sido fácilmente adaptada para análisis automatizado, habiéndose informado buena precisión con un CV 2.5 a 6.5 % en el límite superior de concentraciones normales de urea.

Las técnicas acopladas ureasa/GLDH y el método de conductividad son los más empleados en los instrumentos automatizados. Son tal vez los de mayor grado de especificidad respecto de cualquier otro ensayo de urea.

El método preferido, es desde luego el de conductividad o la técnica de ureasa/GLDH realizados cinéticamente, ya que presentan la mayor especificidad, velocidad de análisis y precisión de todos los utilizados en la actualidad.

MÉTODOS DE REFERENCIA PARA ACIDO URICO

A través de los años, se han sugerido varios métodos para la determinación de ácido úrico en el suero y orina.

En 1953 Natelson propuso adoptar el método de Folin modificado por Brown como estándar para determinación de ácido úrico. Este método incorpora una oxidación alcalina aplicada directamente a un filtrado de suero desproteinizado con ácido tungstico. El agente oxidante empleado es el ácido fosfotungstico en presencia de cianuro de sodio con pH "estabilizado" por la urea. Sin embargo, este método adolece de falta de especificidad.

En 1964 se sugirió una modificación del método de Folin y Denis en donde las soluciones de carbonato de sodio y ácido fosfotungstico se añaden directamente al suero desproteinizado con ácido tungstico, como método estándar.

En 1979 se propuso una técnica de HPLC como método seleccionado para ácido úrico. Las ventajas de este procedimiento que utiliza detección electroquímica luego de cromatografía de intercambio iónico incluyen su mayor sensibilidad y especificidad.

En el año 1979 los Centers for Disease Control presentaron un proyecto para un método de referencia para ácido úrico en suero a la American Association for Clinical Chemistry (AACC). Este método incluye la precipitación proteica mediante ácido tricloroacético para eliminar niveles basales de suero, seguido de un método manual, de equilibrio, en el ultravioleta y con uricasa.

El método preferido para la medición de rutina del ácido úrico es una técnica enzimática acoplada automatizada disponible en forma de equipos comerciales.

2.1 Validación

2.1.1. Definición.

La validación de métodos analíticos, es el proceso que determina la aceptabilidad de un método para dar datos analíticos útiles, los cuales son confiables, reproducibles y no dan falsos positivos o negativos

La manera clásica para la validación de un método analítico es analizar muestras de referencia, primarias y secundarias que son similares a muestras problema, comparando los resultados para dar valores certificados.

2.1.2. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a los que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

2.1.3. Precisión.

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras a una muestra homogénea. Textualmente se expresa en términos de desviación estándar y coeficiente de variación.

2.1.4. Linealidad.

Habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

2.1.5. Rango.

Intervalo entre los niveles superior o inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método descrito es preciso, exacto y lineal.

2.1.6. Especificidad.

Es la medida del grado de interferencia, en el análisis de muestras complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

2.1.7. Límite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

2.1.8. Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

2.2 Espectrofotometría ultravioleta - visible. La absorción y emisión de energía radiante que realizan las moléculas y los átomos, constituyen el fundamento de muchos procedimientos en química analítica.

La posición de una absorción o emisión se expresa mediante tres unidades diferentes: longitud de onda, frecuencia y energía. La unidad de la longitud de onda, es el cm , subdividido en milimicras ($\mu = 10^{-9} \text{ cm}$), nanómetros ($\text{nm} = 10^{-7} \text{ cm}$), Angstrom ($\text{A} = 10^{-8} \text{ cm}$) y micrómetros ($\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$). La unidad de frecuencia es el ciclo por segundo (Hz) y las unidades de energía son el electrovoltio (eV, Kev, meV), la caloría (cal, Kcal), el número de ondas (cm^{-1}) y el ergio.

2.2.1 Absorción y emisión de radiación electromagnética. Cuando un átomo o molécula absorbe energía pasa a un estado de mayor energía o estado excitado. A cada estado excitado puede asignarse un nivel de energía definido y todos los posibles estados son característicos de cada átomo o molécula. En la figura No.2 se muestra un diagrama simplificado de niveles energéticos para un átomo o molécula.

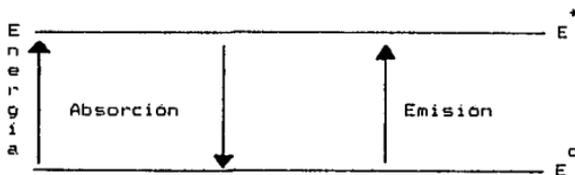


Figura No. 2 Diagrama de niveles de energía: E nivel energético bajo; E^* nivel energético alto.

Las dos líneas horizontales representan dos niveles energéticos. Si al sistema se le proporciona energía en forma de luz o calor,

un electrón pasará del estado de E_0 al de E^* . Esta absorción hace que la molécula o átomo se encuentre en estado excitado. Una vez en el estado excitado, las especies eliminan el exceso de energía mediante varios procesos; en primer lugar, la partícula energética puede chocar con moléculas de disolvente o con otras moléculas y transferir la energía a su entorno; en segundo, las especies se desactivan emitiendo un fotón (emisión) equivalente a la diferencia energética entre los dos niveles E^* y E_0 . En ambos casos, la molécula o átomo regresa a su estado electrónico fundamental.

2.2.2 Ley de Beer. La espectrofotometría analítica cuantitativa se basa en dos leyes fundamentales. Estas se refieren al cambio de energía radiante de un haz de luz monocromática al variar el camino óptico de la muestra, (b), y la concentración de la muestra, (c).

La primera ley, atribuida a Bouguer, dice que a una longitud de onda en la que pueda ocurrir absorción, al aumentar el espesor de la muestra absorbente disminuirá la cantidad de luz transmitida a través de ella.

La energía incidente de radiación monocromática se denomina P_0 y la transmitida P . La absorción esta definida como:

$$A = - \log (P / P_0)$$

La segunda ley establece que a una longitud de onda en la que pueda ocurrir absorción, al aumentar la concentración de la solución absorbente disminuirá la energía luminosa, transmitida en una forma logarítmica similar a la ley anteriormente mencionada.

$$\ln (P / P_0) = - k' c$$

k' está relacionada con la intensidad de absorción.

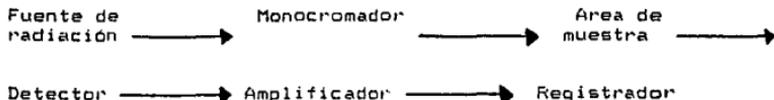
Combinando las dos leyes, se obtiene la ecuación de la ley de Beer :

$$A = k b c$$

Donde k es la absorptividad de la muestra, b es el camino óptico y c es la concentración.

Las desviaciones de la ley de Beer son de dos tipos, positivas y negativas. Los factores que pueden causarla son; condiciones ambientales, errores instrumentales y desviaciones químicas.

2.2.3 Instrumental. Todo espectrofotómetro de UV y visible está formado de los siguientes componentes:



1.- Fuente de radiación. Dos fuentes de radiación son necesarias para cubrir el rango UV - visible, una lámpara de tungsteno es una buena fuente de radiación para la región visible. en la región UV la fuente de energía más usual es una lámpara de descarga de deuterio o hidrógeno.

2.- Monocromador. Este dispositivo se utiliza para convertir la radiación policromática en una forma monocromática adecuada. El mecanismo de dispersión controla el carácter monocromático de la radiación que incide sobre la muestra. Los mecanismos de dispersión más comunes son los prismas y las redes, se pueden emplear al efectuar un espectro de barrido.

3.- Area de muestra. Las celdas que contienen la muestra han de ser transparentes a la radiación, por lo que se emplean celdas de vidrio en la región visible y celdas de sílice en el ultravioleta.

4.- Detector. En los espectrofotómetros de UV-VIS se emplean dispositivos electrónicos que se conocen como fototubos y fototubomultiplicadores, para detectar la intensidad de radiación transmitida por la muestra.

5.- Medidor o registrador. La señal del detector se alimenta con un circuito potenciométrico, que se gradua para obtener un dato o lectura de transmitancia o absorbancia. Los espectrofotómetros registrados trazan un registro de la absorbancia sobre papel; con estos instrumentos se registra automáticamente el espectro de absorbancia completo, y el propio instrumento explora el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva absorbancia - longitud de onda.

La Ley de Lambert y Beer, establece que la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de energía radiante absorbida o inversamente proporcional al logaritmo de la energía radiante transmitida. Si la concentración de una solución es constante y la longitud del camino que la luz debe atravesar en la solución se duplica, el efecto es el mismo que duplicando la concentración, ya que habrá ahora dos veces más moléculas absorbentes presentes en el camino de la radiación. Por ende la absorbancia es también directamente proporcional a la longitud del camino de la energía radiante a través de la celda. Encontrando que una de las desviaciones de la Ley de Beer ocurre cuando se miden concentraciones muy elevadas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Glucosa, Urea y el Acido Urico son analitos que se cuantifican en suero por espectrofotometria ultravioleta de acuerdo al método de Ortotoluidina, Diacetilmonoxima y el método de Caraway Modificado, respectivamente establecidos por Bionon, mismos que serán utilizados como métodos de referencia primarios los cuales son determinaciones que no tienen variaciones, por esta razón se validaran estos métodos.

4. OBJETIVOS

Establecer para cada método analítico que se desea validar apoyándose en un método de referencia primario para cada metabolito:

- 1.- Linealidad del sistema de medición.
- 2.- Precisión del sistema de medición.
- 3.- Exactitud al 100 %.
- 4.- Linealidad del método de medición.
- 5.- Precisión.
- 6.- Estabilidad de la muestra.
- 8.- Limite de detección.

