



## **Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario**

**Raibel Suarez, Evelia Arévalo, Ledy Linares, Francisco Ustáriz y Gladys Hernández**

Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioanálisis,  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-Venezuela

(\*) [eveliaa@ula.ve](mailto:eveliaa@ula.ve)

**Recibido:** 17/03/2009

**Revisado:** 29/04/2009

**Aceptado:** 27/05/2009

---

### **Resumen:**

El objetivo de este trabajo es efectuar la validación de un método para la determinación de magnesio eritrocitario mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama. En el proceso de validación se estimaron los valores para los parámetros que determinan el rendimiento del método como son: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión. Se demostró que el método validado cumple con los niveles de aceptación establecidos por las normas nacionales e internacionales relacionadas con la calidad en el laboratorio, y aseguran que el método es adecuado para ser aplicado en el análisis de magnesio eritrocitario en pacientes con diferentes patologías.

**Palabras clave:** validación; método; magnesio; absorción atómica; eritrocitos.

### **Abstract**

The purpose of this study is to validate a method for determining erythrocyte magnesium by flame atomic absorption spectrometry with flame. During the process of validation values were estimated for the parameters that determine the performance of the method, such as: linearity, detection limit, limit of quantification, accuracy and precision. It was shown that the validated method meets the performance levels set by national and international standards related with the quality in the laboratory and ensures that the method is suitable for application in the analysis of erythrocyte magnesium in patients with different pathologies.

**Keywords:** validation; method; magnesium; atomic absorption; erythrocyte.

### **Introducción**

El objetivo de un laboratorio clínico es suministrar datos que contribuyan al diagnóstico de enfermedades, su prevención y terapéutica, para ello es necesario utilizar métodos analíticos confiables, precisos y adecuados para este fin. Por lo tanto, para la determinación de un analito, cualquiera sea la metodología a implementar, se requiere la optimización de las condiciones experimentales que determinan la eficiencia del ensayo, debido a que éstas presentan variaciones en función de las características propias de cada equipo y de los requerimientos operacionales del laboratorio donde se llevará a cabo la medición.

A los efectos se han emitido una serie de guías, normas y reglamentos que buscan imponer condiciones

normalizadas para la ejecución de los métodos analíticos y evitar así que diferentes laboratorios que trabajan con la misma muestra, la misma metodología analítica y con personal capacitado, obtengan resultados con una variabilidad muy amplia. Entre estas normas se encuentran las emitidas por la Organización Internacional de Normalización (ISO) que a nivel específico del laboratorio clínico comprenden la Guía ISO/IEC 17025:1999 "Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", norma homologada en Venezuela como norma COVENIN 2534-2000, y la norma ISO 15189-2003 "Laboratorios médicos: Requisitos particulares relativos a la calidad y competencia", igualmente está la norma COVENIN 2972-2:1997 correspondiente a la homologación de la norma ISO 5725-2:1994, entre otras normas.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados, los métodos analíticos deben someterse a un proceso de validación. En general, todos los métodos a utilizar en un laboratorio han de estar validados, ya que ello garantiza la calidad de los resultados. Según la norma ISO/IEC: 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en un laboratorio, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios<sup>1</sup>.

Entre los analitos que se determinan en un laboratorio clínico y que requieren del suministro de datos seguros y confiables se encuentra el magnesio: cuarto catión más abundante en el organismo humano y el segundo catión más importante en el compartimiento intracelular<sup>2</sup>.

El magnesio se encuentra dentro de todos los tejidos del cuerpo, e interviene en prácticamente todos los órganos y sistemas: sistema nervioso, sistema cardiovascular, hígado, huesos, sistema digestivo, sistemas inmunológicos y en los mecanismos de óxido-reducción<sup>3</sup>. El magnesio participa en la maduración de los reticulocitos, es un factor determinante en el metabolismo de la glucosa y la insulina. Como catión divalente, el magnesio tiene gran influencia sobre el metabolismo mineral, se considera que el contenido de este elemento puede ser un factor muy importante en los cambios cuantitativos de la matriz ósea, además, diversos estudios relacionan este elemento como probable factor involucrado con la pérdida de la masa ósea, debido a su ingesta deficiente o a un desequilibrio en la absorción<sup>4</sup>. También juega un papel importante en la contracción muscular, la disminución de magnesio puede traer como resultado una hipertensión, espasmos musculares, coronarios y cerebrales<sup>5</sup>.

Para la determinación del magnesio en el organismo humano, generalmente se utiliza la espectrofotometría de absorción molecular, sin embargo, la espectrofotometría de absorción atómica es una técnica rápida, con alta exactitud y precisión que también puede ser utilizada.

En lo que se refiere al espécimen utilizado para detectar las alteraciones de la homeostasis del magnesio en el organismo, generalmente se utiliza suero sanguíneo<sup>6</sup>, aun cuando en éste solamente se encuentra el 1% del contenido total de este ion en el organismo<sup>7</sup>.