5. HIPOTESIS

Un método analítico está validado si cumple con las características de precisión, exactitud, linealidad y especificidad, semejantes al que tiene el método de referencia primario para cada metabolito a validar, por lo que los métodos para la cuantificación de Glucosa, Urea y Acido Úrico en suero se consideran que están validados si cumplen con las características mencionadas.

6. MATERIAL Y METODOS

Material:

Pipetas Pasteur.
Pipetas serológicas de 0.1 ml.
Pipetas graduadas de 1 ml.
Pipetas graduadas de 5 ml.
Tubos de ensaye de 13 x 100 (Pyrex).
Tubos de ensaye de 18 x 150 (Pyrex).
Tubos de Foling.
Aspirador automático para medir 2.5 ml.
Aspirador automático para medir 5 ml.
Gradilla.
Tripie.
Tela de asbesto.
Mechero Fisher.
Vaso de precipitados de 1000 ml. (Pyrex).

Equipo:

Centrífuga Solbat No. 2983 v-115.
Espectrofotómetro U.V..
Cronómetro Hanhart.
Refrigerador.
Baño de agua Riossa.

Reactivos:

Determinación de Glucosa

(reactivo comercial marca Bioxon.)

No. 1.- Patrón (100 mg/100 ml.): Estable a temperatura ambiente.

No. 2.- Reactivo de color: Estable a temperatura ambiente por 2 años.

ATENCION: El reactivo debe ser manejado con mucho cuidado pues contiene ácido acético en concentración elevada (corrosivo), se recomienda almacenarlo y manejarlo con pipetas automáticas.

Determinación de Urea
(reactivo comercial marca Bioxon.)

No. 1.- Diacetilmonoxima: Solución concentrada.

No. 2.- Tiosemicarbazida: Solución concentrada.

No. 3.- Reactivo ácido: Solución concentrada.

No. 4.- Patrón 80 mg/100 ml.

Todos estos reactivos son estables a la temperatura ambiente por 2 años.

Preparación de los reactivos de uso:

Reactivo de color: Transferir 40 ml. del reactivo No. 1 (diacetilmonoxima) y 20 ml. del reactivo No. 2 (tiosemicarbazida) a un matraz volumétrico de 500 ml, completar con agua destilada hasta la marca. Homogeneizar bien y almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente. Estable por 1 año.

Reactivo ácido: Transferir 125 ml del reactivo No. 3 (Reactivo ácido) a un matraz volumétrico de 500 ml. y completar hasta la marca con agua destilada. Homogeneizar bien y conservar en frasco de color ámbar a temperatura ambiente. Estable por 1 año.

Determinación de Acido Urico
(reactivo comercial marca Bioxon.)

- No. 1.- Reactivo desproteinizante: Acido tungstico estabilizado. Estable a temperatura ambiente
- No. 2.- Carbonato de sodio: Estable a temperatura ambiente.
- No. 3.- Reactivo de color: Estable 3 años a temperatura ambiente e indefinidamente en refrigeración.
- No. 4.- Patrón (100 mg/100 ml): Estable 2 años a temperatura ambiente e indefinidamente en refrigeración.

M E T O D O S:

Método directo de glucosa sin desproteinización (Orto-toluidina).

a) Técnica Macro:

- 1.- Tomar 3 tubos de ensayo y marcarlos: M (Muestra), P (Patrón) B (Blanco). Enseguida añadir:

	BLANCO	MUESTRA	PATRON
Agua destilada	0.05 ml	-	-
Plasma	-	0.05 ml	-
Patrón (No.1)	-	-	0.05 ml
Reactivo de color (No.2)	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

2.- Mezclar bien y colocar en baño de agua hirviendo durante 5 minutos (Ver recomendaciones importantes, No. 4 y 5). Enfriar en baño de agua fria durante 3 minutos. Determinar las absorbancias del patrón y de la muestra a 630 nm o con filtro rojo, ajustando a cero con el blanco. La coloración es estable por 45 minutos.

CALCULOS:

$$\text{Glucosa (mg/100 ml)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 100$$

La reacción colorimétrica obedece a la ley de Beer (ver comportamiento de la reacción), por lo que puede usarse el método del factor para calcular los resultados.

$$\text{Factor de calibración} = \frac{100}{\text{Absorbancia del patrón}}$$

Concentración de la muestra (mg/100 ml) = Absorbancia de la muestra x Factor.

VALORES LIMITES DE REFERENCIA (Normales):

plasma: 70 a 110 mg/100 ml

sangre total: 60 a 100 mg/100 ml

líquido cefalorraquídeo: 2/3 de glicemia

orina: 0.5 a 1.5 mg/ 24 hrs.

RECOMENDACIONES IMPORTANTES:

- 1.- Para obtener resultados precisos y exactos, seguir rigurosamente el método propuesto.
- 2.- Al pipetear la muestra y la solución patrón en el método directo, usar micropipetas de 50 microlitros (Técnica macro).
- 3.- La Galactosa y la Manosa reaccionan con la Ortotoluidina en la misma proporción que la Glucosa, aunque su presencia en la sangre y orina rara vez ocurre.
- 4.- La limpieza cuidadosa del material de vidrio es de importancia fundamental en la obtención de resultados exactos.

- 5.- Los tubos de ensayo deben ser colocados en el baño de agua a ebullición. El nivel del agua en el baño debe ser superior al nivel de los reactivos dentro de los tubos de ensayo.
- 6.- Para constatar la exactitud y precisión de los resultados, se sugiere comprobar diariamente el comportamiento de la técnica, utilizando para ello el patrón de glucosa (No. 1) y suero control. El error máximo permitido para el patrón no será mayor del 10 %. Con este procedimiento se pueden detectar alteraciones en la respuesta del colorímetro.

Método directo de Urea. (Diacetilmonoxima)

Se usa para plasma o suero.

- 1.- Marcar 3 tubos de ensayo: B (Blanco), M (Muestra) y P (Patrón) y proceder como sigue:

	BLANCO	MUESTRA	PATRON
Reactivo de color	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Suero o plasma	-	0.02 ml	-
Agua destilada	0.02 ml	-	-
Patrón	-	-	0.02 ml
Reactivo ácido	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

- 2.- Mezclar bien y colocar en baño de agua en ebullición durante 10 minutos. Transferir a un baño de agua fría durante 3 minutos.
- 3.- Determinar las absorbancias de la muestra y del patrón a 520 nm, o con filtro verde, ajustando a cero con el blanco. La coloración es estable por 60 minutos.

CALCULOS:

$$(\text{mg}/100 \text{ ml}) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 80$$

Como la reacción colorida sigue la Ley de Lambert y Beer, puede ser usando el factor para calcular los resultados:

$$\text{Factor (F)} = \frac{80}{\text{Absorbancia del patrón}}$$

$$(\text{mg}/100 \text{ ml}) = \text{Absorbancia de la muestra} \times F$$

VALORES LIMITES DE REFERENCIA (Normales):

Sangre, suero o plasma: 15 a 40 mg/100 ml

2.5 a 6.6 mmol/lit

Orina: 25 a 43 g/24 horas.

RECOMENDACIONES IMPORTANTES:

- 1.- Para la obtención de resultados precisos y exactos es importante seguir estrictamente el método propuesto.
- 2.- Colocar los tubos en el baño de agua a ebullición. El nivel de agua en el baño hirviente debe ser superior al nivel alcanzado por los reactivos en los tubos de ensayo.
- 3.- Para detectar alguna alteración en la respuesta del espectrofotómetro o del colorímetro, es conveniente comprobar periódicamente la calibración del aparato.

- 4.- Es indispensable que los utensilios de vidrio empleados para esta técnica, estén perfectamente limpios y secos. Utilizar pipeta automática o la pipeta de hemoglobina de Shali para pipetear 0.02 ml de la muestra.
- 5.- La aparición de un precipitado en los reactivos No. 1 y No. 2, así como en el reactivo de color, no interfiere con la calidad de los mismos. Todas las recomendaciones del fabricante con relación a la conservación y su almacenamiento, deben seguirse sin excepción.

Método de Acido Úrico para suero. (Caraway Modificado)

- 1.- Para desproteínizar la muestra, en tubo de centrifuga colocar:

Agua destilada	8.0 ml
Reactivo desproteínizante (No. 1)	1.0 ml
Muestra	1.0 ml

- 2.- Agitar fuertemente y centrifugar durante 5 minutos a 2500 - 3000 r.p.m.

- 3.- Identificar y marcar 3 tubos de ensayo y proceder como sigue:

	BLANCO	MUESTRA	PATRON
Sobrenadante (Paso 1)	-	5.0 ml	-
Agua destilada	5.0 ml	-	5.0 ml
Patrón (No. 4)	-	-	0.05 ml
Carbonato de sodio (No. 2)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- 4.- Mezclar bien y esperar 10 minutos. Luego agregar:

Reactivo de color (No. 3)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
-----------------------------	--------	--------	--------

5.- Agitar bien y dejar en reposo por 20 minutos. Determinar las absorbancias a 700 nm o con filtro rojo, ajustando a cero con el blanco. El color es estable durante 30 minutos.

CALCULOS:

$$\text{Acido Urico (mg/100 ml)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 10$$

Como el sistema colorimétrico sigue estrictamente la Ley de Beer, también puede usarse el método del factor para el cálculo de los resultados:

$$\text{Factor de calibración} = \frac{10}{\text{Absorbancia del patrón}}$$

$$\text{Concentración de la muestra (mg/100 ml)} = \text{Absorbancia de la muestra} \times \text{Factor.}$$

VALORES LIMITES DE REFERENCIA (Normales):

Suero: Hombres de 2.5 a 7.0 mg/100 ml

Mujeres de 1.5 a 6.0 mg/100 ml

RECOMENDACIONES IMPORTANTES:

- 1.- Para obtener resultados exactos y confiables, seguir rigurosamente las indicaciones de el método propuesto.
- 2.- BIODON prepara meticulosamente todos sus reactivos, de tal manera que los resultados obtenidos por el usuario sean reproducibles.
- 3.- Es conveniente comprobar periódicamente la calibración del aparato para así poder detectar alguna alteración o irregularidad en la respuesta del fotocolorímetro o del espectrofotómetro. El máximo de error permitido no debe ser superior al 10 % con respecto al valor preestablecido.

4.- Para obtener resultados correctos deberán cumplirse exactamente las recomendaciones sobre almacenaje y conservación de los reactivos.

5.- El material de vidrio utilizado debe estar bien limpio y seco.

Determinación de Linealidad del Sistema de Medición:

Un analista debe preparar por lo menos tres diluciones, por duplicado, de manera independiente, a partir de una misma solución patrón de la sustancia de interés, y medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. La linealidad debe incluir por lo menos el intervalo de la especificación del método de prueba, en el cual se utilice el método analítico.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de la dilución
de la solución patrón (x)

Propiedad medida

x1	y11, y12 ..., y1n
x2	y21, y22 ..., y2n
.	.
.	.
.	.
xt	yt1, yt2 ..., ytn

t = número de diluciones

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

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de repeticiones por dilución, sean las mismas.

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

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

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

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

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

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

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

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

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

4) Cálculos para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{conc. de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

·
·
·

4.2 Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$\bar{F} = \frac{F}{N}$$

donde: N = número de puntos de la linealidad del sistema.

5) Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F)^2 - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

Determinación de Precisión del Sistema de Medición:

Un analista debe preparar de manera independiente por lo menos 6 diluciones, equivalentes al 100% de lo indicado en el método analítico; a partir de la misma solución patrón de la sustancia de interés, y medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

1) Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_N$$

2) Cálculos preliminares.

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_N$$

$$\Sigma x^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N (\overline{fy})^2 - (\overline{fy})^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos finales.

Coefficiente de variación :

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

Determinación de Exactitud al 100% :

Un analista, debe preparar de manera independiente, por lo menos 6 placebos adicionados al 100% de la cantidad de la sustancia de interés indicada en la fórmula unitaria, y recuperar la sustancia de interés, mediante el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

- 1) Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato:

R1 , R2 , R3 ,, RN

- 2) Cálculos preliminares:

$$ER = R1 + R2 + R3 + \dots + RN$$

$$ER^2 = R1^2 + R2^2 + R3^2 + \dots + RN^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum ER}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N \sum (ER)^2 - (\sum ER)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

3) Cálculos Finales:

Coefficiente de variación

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

Determinación de Linealidad del método de medición :

Un analista debe de preparar de manera independiente, por lo menos por duplicado, como mínimo 3 cantidades adicionadas de la sustancia de interés, y recuperar la sustancia de interés utilizando el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

A. Cantidad Adicionada - Cantidad Recuperada

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad Adicionada (x)	Cantidad Recuperada (y)
x11, x12, ... , x1n	y11, y12, ... , y1n
x21, x22, ... , x2n	y21, y22, ... , y2n
.
xt1, xt2, ... , xtn	yt1, yt2, ... , ytn

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidades recuperadas) 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:

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

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

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

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

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

3) Cálculos finales:

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

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

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

B. 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:

$$\Sigma R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2, R_2^2, R_3^2, \dots, R_n^2$$

$$R = (\overline{ER}) / N \quad DE = \left[\frac{N(\overline{ER})^2 - (\overline{ER})^2}{N(N-1)} \right]$$

3) Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = (DE / R) 100$$

Determinación de Precisión :

Por lo menos dos analistas, en por lo menos dos determinaciones independientes, deben analizar independientemente, una muestra homogénea del producto, conteniendo la sustancia de interés a un valor cercano del 100% de lo indicado en la fórmula unitaria, empleando el método de medición.

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

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o 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:

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	y111	y111
		y112	y212
		y113	y213
	2	y121	y221
		y122	y222
		y123	y223

2. Cálculos preliminares:

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

$$E_y \dots = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$\bar{y} = y \dots / N$$

$$DE = \left[\frac{N (E_y \dots) - (y \dots)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones

3. Cálculos Finales:

Coefficiente de variación:

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

Determinación de Estabilidad de la Muestra :

Un analista debe analizar por lo menos por triplicado una muestra homogénea, debe almacenar las muestras sometidas al método de medición a distintas condiciones de almacenaje durante un tiempo preestablecido, y reanalizar las muestras, utilizando una solución patrón recientemente preparada para cada tiempo de reanálisis, de acuerdo a lo establecido en el método de medición.

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:

	CONDICION /		TIEMPO
INICIAL	1	2	m
Y1	Y4	Y7	Yn-2
Y2	Y5	Y8	Yn-1
Y3	Y6	Y9	Yn

2. Cálculos preliminares para el intervalo de confianzas:

MEDIA	\bar{Y}_0	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_m
VARIANZA	S_0^2	S_1^2	S_2^2	S_m^2

Varianza Ponderada:

$$Sp1 = \frac{\frac{2}{2S_0} + \frac{2}{2S_1}}{2(c+1)}$$

$$Sp2 = \frac{\frac{2}{2S_0} + \frac{2}{2S_2}}{2(c+1)}$$

$$Spm = \frac{\frac{2}{2S_0} + \frac{2}{2S_m}}{2(c+1)}$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza :
Para cada condición x tiempo :

$$IC = (\bar{Y}_i - Y_0) +/- t^* \times \sqrt{S_{pi}^2 \left[\frac{2}{3} \right]}$$

Donde :

t* = valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2 (c + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.795.

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación :

Para cada condición / tiempo / muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra / condición / tiempo}) i}{(\text{análisis inicial } i)} \times 100$$

$$I1 = \frac{Y4}{Y1} \times 100$$

$$I6 = \frac{Y9}{Y3} \times 100$$

$$I2 = \frac{Y5}{Y2} \times 100$$

$$I7 = \frac{Y_{n-2}}{Y1} \times 100$$

$$I3 = \frac{Y6}{Y3} \times 100$$

$$I8 = \frac{Y_{n-1}}{Y2} \times 100$$

$$I4 = \frac{Y7}{Y1} \times 100$$

$$I9 = \frac{Y_n}{Y3} \times 100$$

$$I5 = \frac{Y8}{Y2} \times 100$$

Para cada condición / tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\sum I (\text{condición / tiempo})}{N}$$

donde :

N = número de muestras por cada condición / tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del factor (I) para cada condición / tiempo deberá cumplir con los siguientes criterios :

METODO	VALOR DE I
Cromatográficos	98 - 102 %
Titrimétricos	98 - 102 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %
Microbiológicos	95 - 105 %

Determinación de Límite de Detección :

Un analista debe preparar por lo menos tres diluciones, por duplicado, de manera independiente; a partir de una misma solución patrón de la sustancia de interés, procurando obtener respuestas bajas del sistema de medición; y por lo menos cinco blancos. Medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

- 1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

CONCENTRACION (X)	PROPIEDAD MEDIDA (Y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____
BLANCOS	
1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
5	_____

- 2) Calcular la suma de de la concentración ($\sum X$), la suma de cuadrados de la concentración ($\sum X^2$), la suma de la propiedad medida ($\sum Y$), la suma de cuadrados de la propiedad medida ($\sum Y^2$), la suma del producto de la concentración por la propiedad medida ($\sum Xy$), determinar el número de concentraciones (t), el número de replicaciones por concentración (r), el número de pares ordenados ($n = rt$), la suma de la propiedad medida de los blancos ($\sum Y'$), la suma de cuadrados de la propiedad medida de los blancos ($\sum Y'^2$) y el número de los blancos ($n' = 5$).

$$\Sigma x = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma y = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma x^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma y^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma xy = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$t = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$r = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n = rt = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma y' = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma y'^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n' = 5$$

3) Calcular el valor de la pendiente (m) de la relación concentración propiedad medida.

$$m = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

4) Calcular la desviación estándar de los blancos (Sb), con la siguiente ecuación.

$$S_b = \left[\frac{5 \Sigma y'^2 - (\Sigma y')^2}{n' (n' - 1)} \right]^{1/2}$$

5) Calcular el límite de detección (LD), con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3 S_b}{m}$$

R E S U L T A D O S

TABLA 1. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION
PARA DETECCION DE GLUCOSA

% Adicionado	mg Adicionados	Absorbancias obtenidas		
		A1	A2	A3
20	.1996	.05	.06	.05
40	.39841	.1	.1	.1
60	.79365	.19	.19	.19
120	1.18577	.27	.28	.28

Pendiente = .2263166

Límite superior del intervalo de confianza = .2327697

Límite inferior del intervalo de confianza = .2198635

tcal = 78.1419

Ordenada al origen = .0091712

Límite superior del intervalo de confianza = .0139943

Límite inferior del intervalo de confianza = .0091712

Desviación estándar de regresión = .0037996

Coefficiente de variación = 2.451374

TABLA 2. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal
Regresión	1	.0881557	.881557	6106.161
Error de Regresión	10	.0001444	.0000144	
Falta de ajuste	2	.000011	.0000055	.3310796
Error puro	8	.0001333	.0000167	