Considerando que el 99% de la carga corporal del magnesio es intracelular, la determinación de magnesio intracelular puede ser un buen indicador del estado del magnesio en distintas patologías<sup>8,9,10</sup>. Así por ejemplo, las células sanguíneas se han utilizado para determinar los niveles de magnesio en pacientes con diabetes<sup>11</sup>, en pacientes con hipertensión primaria<sup>12</sup>, en pacientes con preeclampsia<sup>13</sup>, en pacientes con asma<sup>14</sup>, entre otras patologías y particularmente el contenido de magnesio

intracelular ha sido medido en células rojas o eritrocitos, dado que estas células representan el compartimiento subcelular más grande de las células sanguíneas.

En este trabajo se obtienen en forma experimental y para las condiciones particulares del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, de acuerdo con las normas nacionales e internacionales de estandarización de métodos analíticos, los parámetros (linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, exactitud, precisión y estudios de interferencias por adición estándar) que servirán como criterios de confianza del método a utilizar para la determinación de magnesio en células rojas por espectrofotometría de absorción atómica con llama, previo tratamiento de la muestra por desproteínización.

Este método podrá aplicarse una vez validado para la determinación de este analito en muestras de pacientes con distintas patologías.

### Parte experimental

*Materiales y reactivos:* se utilizaron los siguientes reactivos, todos de grado analítico: cloruro de sodio (Merck), ácido clorhídrico (Allied Signal), ácido tricloroacético anhídrido (Merck), sulfato de magnesio hexahidratado (Riedel-De Haëneg Seclze-Hannover), cloruro de lantano (Sigma), solución salina al 0,9 %. Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desmineralizada y desionizada (Milipore) con una resistividad específica de 18  $\Omega$  cm. El material de vidrio de uso común en el laboratorio fue previamente lavado con agua y detergente y luego se enjuagó con ácido nítrico al 10% y con agua desionizada.

*Equipos:* espectrofotómetro de absorción atómica con atomización en llama Perkin Elmer, modelo 3110. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco monoelemental de Mg.

*Tratamiento de las muestras:* se realizó basándose en el método propuesto por Prasad y colaboradores en 1965<sup>15</sup>, para determinar concentraciones de cinc eritrocitario: Utilizando tubos al vacío heparinizados *Vacuum Diagnostics*®. y agujas *Vacutainer*® se extraen 8 mL de sangre heparinizada. Mediante centrifugación a 2500 g durante 10 minutos se obtiene la separación del plasma y del paquete celular. El plasma se remueve, mientras que del paquete celular se elimina la capa blanca mediante succión y se deja la fase roja, contentiva de eritrocitos. Los eritrocitos obtenidos se lavan tres veces, utilizando 4 mL de solución salina 0,9% por cada mL de eritrocitos o glóbulos rojos, se mezcla y centrifuga durante 5 minutos a 2500 g, y se descarta el sobrenadante. Luego se hemolizan los glóbulos rojos, con agua desionizada (1 mL de

glóbulos rojos más 2 mL de agua desionizada), mediante fuerte agitación utilizando un Vortex Mixer, modelo VM 1000. Posteriormente se efectúa la desproteínización utilizando 2 mL de los glóbulos rojos hemolizados, 2 mL de agua desionizada, 1 mL de HCl 6 N y 1 mL de ácido tricloroacético al 20%; la mezcla se lleva a Baño de María a 90 °C durante 5 minutos. Una vez que las muestras vuelven a la temperatura ambiente se centrifugan a 2500 g durante 10 minutos y se separa el sobrenadante en tubos de vidrio pyrex de 15 ml para su lectura inmediata. Por razones de tiempo en algunos casos se guardaron muestras en tubos plásticos y se congelaron para ser leídas al día siguiente.

Básicamente la modificación del método de Prasad y colaboradores se encuentra en que aquí los eritrocitos se lavan tres veces (Prasad y colaboradores no especifican en su trabajo cuantas veces los lavaron) y principalmente en que en el tratamiento de la muestra solo se realiza una fase de desproteínización a diferencia de Prasad y colaboradores que realizaron este proceso en tres fases, recogiendo tres filtrados, ya que se comprobó que se obtienen los mismos resultados al realizar una sola fase de desproteínización y utilizar este solo filtrado o recogiendo tres filtrados como lo hizo Prasad. La modificación realizada ahorra tiempo y reactivos.

*Determinación analítica:* las determinaciones de magnesio se realizaron de acuerdo con las condiciones estándares y el procedimiento señalado en el manual del espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 3110<sup>16</sup>. Para ello se utilizó 1 mL del sobrenadante y se hizo una dilución 1:50 con cloruro de lantano al 0,1%.