COEFICIENTE DE DETERMINACION $R^2 = 0.9983652$

TABLA 3. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

PARA DETECCION DE UREA

% Adicionado	mg Adicionados	Absorbancias obtenidas		
		A1	A2	A3
50	.15968	.20	.19	.20
100	.31936	.35	.33	.36
200	.63872	.60	.60	.60
300	.95808	.85	.83	.83

Pendiente = 12.5367

Límite superior del intervalo de confianza = 13.5609

Límite inferior del intervalo de confianza = 11.5125

tcal = 25.09

Ordenada al origen = 0.1201

Límite superior del intervalo de confianza = .158743

Límite inferior del intervalo de confianza = .0814

tcal = 6.91

TABLA 4. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal
Regresión	1	.6955	.6955	743
Error de Regresión	10	9.4x10 ⁻³	9x10 ⁻⁴	4.7x10 ⁻⁶

COEFICIENTE DE DETERMINACION R² = 0.9877

TABLA 5. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

PARA DETECCION DE ACIDO URICO

% Adicionado	mg Adicionados	Absorbancias obtenidas		
		A1	A2	A3
20	.1996	.08	.08	.08
40	.39841	.18	.17	.16
80	.79365	.33	.33	.33
120	1.18577	.49	.49	.50

Pendiente = 8.033

Límite superior del intervalo de confianza = 8.2353

Límite inferior del intervalo de confianza = 7.8325

tcal = 77.8124

Ordenada al origen = 6×10^{-4}

Límite superior del intervalo de confianza = 8.2×10^{-3}

Límite inferior del intervalo de confianza = -7×10^{-3}

tcal = 0.1656

TABLA 6. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal
Regresión	1	.2856	.2856	7898.7
Error de Regresión	10	4×10^{-4}	4×10^{-5}	1.45×10^{-6}

COEFICIENTE DE DETERMINACION $R^2 = 0.9987$

TABLA 7. RESULTADOS DE PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA, UREA Y ACIDO URICO

Cantidad adicionada	Absorbancias Obtenidas									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Glucosa	.22	.23	.22	.22	.22	.23	.22	.21	.22	.22
Urea	.35	.34	.35	.35	.34	.35	.33	.35	.35	.35
Acido Urico	.43	.40	.39	.42	.40	.40	.43	.42	.42	.42

TABLA 8. ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

	Media Aritmetica	Desviación estándar	Coficiente de variación	Error estándar
Glucosa	.221	.00568	2.56843	.00179
Urea	.346	.00044	.006633	1.917124
Acido Urico	.413	.000181	.013453	3.25756

TABLA 9. RESULTADOS DE EXACTITUD AL 100 % DEL METODO PARA

LA DETERMINACION DE GLUCOSA Y UREA

% Adicionado	% Recuperado	
	Glucosa	Urea
100	100.00	104.7619
100	100.00	95.23809
100	94.12	112.8205
100	105.88	87.1794
100	96.00	98.1132
100	104.00	101.8867
100	96.97	97.05882
100	103.03	102.9411
100	97.56	
100	102.44	

TABLA 10. ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

	Varianza	Desviación estándar	Coficiente de variación	LSIC	LIIC
Glucosa	14.60747	3.821973	3.821973	102.7341	97.2658
Urea	49.81294	7.05828	0.070578	114.1156	85.8843

TABLA 11. RESULTADOS DE EXACTITUD AL 100 % DEL METODO PARA

LA DETERMINACION DE ACIDO URICO

% Adicionado	% Recuperado	
	A C I D O	U R I C O
0		0
20		102.3809
40		102.3809
60		102.3809
80		99.404776
100		100.000

TABLA 12. ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

	Varianza	Desviación estándar	Coficiente de variación	LSIC	LIIC
Acido Urico		1.757369	0.017346	104.7188	97.90022

TABLA 13. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION
 DE GLUCOSA

		Analista 1		Analista 2	
Dia 1		.20	.19	.17	.17
		.19	.18	.16	.16
		.19	.19	.16	.17
		.19	.19	.16	.17
		.20	.19	.17	.15
Dia 2		.18	.18	.19	.18
		.19	.19	.17	.17
		.19	.18	.16	.16
		.19	.19	.18	.16
		.18	.19	.18	.16

Evaluación de la precisión:

$$\begin{array}{ll}
 Y_{11} = 1061.11 & DE = 9.917 \times 10^{-4} \\
 Y_{12} = 1033.33 & \\
 Y_{21} = 911.11 & C.V. = 5.6428 \times 10^{-3} \\
 Y_{22} = 950.00 &
 \end{array}$$

TABLA 14. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	Ftablas
Analista	1	1362.4725	1362.4725	23.81	0.03622
Dia	2	114.44154	57.220772	3.2390	0.04955
Error	36	635.97552	17.665986		

TABLA 15. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION

DE UREA

	Analista 1	Analista 2
Dia 1	.13	.13
	.13	.12
	.13	.13
	.14	.11
	.13	.12
Dia 2	.12	.12
	.13	.12
	.13	.12
	.12	.11
	.12	.12

Evaluación de la precisión:

$$E_{y^2i} = .30784$$

$$Y_{11} = .66$$

$$DE = 1.2448$$

$$E_{E^2ij} = .30804$$

$$Y_{12} = .62$$

$$C.V. = 0.154364$$

$$Y_{.ijk} = .30752$$

$$Y_{21} = .61$$

$$E_{EE^2ijk} = .3086$$

$$Y_{22} = .59$$

TABLA 16. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	Ftablas
Analista	1	.00032	.00032	3.2	38.51
Dia	2	.0002	.0001	2.8571	4.69
Error	16	.00056	.000035		

TABLA 17. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION
 DE ACIDO URICO

	Analista 1	Analista 2
Dia 1	.2	.2
	.2	.2
	.19	.2
	.2	.19
	.2	.19
Dia 2	.19	.2
	.2	.2
	.2	.19
	.2	.19
	.19	.2

Evaluación de la precisión:

$$E_{y^2 i} = .77225$$

$$E_{E^2 ij} = .77226$$

$$Y_{.ijk} = .772245$$

$$E_{E^2 ijk} = .7727$$

$$Y_{11} = 0.99$$

$$Y_{12} = 0.98$$

$$Y_{21} = 0.98$$

$$Y_{22} = 0.98$$

$$DE = 2.3947 \times 10^{-5}$$

$$C.V. = 0.00012186$$

TABLA 18. ANALISIS DE LA VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	Ftablas
Analista	1	.000005	.000005	1	38.51
Dia	2	.00001	.000005	.181818	4.69
Error	16	.00044	.000027		

TABLA 19. RESULTADOS DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Estabilidad de la muestra realizada en refrigeración, y temperatura ambiente (sin refrigeración). Durante 120 hrs.

(Glucosa , Urea y Acido Urico)

Tiempo	Media Aritmetica			t de Dunnett calculada		
	Glucosa	Urea	Ac.Urico	Glucosa	Urea	Acido Urico
Cero	100	100	100	----	----	-----
Refrigeración 5 días	102.28	107.63	100	1.396	1.816	1.701412E+38
Sin Refrigeración 5 días	73.072	94.727	78	-16.427	-1.254	-1.701412E+38

t de Dunnett de tablas con $\alpha = 0.05 = \pm 2.96$

TABLA 20. RESULTADOS DE LIMITE DE DETECCION PARA
LA DETERMINACION DE GLUCOSA

% Adicionado mg Adicionados	Absorbancias Obtenidas			Absorbancias Blancos	
	A1	A2	A3		
20	20	.05	.05	.05	.000 .000
40	40	.09	.08	.09	.003 .002
80	60	.12	.12	.13	.000 .000
80	80	.17	.16	.16	

Promedio aritmetico de los blancos = .008333
 Desviación estándar de los blancos = .0013292
 Pendiente = .0017417
 Límite superior del intervalo de confianza = .0018552
 Límite inferior del intervalo de confianza = .0016281
 tcal = 34.1751544

Desviación estándar de regresión = .0039476
 Coeficiente de variación = 4.2107446
 Coeficiente de determinación = .9915106
 Límite de detección = 4.5789249 mg %

TABLA 21. RESULTADOS DE LIMITE DE DETECCION PARA

LA DETERMINACION DE UREA

% Adicionado	mg Adicionados	Absorbancias A1	Absorbancias A2	Absorbancias Obtenidas A3	Absorbancias Blancos
50	50	0.22	0.19	0.17	.000 .000
100	100	0.35	0.34	0.35	.003 .002
150	150	0.49	0.47	0.45	.000 .000
200	200	0.62	0.58	0.63	

$$\begin{aligned} E_x &= 0.3 & E_y &= 4.86 \\ E_{x^2} &= 0.009 & E_{y^2} &= 2.2552 \\ E_{xy} &= 0.1421 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E_{y'} &= 0.005 \\ E_{y'^2} &= 0.000013 \\ n' &= 6 \end{aligned}$$

$$\text{VALOR DE LA PENDIENTE} = 13.73333$$

$$\text{DESVIACION ESTANDAR DE LOS BLANCOS} = 0.001329$$

$$\text{LIMITE DE DETECCION} = 0.000290$$

TABLA 22. RESULTADOS DE LIMITE DE DETECCION PARA

LA DETERMINACION DE ACIDO URICO

% Adicionado	mg Adicionados	Absorbancias Obtenidas			Absorbancias Blancos
		A1	A2	A3	
20	20	0.07	0.08	0.08	.002 .003
40	40	0.16	0.16	0.15	.000 .000
60	60	0.21	0.23	0.23	.002 .000
80	80	0.32	0.31	0.28	

$$\begin{aligned} E_x &= 0.3 \\ E_{x^2} &= 0.009 \\ E_{xy} &= 0.0682 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E_y &= 2.28 \\ E_{y^2} &= 0.5182 \end{aligned}$$