## Resultados y discusión

*Determinación de las características de desempeño del método.*

### Linealidad:

Para determinar el intervalo de concentraciones en que el sistema cumple la ley de Beer, o el intervalo óptimo de concentraciones, se procedió primero a construir la curva de Ringbom. Para ello se prepararon una serie de soluciones patrones acuosos con concentraciones de magnesio comprendidas entre 0,5 mg/dL y 3,5 mg/dL. Estos patrones se calcularon y prepararon de manera que sus concentraciones fueran equivalentes a esas mismas concentraciones en los glóbulos rojos sanguíneos.

Se utilizó como solvente solución de cloruro de lantano al 0,1%. Se preparó también una solución blanco con cloruro de lantano al 0,1% más los reactivos presentes en la muestra a analizar, de acuerdo con el tratamiento de la misma.

En la Figura 1, se muestra la curva de Ringbom obtenida con estos datos.

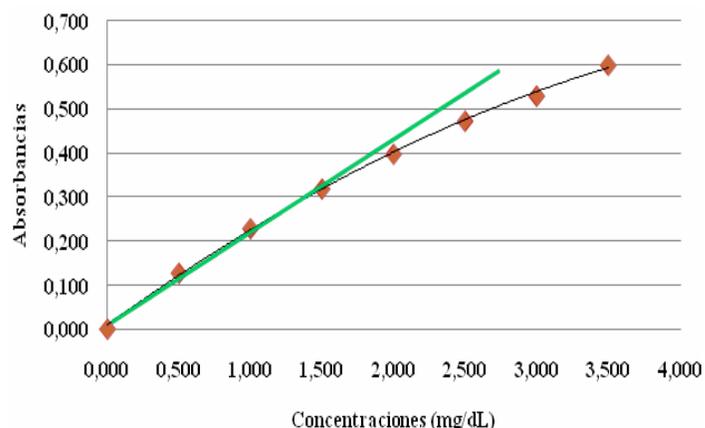


Figura 1. Curva de Ringbom para determinaciones de magnesio en glóbulos rojos.

La parte lineal de esta gráfica permite obtener el intervalo de concentraciones óptimo o el intervalo que presentará una relación lineal entre absorbancia y concentración. De acuerdo con la Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA)<sup>17</sup>, la linealidad debe ser establecida mediante una inspección visual y debe observarse que el comportamiento de la respuesta analítica está en función de la concentración del analito. Por lo tanto, al evaluar la curva de Ringbom se puede observar que el comportamiento lineal se limita hasta una concentración de aproximadamente 1,30 mg/dL.

Ahora bien, dado que el procedimiento analítico establecido en el manual del espectrofotómetro Perkin Elmer 3110<sup>16</sup> requiere realizar una dilución de la muestra 1:50 con cloruro de lantano, y los valores de referencia citados en la literatura están comprendidos entre 4,01 mg/dL y 6,04 mg/dL<sup>18</sup> y ante la necesidad de preparar una curva de calibración con valores por debajo y por encima del intervalo de referencia, se consideró suficiente y más práctico trabajar con una curva de calibración cuyo intervalo de concentraciones estuviera entre 0,05 mg/dL y 0,175 mg/dL; de manera que tomando esto en consideración así como la linealidad que se observa en la curva de Ringbom, se procedió a elaborar la curva de calibración midiendo la señal de la respuesta para una serie de soluciones patrones del analito con las siguientes concentraciones 0,05 mg/dL, 0,075 mg/dL, 0,10 mg/dL, 0,125 mg/dL, 0,150 mg/dL, 0,175 mg/dL. Para obtener la concentración verdadera en las muestras reales es necesario hacer la corrección de la dilución 1:50.

Para la construcción de la curva de calibración se siguieron las recomendaciones de Taylor<sup>19</sup>:

- Se prepararon seis soluciones patrones con concentraciones espaciadas en forma uniforme a lo largo del intervalo de concentración de interés, según la curva de Ringbom. El intervalo de concentración abarcó valores por debajo, entre y sobre el intervalo lineal.

- Las soluciones patrones se prepararon y leyeron por triplicado. El procedimiento se repitió en forma independiente, tres veces para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema.

- Con el promedio de los datos obtenidos se procedió a realizar la curva de calibración mediante un análisis de regresión por el método de los mínimos cuadrados y se determinaron las características de desempeño del método en estudio. En la Figura 2 se muestra la curva ajustada para la determinación de magnesio en glóbulos rojos por espectroscopia de absorción atómica con llama.