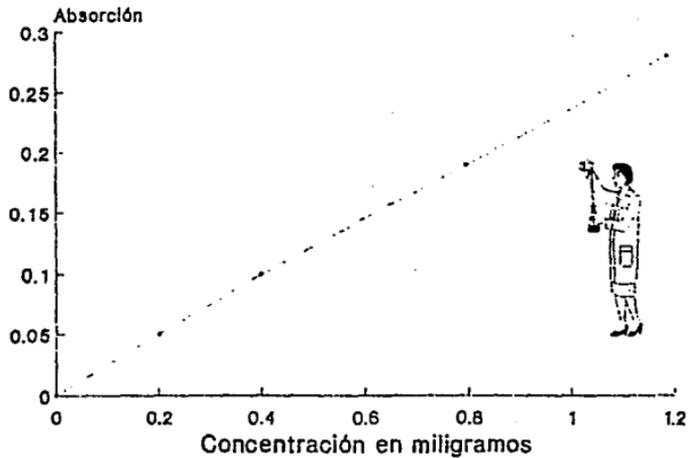
$$\begin{aligned} E_{y'} &= 0.007 \\ E_{y'^2} &= 0.000017 \\ n' &= 6 \end{aligned}$$

VALOR DE LA PENDIENTE = 7.466666

DESVIACION ESTANDAR DE LOS BLANCOS = 0.001329

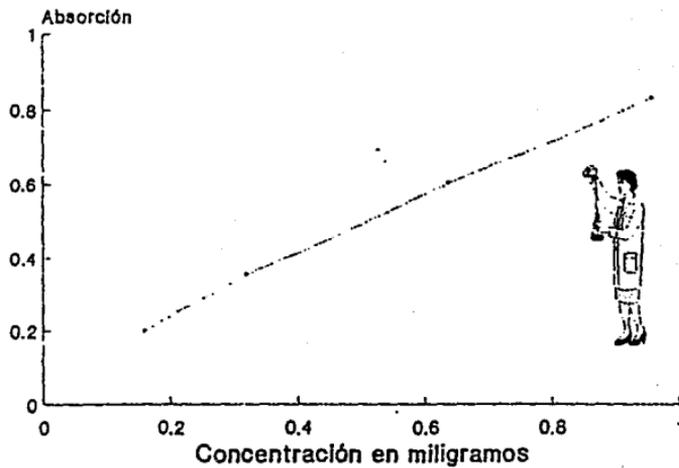
LIMITE DE DETECCION = 0.000534

Linealidad del Sistema de Medición --Glucosa--



Gráfica 1

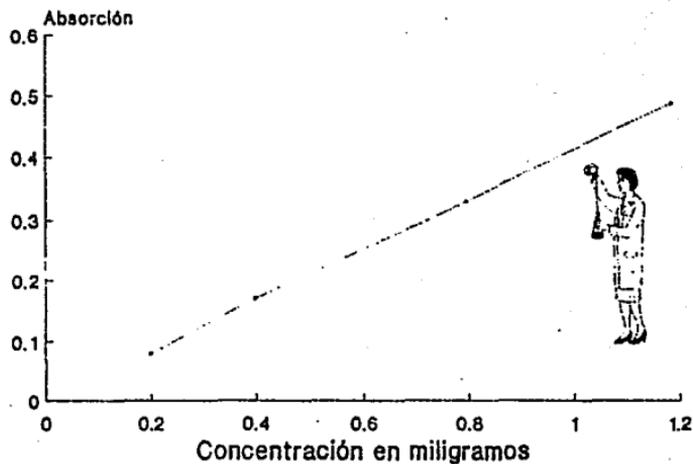
Linealidad del Sistema de Medición --Urea--



Gráfica 2

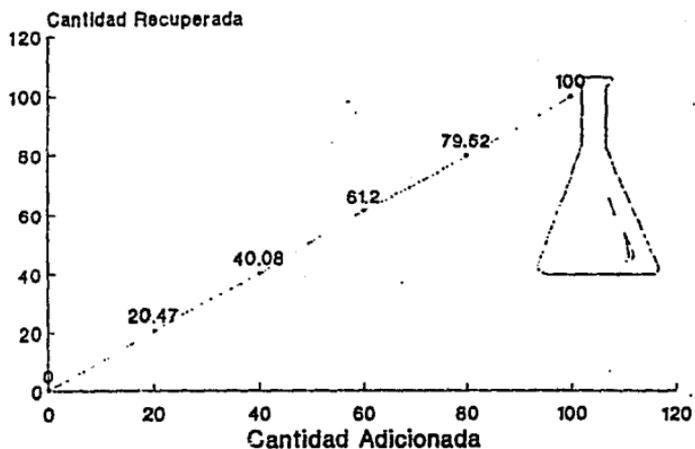
09

Linealidad del Sistema de Medición --Acido Urico--



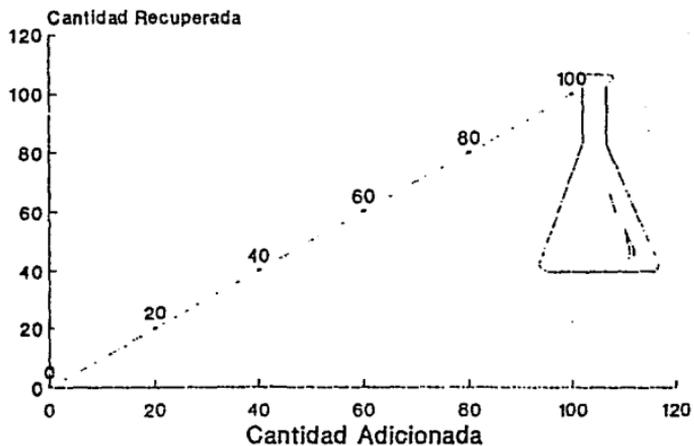
Gráfica 3

Linealidad del Método de Medición -- Acido Urico --



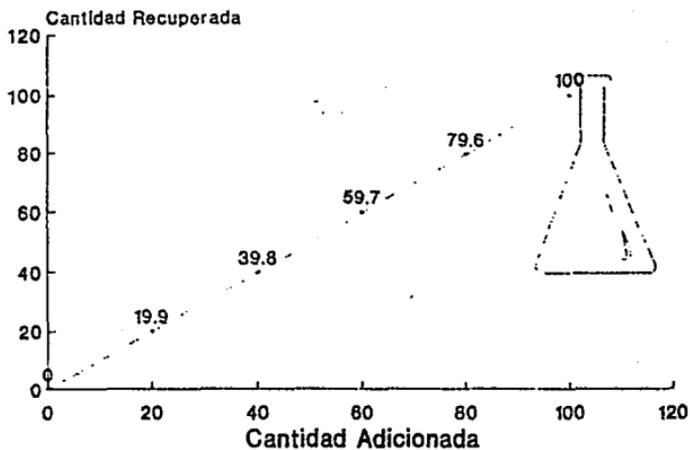
Gráfica 4.

Linealidad del Método de Medición -- Glucosa --



Gráfica 5.

Linealidad del Método de Medición -- Urea --



Gráfica 6.

D I S C U S I O N

En la validación cada procedimiento dirigido a generar un resultado (determinación de la Glucosa por la técnica de O-toluidina y Urea por la técnica de Diacetilmonoxima) implicaron una serie de pasos que nos permitieron alcanzar condiciones próximas al nivel óptimo y en consecuencia mejorar su exactitud, precisión y linealidad de cada determinación lo que no ocurrió en el caso para la determinación de Acido Úrico por la técnica de Caraway modificada encontrando los siguientes resultados:

Los resultados de linealidad del sistema de medición muestran como se puede observar en la grafica 1,2 y 3, una linealidad tanto para la Glucosa, Urea y Acido Úrico. Existiendo relación altamente significativa entre mg %-absorbancia, donde: $r^2=0.998352$ para Glucosa, $r^2= 0.9877$ para Urea y $r^2= 0.9987$ para Acido Úrico.

En la determinación de precisión del sistema de medición de los métodos de Glucosa y Urea, tomando en cuenta la regla establecida para la precisión que es un C.V. $\leq 3.0 \%$, se tiene que son precisos, puesto que se obtuvieron C.V., menores al establecido. Estos fueron: 2.5684 para Glucosa y 1.917 para Urea. Se observa que el Acido Úrico presentó un C.V. mayor de 3.0 %, lo que lo hace no preciso. Esto pudo ser resultado de que el método se realizó con cantidades menores a las establecidas por la técnica de análisis según Bioxon, puesto que no se contaba con el reactivo suficiente para la determinación.

En cuanto a la exactitud al 100%, los tres métodos presentaron tanto un límite superior de intervalo de confianza mayor al 100%, y un límite inferior de intervalo de confianza menor al 100%, por lo que los tres métodos abarca el 100%, haciendolos exactos.

La reproducibilidad del método se determinó realizando un análisis de varianza con dos criterios de clasificación entre analista y día. La tabla No. 13, 15 y 17 muestran recobros obtenidos por dos diferentes analistas en dos diferentes días. La tabla No. 14 que corresponde a la Glucosa, muestra que se ve afectada la reproducibilidad por el día y por el analista puesto que la Fcal para el día y para el analista fué mayor que la Ftablas lo que hace no reproducible el método de Glucosa, y obteniendo un C.V. = 0.005642. En la tabla No. 16 y 18 que corresponde a Urea y Acido Úrico muestran que no fué afectada la reproducibilidad por el día, ni por el analista, ya que la Fcal es menor que la Ftablas para el día y el analista, lo que hace reproducibles los métodos.