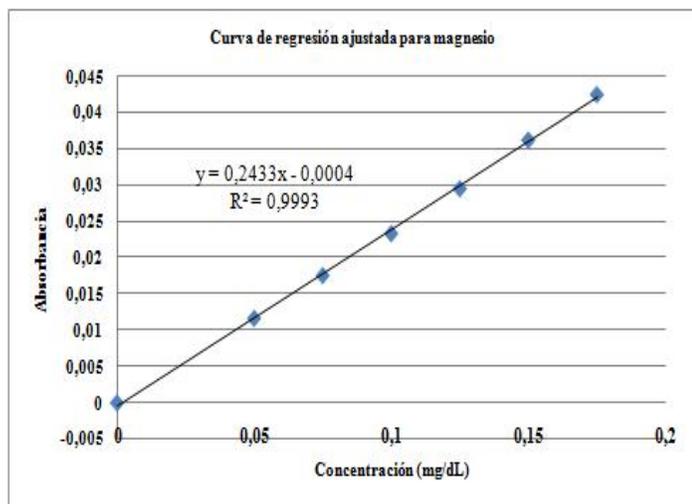


Figura 2. Curva de regresión para la determinación de magnesio por espectroscopia de absorción atómica con llama.

Existen tres maneras de verificar el intervalo de concentraciones para el cual el modelo lineal es válido, ninguna de ellas excluye a la otra: la primera es la investigación del gráfico de residuos ( $y_i - \hat{y}$ ) en función de la concentración. Otra manera de verificar la validez del modelo lineal es mediante el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el tercer método es el análisis de varianza de la regresión.

Por lo tanto, para comprobar si el modelo lineal simple se ajusta o no para estudiar la relación entre la absorbancia y la concentración se determinó: la ecuación de la recta y se calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación ( $r$ ), y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), de la línea de regresión o curva de calibración ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados.

Asimismo, se realizó el análisis de varianza de la regresión lineal, se determinó el test de proporcionalidad ( $t$  de student para el intercepto) y el test de linealidad (Coeficiente de variación (C.V.) de los factores de respuesta  $F$  y  $t$  de student para la pendiente).

Los criterios de aceptación tomados en consideración fueron:

- Coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0,98 y 1,00, el coeficiente de determinación (coeficiente de correlación al cuadrado) debe ser mayor de 0,95.

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta  $CV_f$  menor del 5%

- Pendiente distinta de cero ( $t_{exp}$ . mayor que  $t_{tabla}$ )

- Intercepto cercano a cero ( $t_{exp}$ . menor que  $t_{tabla}$ )

Los cálculos se realizaron y analizaron utilizando Microsoft Excel 2003, obteniéndose los siguientes resultados:

Coeficiente de correlación ( $r$ ): 0,9996

Coeficiente de determinación ( $r^2$ ): 0,9993

Los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (absorbancia) a partir del uso de la variable concentración. De manera que, en el intervalo de concentración comprendido entre 0,050 mg/dL a 0,175 mg/dL, se satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, ya que, se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal ( $r$ ) mayor que 0,98 y de un coeficiente de determinación ( $r^2$ ): mayor de 0,95, lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y los obtenidos experimentalmente.

Por otra parte el análisis de varianza permitió determinar que el valor  $F$  calculado = 7391,63 es mayor al valor  $F$  crítico = 4,03, indicativo de que el modelo lineal se ajusta para la relación entre la absorbancia a partir de la concentración con un nivel de significación del 5%.

Simultáneamente, se estimaron el intercepto ( $b = -0,000429$ ) y la pendiente ( $m = 0,2437$ ), de acuerdo con estos datos la ecuación ajustada es  $Y = 0,2437X - 0,000429$

Se comprobó la significación del intercepto con respecto al cero a través de la prueba de Student. El intercepto de la recta de ajuste está cercano a cero, al aplicársele la prueba de Student se obtuvo un valor de  $t$  experimental menor que el valor de  $t$  tabulado ( $t_{exp} = -1,35752967$ ,  $t_{tab.} = 2,78$ ) para una probabilidad del 95% y 4 grados de libertad, lo que permitió establecer que no existen diferencias

estadísticamente significativas, quedando así demostrada la proporcionalidad del sistema.

Mediante la prueba de linealidad se calculó el coeficiente de variación (C.V.) total de los factores de respuesta (1,67 %), el cual fue inferior al 5% establecido como límite indicativo de linealidad, lo que indica que la pendiente es distinta de cero y demuestra la adecuada linealidad en el intervalo de trabajo estudiado. Estos datos se muestran en la Tabla 1

Tabla 1.- Test de linealidad, C.V. global de los factores de respuesta

X Concentracion (mg/dL)	Y Absorbancia	Factor de respuesta f (Y/X)
0,05	0,0117	0,234
0,075	0,0176	0,235
0,1	0,0234	0,234
0,125	0,0296	0,237
0,15	0,0363	0,242
0,175	0,0426	0,243
<b>Media =</b>		<b>0,2375</b>
<b>Desviacion estándar =</b>		<b>0,0039</b>
<b>C.V. =</b>		<b>1,65%</b>

#### Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

Para la determinación del límite de detección se siguió la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada<sup>20</sup> (IUPAC) adoptada en 1975, la cual establece que “el límite de detección expresado como una concentración ( $C_L$ ), o cantidad, ( $q_L$ ) se deriva de la medida más pequeña, ( $Y_L$ ), que puede detectarse con razonable certeza para un procedimiento analítico dado”.

Experimentalmente, el límite de detección (LD) se determina involucrando todos los factores que afectan la medida y se define, en general, para obtenerlo en unidades de concentración como:  $LOD = 3S_B / m$ . Donde:  $S_B$  = desviación estándar de los blancos y  $m$  = es la pendiente de una curva de calibración del sistema, calculada a muy bajas concentraciones. Este criterio es recomendado por la IUPAC<sup>20</sup> e igualmente la IUPAC ha sugerido que el criterio para el valor de la constante K sea  $K = 3$ . Mientras que, el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de

exactitud y precisión mediante la fórmula  $LOQ = 10S_B/m$  donde el valor de la constante K es igual a 10.

Para la determinación del límite de detección y del límite de cuantificación se prepararon diez muestras blanco, tal como se explicó anteriormente, con cloruro de lantano al 0,1% más los reactivos presentes en la muestra a analizar, de acuerdo con el tratamiento de la misma y se realizaron las respectivas lecturas de absorbancias aplicando el método en estudio. Estas determinaciones se hicieron espaciadamente en el tiempo de realización de la investigación, obteniéndose los resultados siguientes:

$$DS_B = 0,001$$

$$m = 0,24$$

$$LOD = 0,0125 \text{ mg/mL}$$

$$LOQ = 0,0416 \text{ mg/mL}$$

#### Exactitud y precisión:

Para estas determinaciones se tomaron en consideración los criterios y definiciones establecidos en normas internacionales y nacionales tales como el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales en Metrología (VIM), (norma venezolana COVENIN 2552:1999)<sup>21</sup>, según la cual, la exactitud de la medición es una cualidad que refleja el “grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero de la magnitud a medir”. Asimismo, la guía ISO 3534-1:1993<sup>22</sup>, define la exactitud como “la proximidad en la concordancia entre un resultado y el valor de referencia aceptado” y esta misma norma establece que la precisión es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas.

La exactitud del método se verifica mediante el análisis de un material de referencia certificado, o comparando los resultados con los resultados obtenidos por otro método confiable sobre la misma muestra. de no ser posible ninguno de estos procedimientos se recurre a las pruebas de recuperación, las cuales suministran evidencias sobre la validez de los resultados<sup>23</sup>. La exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación en un método analítico de una cantidad conocida del analito o como la diferencia entre el valor medio obtenido en la valoración y el valor aceptado como real.

En este trabajo para el estudio de la exactitud se empleó el método de adición/recuperación.

Para la determinación de la precisión de un método, la Conferencia Internacional sobre Armonización, (ICH)<sup>24</sup>, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajan tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120%) con tres muestras

independientes de cada nivel. Si la exactitud se evalúa por el método de adición estándar, se pueden obtener de una vez estos datos para el análisis de la precisión.

De acuerdo con lo antes señalado, para los estudios de exactitud y precisión se analizó por duplicado, cuatro veces, un material de prueba típico (muestra de sangre completa) por el método objeto de validación y se determinó el contenido promedio del analito. Una vez conocido el contenido promedio de magnesio en la muestra real, se procedió a enriquecer la muestra, por triplicado, con el analito de interés a diversas concentraciones empleando para ello soluciones patrones de concentraciones iguales a 0,050 mg/dL, 0,100 mg/dL y 0,150 mg/dL. Para preparar las soluciones en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra y se agregan cantidades variables de la solución patrón. Es decir, se prepararon tres soluciones que contenían cada una 1 mL de muestra previamente tratada conforme al método analítico en estudio y se les adicionó soluciones patrones de magnesio con las concentraciones antes señaladas.

Estas soluciones se leyeron a 285,2 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer 3110 y el procedimiento se repitió tres veces en el mismo día por el mismo analista, en el mismo laboratorio, es decir, en condiciones de repetibilidad. De igual forma se repitió el procedimiento en tres días diferentes con el mismo analista, a fin de utilizar los datos obtenidos para la determinación de la precisión intermedia.

La recuperación global del método se calculó a partir de la media de las recuperaciones individuales con la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{Y - X_i}{X_a} \times 100$$

Donde: Y = concentración de la muestra más el patrón añadido

X<sub>i</sub> = concentración inicial de la muestra

X<sub>a</sub> = concentración del patrón añadido

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis de la exactitud y de la repetibilidad del método en estudio.