La estabilidad de la muestra se evaluó a diferentes condiciones (temperatura ambiente y refrigeración durante 120 hrs.), como se observa en la tabla No. 19, la evaluación se realizó comparandose con un control, que es el valor de la "t" de Dunnett, donde se ve que las muestras a diferentes condiciones de temperatura son estables para la determinación de Urea durante las 120 hrs., en cambio para la determinación de Glucosa ésta sólo se vió afectada al dejarla a temperatura ambiente durante las 120 hrs. y sin sufrir cambio alguno en refrigeración. Por último el Acido Úrico mostró inestabilidad en ambos casos.

En el parámetro de límite de detección, la mínima concentración de cada metabolito fué detectada y cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

C O N C L U S I O N E S

La validación de los métodos analíticos para la determinación de Glucosa y Urea establecidos por Bioxon muestran por estudios de Laboratorio que son precisos, exactos y lineales por lo que la capacidad del método satisface los requisitos y es confiable para la aplicación analítica deseada en este caso cuantificación de dichos analitos.

Sin embargo los resultados de la ejecución analítica obtenidos para el Acido Urico, se observan que no son repetitibles ni reproducibles por lo que es necesario realizar una revisión de la viabilidad de los reactivos o de la precisión y exactitud del método analítico empleado.

A continuación se observan las diferencias entre cada metabolito, donde se puede ver los parametros por lo que fueron validados o no:

PARAMETROS	A N A L I T O S		
	GLUCOSA	UREA	AC. URICO
LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION	R ² = 0.998365	R ² = 0.9877	R ² = 0.9987
PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION	DE = 0.0568 CV = 2.568	DE=0.00044 CV=0.00663	DE = 0.000181 CV = 0.013433
EXACTITUD AL 100 %	LSIC=102.7341 LIIC=97.2658	114.1156 85.8843	104.7188 97.90022
PRECISION DEL METODO DE MEDICION	Fcal día= 3.2390 Ftab día=0.04955 Fcal anal.=23.81 Ftab anal.=0.036	2.8571 4.8571 3.2 38.51	0.181818 4.69 1 38.51
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	t de Dunnett cal en refriger=1.396 t de Dunnett cal sin refriger=-16.4 t de Dunnett de tablas = 2.96	1.816 -1.254 2.96	1.701412E + 38 -1.701412E + 38 2.96
LIMITE DE DETECCION	4.578924	0.000290	0.000534

R E C O M E N D A C I O N E S

Para demostrar que las variaciones efectuadas en las técnicas de análisis para la determinación de metabolitos se ven afectadas por las necesidades del Laboratorio clínico, es necesario llevar a cabo una validación de estas técnicas con dichas variaciones, para demostrar que tienen un buen control de calidad.

Un método validado es necesario pero no suficiente para la producción de datos útiles, dado que se requiere de un grado de habilidad por parte del analista y esta habilidad constituye un factor crítico en el proceso de medición que debe ser evaluado. Es común que los datos obtenidos por diferentes Laboratorios sobre la misma muestra, utilizando el mismo método, puedan mostrar un alto grado de variabilidad, que es detectado por técnicas estadísticas y por tal razón sería recomendable el análisis interlaboratorial en el proceso de validación.

Cabe señalar que la validez dependerá de las condiciones establecidas y del plan de muestreo. Las condiciones representan la conceptualización del problema que se debe de resolver y el plan de muestra que debe ser analizada y los datos que se requieren.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Castillo de Sánchez M.L. El Proyecto México de Química Clínica. Bioquímica. 1988. Vol.1. 25-32.
- 2) Vargas de Cabral M. Proyecto México de Química Clínica II (Distribución de sueros y evaluación de datos). Bioquímica. 1988. Vol. 2. 22-23.
- 3) Castillo de Sánchez M.L. Proyecto México de Química Clínica III (Cursos Básicos de Entrenamiento para Tutores en Química Clínica " en cascada "). Bioquímica. 1988. Vol. 13. 3. 25-29.
- 4) Lastra Azpilicueta M. D., Sánchez de Jiménez E., Valles de Bourges V., Vázquez Ramos J., Velázquez Madrazo O. Proyecto México de Química Clínica IV (Estudios de Especialización en Bioquímica Clínica en México. Bioquímica. 1988. Vol. 13. 3. 25-29.
- 5) Torres de Espejo M., Jiménez Martínez V. Proyecto México de Química Clínica V (Elaboración de Sueros Control). Bioquímica. 1989. Vol. 14. 1. 26-30.
- 6) Reunión Nacional del Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Bioquímica. 1989. Vol. 3. 33-36.
- 7) Vargas de Cabral M., Castillo de Sánchez M.L., Alva Estrada S. Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Resultados Generales. Bioquímica. 1989. Vol. 14. 3. 33-36.

- 8) Vargas de Cabral M., Castillo de Sánchez M.L., Alva Estrada S. Resultados de la Evaluación Externa de la Calidad en las Determinaciones de Glucosa y Colesterol. Bioquímica. 1989. Vol. 14. 4. 27-34.
- 9) Fonseca Yerena M. E., Castillo de Sánchez M.L., Cortés Arellano L.E. Resultados Preliminares del Proyecto de Investigación, Estandarización y Confirmación de la Calidad Analítica de la Medición de Colesterol Serico. Bioquímica. 1991. Vol. 16. 61 17-21.
- 10) Castillo de Sánchez M.L., Valencia Font E. Proyecto " Encuesta entre 26 Laboratorios Clínicos del Istmo Centroamericano con la finalidad de Medir la Precisión y la Exactitud Previamente al Establecimiento de Sistema de Control de Calidad Global ". Bioquímica. 1991. Vol. 16. 63. 17-23.
- 11) Alvar L. Ciencia y Diseño Experimental. Bioquímica. 1980. Vol. 3 17. 480-484.
- 12) Buttner J. R. Borth P. M. G. Control de Calidad. Bioquímica. 1980. Vol. 17 504-511.
- 13) López S. S. Valores de Referencia para Glucosa, Urea, Creatinina, Acido Urico, Hemoglobina y Hematocrito en una Población Adulta, Bioquímica. 1991. Vol. 16. 64. 22-26.
- 14) Lawrence A. Kaplan " Química Clínica " Técnicas de Laboratorio Fisiopatología-Métodos de análisis. Editorial Medica Panamericana. S.A. Buenos Aires. 1986. pp. 1217, 1489, 1491.

- 15) Richard J. Henry. M. D. Química Clínica, Principios y Técnicas. Tomo I. Segunda Edición. Editorial JIMS. Barcelona. 1980. pp 285-323 y 339-341.

- 16) Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. Tomo I. Octava Edición. Editorial Salvat. Barcelona (España). 1988. p.3-4

- 17) Parkin R. A. and Pegrum G. D. Las Bases del Diagnostico Clínico. Editorial Continental S.A. Barcelona (España). 1980. p. 26-28.

- 18) Daniel, Wayne w.. Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa. México. 1978

A N E X O

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
PRODUCTOS FARMACEUTICOS SA DE CV, LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = GLUCOSA ORTOTOLOUIDINA (BIOXON)
NOMBRE DEL ANALISTA = JUANA Y FELICITAS
NOMBRE DE LA CANTIDAD ADICIONADA = mg %
NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
NIVELES DE mg % = 4

LISTA DE DATOS

VALOR DE mg % = .1996
NUMERO DE REPLICACIONES = 3
LISTA DE VALORES DE ABSORBANCIA

Y (1,1) = .05
Y (1,2) = .06
Y (1,3) = .05

VALOR DE mg % = .398441
NUMERO DE REPLICACIONES = 3
LISTA DE VALORES DE ABSORBANCIA

Y (2,1) = .1
Y (2,2) = .1
Y (2,3) = .1

VALOR DE mg % = .79365
NUMERO DE REPLICACIONES = 3
LISTA DE VALORES DE ABSORBANCIA

Y (3,1) = .19
Y (3,2) = .19
Y (3,3) = .19

VALOR DE mg % = 1.18577
NUMERO DE REPLICACIONES = 3
LISTA DE VALORES DE ABSORBANCIA

Y (4,1) = .27
Y (4,2) = .28
Y (4,3) = .28

INFERENCIA DE PENDIENTE Y ORDENADA AL ORIGEN

PENDIENTE = .2263166
LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .2327697
LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .2198635
t cal = 78.1419

ORDENADA AL ORIGEN = .0091712
LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .0139943
LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .0091712
t cal = 4.236768

DESVIACION ESTANDAR DE REGRESION = .0037996
COEFICIENTE DE VARIACION = 2.45374

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

LA ORDENADA DE LA RELACION LINEAL mg % - ABSORBANCIA PASA POR EL
ORIGEN

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION = REGRESION
SUMA DE CUADRADOS = .0881557
GRADOS DE LIBERTAD = 1
MEDIA DE CUADRADOS = .0881557
F cal = 6106.161 P (F cal) = 1.59198E-06

FUENTE DE VARIACION = ERROR DE REGRESION
SUMA DE CUADRADOS = .0001444
GRADOS DE LIBERTAD = 10
MEDIA DE CUADRADOS = .0000144

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION = FALTA DE AJUSTE
SUMA DE CUADRADOS = .000011
GRADOS DE LIBERTAD = 2
MEDIA DE CUADRADOS = .0000055
F cal = .3310796 P (F cal) = .7306086

FUENTE DE VARIACION = ERROR PURO
SUMA DE CUADRADOS = .0001333
GRADOS DE LIBERTAD = 8
MEDIA DE CUADRADOS = .0000167

INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

EXISTE RELACION ALTAMENTE SIGNIFICATIVA DE mg % Y ABSORBANCIA
EL MODELO LINEAL REPRESENTA DE MANERA CORRECTA LA RELACION mg % Y
ABSORBANCIA