Tabla 2: Evaluación de la exactitud y de la repetibilidad del método en estudio

MUESTRA	(X <sub>i</sub> ) CONCENTRACIÓN INICIAL DE LA MUESTRA (mg/dL)	(X <sub>a</sub> ) CONCENTRACIÓN DEL PATRÓN AÑADIDO (mg/dL)	(Y) CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA + PATRÓN AÑADIDO (mg/dL)	% RECUPERACIÓN	C.V. %
1	0,012	0,050	0,065	104%	0,90
			0,064		
			0,064		
			$\bar{x} = 0,064$		
2	0,012	0,100	0,115	99%	2,74
			0,111		
			0,109		
			$\bar{x} = 0,111$		
3	0,012	0,150	0,164	99,33%	1,56
			0,161		
			0,159		
			$\bar{x} = 0,161$		

% Recuperación global = 100,78  
CV global = 1,7%

Para el análisis de la veracidad a partir de los datos obtenidos, se determinó el porcentaje de recuperación con

un criterio de aceptación de un porcentaje de recuperación >98%.

Para los estudios de la precisión se ha generalizado en el caso de la repetibilidad y la precisión intermedia, el uso de la desviación estándar relativa para evaluar la precisión del sistema o del método y el valor de la misma debe ser menor o igual al 2%, y en algunos casos puede ser igual o menor al 3%, y para la reproducibilidad puede ser 2 o 3 veces el valor de la repetibilidad. Por otra parte, la repetibilidad en los valores de absorbancia de los análisis intra e interdías, con valores bajos de desviación estándar relativa, indican que el método es preciso. Asimismo, la ICH<sup>24</sup> considera aceptables valores de la desviación estándar relativa por debajo de 1% en análisis de repetibilidad (intradía) y por debajo de 2% en los análisis de precisión intermedia (interdías).

La recuperación media alcanzada (100,78 %) indica que el método propuesto muestra la exactitud necesaria para considerarlo adecuado para las determinaciones de magnesio en eritrocitos.

Para el estudio de la repetibilidad (precisión intradiaria), tal como se señaló anteriormente, el análisis se realizó

utilizando los resultados obtenidos para el estudio de la exactitud, y como se puede observar en la Tabla 2, se obtuvo un coeficiente de variación de 1,7% el cual se encuentra por debajo del 2%.

Además, siguiendo los criterios de la ICH<sup>24</sup>, se determinó también la precisión tomando en consideración las lecturas de absorbancia, para lo cual se seleccionaron soluciones con concentraciones de 0,05 mg/dL, 0,100 mg/dL y 0,150 mg/dL y se leyeron a 285,2 nm en el espectrofotómetro de absorción atómica en condiciones de repetibilidad. Para la determinación de la precisión intermedia (interdía) se prepararon igualmente estas soluciones con estas mismas concentraciones en distintos días y se leyeron por triplicado, por el mismo analista.

Los resultados de la repetibilidad se muestran en la Tabla 3 y los resultados obtenidos para la precisión intermedia se muestran en la Tabla 4. El coeficiente de variación total calculado es de 0,53%, inferior al valor de 1% aceptable según la ICH.

Tabla 3. Resultados de la repetibilidad.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/dL)	ABSORBANCIA	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	COEFICIENTE DE VARIACION
1	0,05	0,0283 0,0287 0,0287	0,0286	0,0002	0,81%
2	0,100	0,0477 0,0476 0,0477	0,0477	0,0001	0,12%
3	0,150	0,0760 0,0767 0,0757	0,0761	0,0005	0,67%
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN PROMEDIO: 0,53 %</b>					

Tabla 4. Resultados de la precisión intermedia

	MUESTRA 1 0,05 mg/dL	MUESTRA 2 0,100 mg/dL	MUESTRA 3 0,150 mg/dL
<b>DÍA 1 : ABSORBANCIA</b>	0,0250	0,0470	0,0720
<b>DÍA 2: ABSORBANCIA</b>	0,0250	0,0470	0,0730
<b>DÍA 3: ABSORBANCIA</b>	0,0240	0,0480	0,0730
<b>MEDIA:</b>	0,0247	0,0473	0,0727
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	0,0006	0,0006	0,0006
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>	2,34 %	1,22 %	0,79%
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN PROMEDIO = 1,45 %</b>			

El coeficiente de variación total calculado es de 1,45 %, inferior al valor de 2% aceptable según la ICH<sup>24</sup>. Los resultados obtenidos para la repetibilidad en los dos ensayos realizados y para la precisión intermedia demuestran que el método cumple con las especificaciones y puede ser aplicado con seguridad y eficiencia.