MODELO EMPIRICO

.0091712 ORDENADA AL ORIGEN
 DE ABSORBANCIA

.2263166 LINEAL DE mg %

CAPACIDAD PREDICTIVA DEL MODELO EMPIRICO

CANTIDAD ADICIONADA PREDICCION

.1996	5.434402E-02
.39841	.099338
.79365	.1887874
1.18577	.2775306

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION DE UREA

INFERENCIA DE PENDIENTE Y ORDENADA AL ORIGEN

PENDIENTE = 12.5319

LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = 13.5609

LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = 12.5125

t cal = 25.09

ORDENADA AL ORIGEN = .1201

LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .158743

LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = .0814

t cal = 6.91

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

LA ORDENADA AL ORIGEN TIENE UNA RELACION LINEAL Y NO PASA POR EL ORIGEN

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	G.L	SC	MC	F
REGRESION	1	0.6955	0.6955	F cal 743
ERROR	10	9.4×10^{-3}	9×10^{-4}	4.7×10^{-4}
P de F cal = 4.78×10^{-6}				

INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

NO HAY FALTA DE AJUSTE

EXISTE UNA RELACION SIGNIFICATIVA ENTRE EL PATRON Y ABSORCION

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.9877

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION DE ACIDO URICO

INFERENCIA DE PENDIENTE Y ORDENADA AL ORIGEN

PENDIENTE = 8.033

LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = 8.2353

LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = 7.8325

t cal = 77.8124

ORDENADA AL ORIGEN = 6×10^{-4}

LIMITE SUPERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = 8.2×10^{-3}

LIMITE INFERIOR DE INTERVALO DE CONFIANZA = -7×10^{-3}

t cal = 0.1656

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

LA ORDENADA AL ORIGEN TIENE UNA RELACION LINEAL Y PASA POR EL ORIGEN

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	G.L	SC	MC	F
REGRESION	1	0.2856	0.2856	7898.7
ERROR	10	4×10^{-4}	4×10^{-5}	

P de F cal = 1.45×10^{-6}

INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

NO HAY FALTA DE AJUSTE

EXISTE UNA RELACION SIGNIFICATIVA ENTRE EL PATRON Y ABSORCION

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.9987

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
PRODUCTOS FARMACEUTICOS SA DE CV, LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
EVALUACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = G L U C O S A
NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = mg %
NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
NUMERO DE DETERMINACIONES = 10

PROPIEDAD MEDIDA

Y (1) = .22
Y (2) = .23
Y (3) = .22
Y (4) = .22
Y (5) = .22
Y (6) = .23
Y (7) = .22
Y (8) = .21
Y (9) = .22
Y (10) = .22

ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

MEDIA ARITMETICA = .221
DESVIACION ESTANDAR = .00568
COEFICIENTE DE VARIACION = 2.56843
ERROR ESTANDAR = .00179

EXISTE PRECISION DE SISTEMA DE MEDICION

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
PRODUCTOS FARMACEUTICOS SA DE CV, LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
EVALUACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = U R E A
NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = mg %
NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
NUMERO DE DETERMINACIONES = 10

PROPIEDAD MEDIDA

Y (1) = .35
Y (2) = .34
Y (3) = .35
Y (4) = .35
Y (5) = .34
Y (6) = .35
Y (7) = .33
Y (8) = .35
Y (9) = .35
Y (10) = .35

ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

MEDIA ARITMETICA = 0.346
VARIANZA = 0.000044
DESVIACION ESTANDAR = .006633
COEFICIENTE DE VARIACION = 1.917124

EXISTE PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
PRODUCTOS FARMACEUTICOS SA DE CV, LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
EVALUACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = A C I D O U R I C O
NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = mg %
NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
NUMERO DE DETERMINACIONES = 10

PROPIEDAD MEDIDA

Y (1) = .43
Y (2) = .4
Y (3) = .39
Y (4) = .42
Y (5) = .4
Y (6) = .4
Y (7) = .43
Y (8) = .42
Y (9) = .42
Y (10) = .42

ESTADISTICA DESCRIPTIVA DE LA PROPIEDAD MEDIDA

MEDIA ARITMETICA = 0.413
VARIANZA = 0.000181
DESVIACION ESTANDAR = .013453
COEFICIENTE DE VARIACION = 3.257536

NO EXISTE PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESULTADOS DE EXACTITUD AL 100% DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA

POOL (ml)	PATRON (ml)	ABS POOL+PATRON	CONC % POOL	%CONC POOL	%CONC PATRON
0.05	0.00	0.18	100.00	100.00	0.00
0.05	0.00	0.20	111.11	111.11	0.00
0.04	0.01	0.19	105.56	83.33	22.22
0.04	0.01	0.20	111.11	88.89	22.22
0.03	0.02	0.18	100.00	52.78	47.22
0.03	0.02	0.19	105.56	58.33	47.22
0.02	0.03	0.19	105.56	36.11	69.44
0.02	0.03	0.21	116.67	47.22	69.44
0.01	0.04	0.18	100.00	8.33	91.67
0.01	0.04	0.18	100.00	8.33	91.67
0.00	0.05	0.21	116.67	2.78	113.89
0.00	0.05	0.20	111.11	-2.78	113.89

PATRON (ml)	SOL. SAL. (ml)	ABS PATRON	CONC PATRON	CONC PR PATRON	% REC
0.00	0.05	0.00	0.00		
0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	
0.01	0.04	0.04	22.22		100.00
0.01	0.04	0.04	22.22	22.22	100.00
0.02	0.03	0.08	44.44		94.12
0.02	0.03	0.09	50.00	47.22	105.88
0.03	0.02	0.12	66.67		96.00
0.03	0.02	0.13	72.22	69.44	104.00
0.04	0.01	0.16	88.89		96.97
0.04	0.01	0.17	94.44	91.67	103.03
0.05	0.00	0.20	111.11		97.56
0.05	0.00	0.21	116.67	113.89	102.44

TOTAL = 1000.00
 PROM = 100.00
 VAR = 14.60747
 DES EST = 3.821973
 CV = 3.821973
 LSC = 102.7341
 LIC = 97.26587

EL METODO ES EXACTO PORQUE ABARCA EL 100 %

RESULTADOS DE EXACTITUD AL 100% DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE
U R E A

POOL (ml)	PATRON (ml)	ABS	CONC PATRON
0.02	0.00	0.13	15.38461
0.02	0.00	0.13	15.38461
0.015	0.005	0.21	7.142857
0.015	0.005	0.23	6.521739
0.01	0.01	0.27	3.703703
0.01	0.01	0.29	3.448275
0.005	0.015	0.32	1.5625
0.005	0.015	0.32	1.5625
0.00	0.02	0.37	0.00
0.00	0.02	0.35	0.00

PATRON (ml)	SOL.SAL. (ml)	ABS PATRON	CONC PATRON	CONC PR PATRON	% REC
0.00	0.02	0.00	0.00		
0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	
0.005	0.015	0.1	5		104.7619
0.005	0.015	0.11	4.545454	4.772727	95.23809
0.01	0.01	0.17	5.882352		112.8205
0.01	0.01	0.22	4.545454	5.213903	87.1794
0.015	0.005	0.27	5.555555		98.11320
0.015	0.005	0.26	5.769230	5.662393	101.8867
0.02	0.00	0.35	5.714285		97.05882
0.02	0.00	0.33	6.060606	5.887445	102.9411

TOTAL = 800.00
 PROM = 100.00
 VAR = 49.81294
 DES EST = 7.057828
 CV = 0.070578
 LSC = 114.1156
 LIC = 85.88434

EL METODO ES EXACTO PORQUE ABARCA EL 100 %

RESULTADOS DE EXACTITUD AL 100% DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE
A C I D O U R I C O

% PATRON	ABS	CONC S+P	CONC FOOL	CONC PATRON	% REC
0	0.18	42.88			
20	0.23	54.76	34.28	20.48	102.3809
40	0.28	66.67	25.71	40.95	102.3809
60	0.33	78.57	17.14	61.43	102.3809
80	0.37	88.10	8.571	79.52	99.40476
100	0.42	100.00	0.00	100.00	100.00

MEDIA = 101.3095
 DESV.EST. = 1.757369
 COEF.VAR. = 0.017346
 LSIC = 104.7188
 LIIC = 97.90022

ES EXACTO PORQUE ABARCA EL 100 %

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 EVALUACION DE LA PRECISION DEL METODO ANALITICO
 G L U C O S A

	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	.20	.19		.17	.17	
	.19	.18		.16	.16	
DIA 1	.19	.19	Y11	.16	.17	Y21
	.19	.19	1061.11	.16	.17	911.11
	.20	.19		.17	.15	

	.18	.18		.19	.18	
	.19	.19		.17	.17	
	.19	.18	Y12	.16	.16	Y22
DIA 2	.19	.19	1033.33	.18	.16	950.00
	.18	.19		.18	.16	

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION = ANALISTA
SUMA DE CUADRADOS = 1362.4725618
GRADOS DE LIBERTAD = 1
MEDIA DE CUADRADOS = 1362.4725618
F cal = 23.8108035
P (Fcal) = 0.0362269

FUENTE DE VARIACION = DIA / ANALISTA
SUMA DE CUADRADOS = 114.4415445
GRADOS DE LIBERTAD = 2
MEDIA DE CUADRADOS = 57.2207723
F cal = 3.2390363
P (Fcal) = 0.0495548

FUENTE DE VARIACION = ERROR
SUMA DE CUADRADOS = 635.9755292
GRADOS DE LIBERTAD = 36
MEDIA DE CUADRADOS = 17.6659869

INTERPRETACION DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

EL ANALISTA PRESENTA EFECTO SOBRE LA VALORACION.