Para completar la validación del método se realizó otro ensayo para verificar la robustez del método, para ello se llevó a cabo una prueba entre días por un analista distinto. Se prepararon por triplicado soluciones con las concentraciones de 0,075 mg/dL, 0,125 mg/dL y 0,175 mg/dL y se leyeron a 285,2 nm en el espectrofotómetro de absorción atómica por otro analista y en distintos días. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la prueba de precisión entre días y con distinto analista

	<b>MUESTRA 1</b>	<b>MUESTRA 2</b>	<b>MUESTRA 3</b>
	<b>0,075 mg/dL</b>	<b>0,125 mg/dL</b>	<b>0,175 mg/dL</b>
<b>DÍA 1: ABSORBANCIA PROMEDIO</b>	0,0390	0,0630	0,0880
<b>DÍA 2: ABSORBANCIA PROMEDIO</b>	0,0380	0,0630	0,0880
<b>DÍA 3: ABSORBANCIA PROMEDIO</b>	0,0380	0,0620	0,0870
<b>MEDIA:</b>	0,0380	0,0627	0,0877
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>	0,0006	0,0006	0,0006
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>	1,52 %	0,92%	0,66%
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN PROMEDIO = 1,03%</b>			

Estos resultados muestran que el coeficiente de variación total calculado es igual a 1,03 % y está por debajo de 2% aceptable según la ICH<sup>24</sup>. Estos resultados confirman lo antes señalado, sobre la precisión del método.

La precisión y veracidad de cada método de ensayo se establecen durante la validación del mismo pero en la práctica cotidiana el laboratorio deberá demostrar que es capaz de mantener de forma estable estos niveles de desempeño mediante procedimientos de control de calidad de los resultados.

#### Estudio de Interferencias

Las pruebas de recuperación permiten determinar si existen o no interferencias por parte de la matriz, se usan para medir errores sistemáticos debidos a sustancias distintas del analito. Para conocer la presencia de posibles efectos de matriz se compararon estadísticamente los valores de las pendientes de la curva de calibración acuosa con la curva de adición estándar, mediante análisis estadístico utilizando la prueba t-Student. Los resultados obtenidos permitieron observar que no existen diferencias significativas entre las pendientes, ya que la t-Student calculada es menor que la t-Student crítica, a un nivel de confianza del 95%, tal como se observa en la Tabla 6. Esto indica que no existen interferencias causadas por la matriz en la determinación de magnesio eritrocitario por

espectrofotometría de absorción atómica en llama y en consecuencia es posible utilizar una curva de calibración con patrones acuosos para estas determinaciones.

Tabla 6. Prueba de significación entre las pendientes de la curva de calibración acuosa y la curva de adición estándar

<b>Pendiente (m)</b> <b>curva de</b> <b>calibración</b> <b>acuosa</b>	<b>Pendiente (m)</b> <b>curva de</b> <b>adición</b> <b>estándar</b>	<b>t-student</b> <b>calculada</b>	<b>t-student</b> <b>crítica</b>
0,243	0,259	0,163	0,194

#### Determinación de magnesio en muestras reales

El método antes validado se aplicó para la determinación de magnesio en muestras de glóbulos rojos provenientes de pacientes: estudiantes de la Facultad Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes de Mérida, Venezuela, con edades comprendidas entre 20 y 40 años de edad, aparentemente sanos, a quienes se les investigó mediante cuestionario si habían padecido o padecían de patologías tales como diabetes, enfermedades tiroideas, hepáticas, gástricas, artritis, osteoporosis, y alteraciones menstruales en las pacientes femeninas, el estilo de vida, la alimentación, y la ingestión de medicamentos o de anticonceptivos. Estos pacientes, previa invitación,

acudieron voluntariamente al Laboratorio Análisis Instrumental de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes de Mérida, Venezuela y dieron su consentimiento por escrito para participar en la investigación. Para estos análisis se seleccionaron al azar 20 pacientes entre los que respondieron que no padecían ni habían padecido alguna de las patologías antes mencionadas.

Los resultados obtenidos se expresan en miligramos de magnesio por decilitro de eritrocitos (mg/dL). Estos resultados arrojaron un valor promedio de magnesio correspondiente a  $5,17 \pm 0,02$  mg/dL, el valor mínimo encontrado corresponde a 4,2 mg/dL y el valor máximo encontrado en este grupo de pacientes fue de 6,65 mg/dL. Estos valores se encuentran dentro de los valores de referencia (4-6,44 mg/dL) establecidos para la determinación de magnesio en glóbulos rojos por la técnica de espectrofotometría de absorción molecular utilizando el método de la calmagita<sup>18</sup>.

### Conclusiones

Se estableció que la metodología analítica estudiada para la determinación de magnesio en glóbulos rojos utilizando la espectrofotometría de absorción atómica es lineal en el intervalo de concentración estudiada, basado en el valor obtenido para el coeficiente de correlación, y corroborado con la inspección visual de la gráfica de la curva de calibración. Adicionalmente, se comprobó la linealidad mediante la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta, se corroboró que el valor de la pendiente es significativamente distinto de cero y que el intercepto no está estadísticamente alejado de cero.

Para el estudio de la exactitud mediante prueba de adición/recuperación, se demostró que el porcentaje de recuperación promedio está dentro de los criterios de aceptación y también se verificó la linealidad de la curva de recuperación y que es independiente de la concentración, por lo tanto la metodología es exacta.

La metodología estudiada aprobó los ensayos de repetibilidad al determinarse un coeficiente de variación (C.V.) menor al 1%, e igualmente los de precisión intermedia, al ser el C. V. menor al 2%, con lo que se concluye que la metodología es precisa.

El estudio demostró que la metodología analizada cumple con los parámetros mínimos de linealidad, exactitud y precisión, por lo tanto el método se encuentra validado.

### Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por financiar esta investigación (FA-429-08-07-F).

### Referencias

1. Norma ISO/IEC 17025: 1999. "Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración".
2. Weisinger J, Bellorin E. Magnesium and Phosphorus. **Lancet**, 352 (3125), 391-396 (1998).
3. López G. Magnesio En el organismo y métodos de análisis. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). 1995.
4. Sabatier M, Arnaud M, Kastenmaster P, Rytz A, Barclay D. Meal effect on Magnesium Bioavailability from Mineral Water in Healthy Women. **American Journal of Clinical Nutrition**, **75(1)**, 65-71 (2002).
5. Institute of Medicine (US). Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington DC: The National Academy Press; p: 190-249 (1997).
6. Reinhart R. Magnesium metabolism. **Archives of Internal Medicine**, **148 (11)**, 2415-2420 (1988)
7. Topf J, Murray P. Hypomagnesemia and Hypermagnesemia. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, **4(2)**, 195-200 (2003).
8. Ryzen E, Elkayam U, Rude R. Low blood mononuclear cell magnesium in intensive cardiac care unit patients. **American Heart Journal**, **111**, 475-480 (1986).
9. Elin R, Hosseini J, Fitzpatrick L, Blizotes M, Marx S. Magnesium status of patients with parathyroid disease. **Magnesium Trace Element**, **9(3)**, 119-123 (1990).
10. Sedighi M, Pourpak Z, Bavarian B, Alizadeh R, Zare A, Moin M. Low Magnesium Concentrations in Erythrocytes of Children with Acute Asthma. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, **5(4)**, 183-186 (2006).
11. Simsek E, Karabay M, Kocabay K. Assessment of magnesium status in newly diagnosed diabetic children: measurement of erythrocyte magnesium level and magnesium tolerance testing. **The Turkish Journal of Pediatrics**, **47(2)**, 132-137 (2005).
12. Kosch M, Hausberg M, Westermann G, Köneke J, Matzkies F, Heinz K, Kisters K. Alteraciones del contenido de calcio y magnesio de las membranas de los hematíes en pacientes con hipertensión primaria. **American Journal of Hypertension (Edición Español)**, **3**, 296-301 (2001).
13. Kisters K, Barenbrock M, Louwen F, Hausberg M, Heinz K, Kosch M. Membrane, Intracellular, and Plasma Magnesium and Calcium Concentrations in Preeclampsia. **American Journal of Hypertension**, **13(7)**, 765-769 (2000).
14. Zervas E, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Georgatou N, Loukides S. Reduced Intracellular Mg Concentrations in Patients With Acute Asthma. **Chest**, **123**, 113-118 (2003).

15. Prasad A, Oberleas D, Halsted J. Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. **Journal laboratory & Clinical Medicine**, **66(3)**, 508-14 (1965).
16. Spectroscopy Atomic Manual Perkin Elmer 3110. 1982.
17. Australian Pesticides, and Veterinary Medicines Authority (APVMA). Guidelines for The Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products. 2004
18. Biolabo Reagents. Magnesium Calmagite. Reagent for Cuantitative Determination of Magnesium in Human serum, Plasma, Red Cells (RBC) and Urines. France. 1995.
19. Taylor J. Validation of Analytical Methods. **Analytical Chemistry**, **55**, 600A-608A (1933).
20. Long Gary L, Winefordner J. D. Report Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**, **55(7)**, 712A-724A (1983).
21. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM, ISO, Ginebra. 1993 Organización Internacional para la Estandarización Estadística. Vocabulario y Símbolos. Parte 1: Probabilidad y Términos estadísticos en General. Ginebra: ISO, 1993.
22. Vickers T. Atomic Fluorescence and Atomic Absorption Spectroscopy. Physical Methods. In: Modern Chemical Analysis. Edited by Theodore Kuwana. Academic Press. New York. 1978; 1: 235-9
23. International Conference on Harmonisation. Note for guidance on Validation of analytical methods: methodology.1995. In: Gamara FL, Correr CJ, Sato M, Pontarolo R. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido kojico. **Ars Pharmaceutica**, **45(2)**, 145-153 (2004).