EXISTE EFECTO DE LOS DIAS PARA UN ANALISTA EN LA VALORACION

EVALUACION DE LA PRECISION

NOMBRE DEL METODO = GLUCOSA EN SUERO
COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL = 0.005642
REPETIBILIDAD = 8.2380614
REPRODUCIBILIDAD INTER DIA / ANALISTA = 3.8981234
REPRODUCIBILIDAD INTERANALISTA = 15.8339118

 SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 EVALUACION DE LA PRECISION DEL METODO ANALITICO
 U R E A

	ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DIA 1		.13			.13			
		.13			.12			
		.13	Y11	0.66	.13	Y21	0.61	
		.14			.11			
		.13			.12			

DIA 2		.12			.12			
		.13			.12			
		.13	Y12	0.62	.12	Y22	0.59	
		.12			.11			
		.12			.12			

SUMAS		1.28			1.2			TOTAL = 2.48

S Y.. AL CUADRADO /JK Y... /IJK
 0.30784 0.30752

SS YIJ. AL CUADRADO TRIPLE SUMA
 0.30804 0.3086

COEFICIENTE DE VARIACION = 1.2448

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

F.V.	G. L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC	F TABLAS
ANALISTA	1	0.00032	0.00032	3.2	38.51
DIA	2	0.0002	0.0001	2.857142	4.69
ERROR	16	0.00056	0.000035		

EXISTE REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD

 SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 EVALUACION DE LA PRECISION DEL METODO ANALITICO
 A C I D O U R I C O

	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	.2			.2		
	.2			.2		
DIA 1	.19	Y11	0.98	.2	Y21	0.98
	.2			.19		
	.2			.19		

	.19			.2		
	.2			.2		
DIA 2	.2	Y12	0.98	.19	Y22	0.98
	.2			.19		
	.19			.2		

SUMAS	1.97			1.96		TOTAL = 3.93
S Y.. AL CUADRADO /JK				Y... /IJK		
	0.77225			0.772245		
SS YIJ. AL CUADRADO				TRIPLE SUMA		
	0.77226			0.7727		
COEFICIENTE DE VARIACION = 0.00012186						

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

F.V.	G. L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC	F TABLAS
ANALISTA	1	0.000005	0.000005	1	38.51
DIA	2	0.00001	0.000005	0.181818	4.69
ERROR	16	0.00044	0.000027		

EXISTE REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 SECAEC (AREA DE QUIMICA). CINVESTAV DEL IPN
 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD ANALITICA PARA MUESTRAS DEPENDIENTES

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = G L U C O S A
 NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
 NUMERO DE CONDICIONES DE ALMACENAJE TIEMPO = 2
 NUMERO DE VALORACIONES (REPLICACIONES) = 5

LISTA DE MEDIAS ARITMETICAS Y T DE DUNNETT CALCULADA

CONDICIONES DE ALMACENAJE	MEDIA ARITMETICA	T DE DUNNETT CAL.
TIEMPO CERO	100	
REFRIGERACION 120 HRS.	102.288	1.396
SIN REFRIGERACION 120 HRS.	73.072	-16.427

INTERPRETACION DE LA PRUEBA T DE DUNNETT

CONDICIONES DE ALMACENAJE	INTERPRETACION
REFRIGERACION 120 HRS.	LA MUESTRA ES ESTABLE
SIN REFRIGERACION 120 HRS	LA MUESTRA ES INESTABLE

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 SECAEC (AREA DE QUIMICA). CINVESTAV DEL IPN
 EVALUACION DE LA ESTABILIDAD ANALITICA PARA MUESTRAS DEPENDIENTES

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = U R E A
 NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
 NUMERO DE CONDICIONES DE ALMACENAJE TIEMPO = 2
 NUMERO DE VALORACIONES (REPLICACIONES) = 5

LISTA DE MEDIAS ARITMETICAS Y T DE DUNNETT CALCULADA

CONDICIONES DE ALMACENAJE	MEDIA ARITMETICA	T DE DUNNETT CAL.
TIEMPO CERO	100	
REFRIGERACION 120 HRS.	107.636	1.816
SIN REFRIGERACION 120 HRS.	94.727	-1.254
	0	-23.779

INTERPRETACION DE LA PRUEBA T DE DUNNETT

CONDICIONES DE ALMACENAJE	INTERPRETACION
REFRIGERACION 120 HRS.	LA MUESTRA ES ESTABLE
SIN REFRIGERACION 120 HRS.	LA MUESTRA ES ESTABLE
	LA MUESTRA ES INESTABLE

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
SECAEC (AREA DE QUIMICA). CINVESTAV DEL IPN
EVALUACION DE LA ESTABILIDAD ANALITICA PARA MUESTRAS DEPENDIENTES

INFORMACION

NOMBRE DEL METODO = A C I D O U R I C O
NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
NUMERO DE CONDICIONES DE ALMACENAJE TIEMPO = 2
NUMERO DE VALORACIONES (REPLICACIONES) = 5

LISTA DE MEDIAS ARITMETICAS Y T DE DUNNETT CALCULADA

CONDICIONES DE ALMACENAJE	MEDIA ARITMETICA	T DE DUNNETT CAL.
TIEMPO CERO	100	
REFRIGERACION 120 HRS	100	1.701412E+38
SIN REFRIGERACION 120 HRS.	78	-1.701412E+38

INTERPRETACION DE LA PRUEBA T DE DUNNETT

CONDICIONES DE ALMACENAJE

INTERPRETACION

REFRIGERACION 120 HRS.
 SIN REFRIGERACION 120 HRS.

LA MUESTRA ES INESTABLE
 LA MUESTRA ES INESTABLE

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION

INFORMACION

NOMBRE DEL SISTEMA = G L U C O S A
 NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
 UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = MG %
 NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
 NUMERO DE DETERMINACIONES DEL BLANCO =6
 NUMERO DE NIVELES DE LA CANTIDAD ADICIONADA (mg %) = 4

% CONCENTRACION	PROPIEDAD Y	BLANCOS
0.01	0.05	0.000
0.01	0.05	0.000
0.01	0.05	0.003
		0.002
0.02	0.09	0.000
0.02	0.08	0.000
0.02	0.09	
0.03	0.12	
0.03	0.12	
0/03	0.13	
0.04	0.17	
0.04	0.16	
0.04	0.16	

DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION

PROMEDIO ARITMETICO DE LOS BLANCOS = 0.0008333
 DESVIACION ESTANDAR DE LOS BLANCOS = 0.0013292
 PENDIENTE = 0.0017417
 LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA = 0.0018552
 LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA = 0.0016281
 T cal = 34.1751544
 DESVIACION ESTANDAR DE REGRESION = 0.0039476
 COEFICIENTE DE VARIACION = 4.2107446
 COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.9915106
 LIMITE DE DETECCION = 4.5789249 MG%

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
 DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION

INFORMACION

NOMBRE DEL SISTEMA = U R E A
 NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
 UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = MG %
 NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
 NUMERO DE DETERMINACIONES DEL BLANCO = 6
 NUMERO DE NIVELES DE LA CANTIDAD ADICIONADA (mg %) = 4

% CONCENTRACION	PROPIEDAD Y	BLANCOS
0.01	0.22	0.000
0.01	0.19	0.000
0.01	0.17	0.003
		0.002
0.02	0.35	0.000
0.02	0.34	0.000
0.02	0.35	
0.03	0.49	
0.03	0.47	
0/03	0.45	
0.04	0.62	
0.04	0.58	
0.04	0.63	

$E_x = 0.3$ $E_y = 4.86$
 $E_x^2 = 0.009$ $E_y^2 = 2.2552$
 $E_{xy} = 0.1421$

$E_y' = 0.005$
 $E_y'^2 = 0.000013$
 $n' = 6$

VALOR DE LA PENDIENTE = 13.7333
DESVIACION ESTANDAR DE LOS BLANCOS = 0.001329
LIMITE DE DETECCION = 0.000290

SISTEMA DE ANALISIS ESTADISTICO PARA
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION

INFORMACION

NOMBRE DEL SISTEMA = A C I D O U R I C O
NOMBRE DEL ANALISTA = FELICITAS Y JUANA
UNIDADES DE LA CANTIDAD ADICIONADA = MG %
NOMBRE DE LA PROPIEDAD MEDIDA = ABSORBANCIA
NUMERO DE DETERMINACIONES DEL BLANCO = 6
NUMERO DE NIVELES DE LA CANTIDAD ADICIONADA (mg %) = 4

% CONCENTRACION	PROPIEDAD Y	BLANCOS
0.01	0.07	0.002
0.01	0.08	0.003
0.01	0.08	0.000
		0.000
0.02	0.16	0.002
0.02	0.16	0.000
0.02	0.15	
0.03	0.21	
0.03	0.23	
0/03	0.23	
0.04	0.32	
0.04	0.31	
0.04	0.28	

$\Sigma x = 0.3$ $\Sigma y = 2.28$
 $\Sigma x^2 = 0.009$ $\Sigma y^2 = 0.5182$
 $\Sigma xy = 0.0682$

$\Sigma y' = 0.007$
 $\Sigma y'^2 = 0.000017$
 $n' = 6$

VALOR DE LA PENDIENTE = 7.466666
DESVIACION ESTANDAR DE LOS BLANCOS = 0.001329
LIMITE DE DETECCION = 0.000534