
Optimización y revalidación del análisis de nitrógeno por el método Kjeldahl en muestras de taurina

M. Quintela, J. Báguena¹, F. Broto³, L. Margarit², M. J. Blanco¹

Gestión de Calidad¹, Análisis Generales², Cromatografía³.

Institut Químic de Sarrià, 08017-Barcelona

Optimization and revalidation of nitrogen analysis by means of the Kjeldahl method in samples of taurine

Optimizació i revalidació de l'anàlisi de nitrògen mitjançant el mètode Kjeldahl en mostres de taurina

Recibido: 4 de febrero de 2009; revisado: 17 de abril de 2009; aceptado: 22 de abril de 2009

RESUMEN

En el presente artículo, se ha optimizado y se ha revalidado el procedimiento de análisis de nitrógeno en muestras de taurina mediante el método Kjeldahl. La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) propone un modelo de cálculo que permite determinar el número de replicados a realizar, en función del coeficiente de variación de la repetibilidad del procedimiento (C.V.%) y el valor límite aceptado, que en el caso de la determinación de la pureza, corresponde al valor máximo o mínimo de las especificaciones de la muestra. Al aplicar dicho modelo, considerando la incertidumbre de calibración del equipo, como el mínimo valor posible para el C.V.%, y teniendo en cuenta las especificaciones establecidas para la taurina en la *U.S. Pharmacopeia 30*, se obtiene que el número de replicados a realizar es de cinco o seis, según las condiciones de trabajo.

Palabras clave: Incertidumbre. Kjeldahl. Revalidación. Taurina.

SUMMARY

In the present article, the procedure of nitrogen analysis has been optimized and it has been revalidated in samples of taurine by means of the Kjeldahl method. The Spanish Association of Pharmacists of the Industry (AEFI) proposes a model of calculation that allows to determine the number of talked back to realise, based on the coefficient of variation of the repeatability of the procedure (C.V.%) and the

accepted limit value, that in the case of the determination of the purity, corresponds to the maximum or minimum value of the specifications of the sample. When applying this model, considering the uncertainty of calibration of the equipment, like the minimum possible value for C.V.%, and considering the specifications established for the taurine in the *U.S. Pharmacopeia 30*, is obtained that the number of talked back to realise is of five or six, according to the conditions of work.

Key words: *Uncertainty. Kjeldahl. Revalidation. Taurine.*

RESUM

Al present article, s'ha optimitzat i s'ha revalidat el procediment d'anàlisi de nitrogen en mostres de taurina mitjançant el mètode Kjeldahl. La Associació Espanyola de Farmacèutics de la Indústria (AEFI) proposa un model de càlcul que permet determinar el número de replicats a realitzar, d'acord amb el coeficient de variació de la repetibilitat del procediment (C.V.%) i el valor límit acceptat, que en el cas de la determinació de la pureza, correspon al valor màxim o mínim de les especificacions de la mostra. A l'aplicar aquest model, considerant la incertesa de calibratge de l'equip, com el mínim valor possible per al C.V.%, i tenint en compte les especificacions establertes per a la taurina en la *U.S. Pharmacopeia 30*, s'obté que el número de replicats a realitzar és de cinc o sis, segons les condicions de treball.

Mots clau: Incertesa. Kjeldahl. Revalidació. Taurina.

INTRODUCCIÓN

La taurina es un aminoácido que se encuentra de forma natural en el cuerpo y en los alimentos. (Figura 1). Existe como un aminoácido libre en la mayoría de los tejidos animales siendo uno de los más abundantes y es un nutriente esencial, muy importante en el crecimiento de los mamíferos.^{1,2}

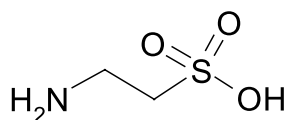


Figura 1: Fórmula de la taurina.

Durante varios años se han realizado investigaciones científicas sobre las posibles aplicaciones médicas de este aminoácido en terapias nutricionales, y algunas de ellas han proporcionado resultados positivos para el futuro tratamiento de varias enfermedades comunes. En relación con su capacidad de acción para evitar la fatiga, se ha demostrado que la taurina mejora la fuerza del músculo del corazón y previene el desarrollo de cardiomiopatías (debilitamiento cardíaco que impide la adecuada distribución de la sangre).^{3,4} Otros experimentos han ayudado a entender que una alta concentración de esta sustancia tiene una acción protectora en la retina del ojo, evitando los efectos dañinos de la luz ultravioleta y de algunas sustancias tóxicas, responsables del deterioro visual.^{5,6} Un laboratorio de ensayo debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña y desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados. Validar un procedimiento de análisis es demostrar de forma documentada que el procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados adecuados conforme a los requisitos previamente establecidos.⁷

Al diseñar el protocolo de validación el responsable de la misma debe definir los parámetros que se deben estudiar y los criterios de aceptación correspondientes, teniendo en cuenta requisitos técnicos propios del tipo de análisis y otros requisitos relacionados. Los estudios de validación son utilizados para demostrar la fiabilidad de los resultados analíticos obtenidos.⁸

En algunos casos, no hace falta realizar un estudio completo de validación, sino que es suficiente con hacer una revalidación que consiste en verificar mediante pruebas documentadas que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente fiable tras realizar

cambios respecto al método inicial. Los parámetros a estudiar en una revalidación dependen de la naturaleza de los cambios realizados y de la importancia que puedan tener sobre los resultados del análisis.^{9,10} La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) proporciona unas directrices que el responsable del estudio puede tener en cuenta para definir el protocolo de revalidación (Tabla 1).⁷

- En general las etapas a tener en cuenta en una revalidación son las siguientes:
- Identificar el cambio.
- Establecer la importancia del cambio sobre el análisis.
- Definir el protocolo.
- Realizar las actividades.
- Revisar los resultados.
- Actualizar el procedimiento de análisis (PNT) para incluir los resultados de la revalidación.
- Elaborar el informe final, que debe contener la declaración del cumplimiento de los requisitos.

En el presente artículo, se ha optimizado el procedimiento de análisis de nitrógeno mediante el método Kjeldahl de la *U.S. Pharmacopeia 30 (USP)*,¹¹ para su aplicación en la determinación de la pureza de muestras de taurina. Para ello, se ha tenido en cuenta que, según especificaciones de la *USP*, dicha pureza deberá estar comprendida entre el 98,5 y el 101,5%¹². A estos valores, por estequiometría del compuesto, les corresponde un porcentaje en nitrógeno comprendido entre el 11,03 y 11,36% (p/p). Una vez optimizado el método de análisis, se ha procedido a su revalidación.

AEFI propone un modelo de cálculo que permite obtener el número de replicados (n) que se deben realizar en la aplicación de un procedimiento de análisis de materias primas y especialidades, a partir del coeficiente de variación de la repetibilidad del procedimiento (C.V.%) y el valor límite aceptado (LA, en %). En el caso de la determinación de la pureza, LA corresponde al valor máximo o mínimo de las especificaciones de la muestra (Ec. 1).

$$C.V.\% = |100 - LA| * \frac{\sqrt{n}}{2,58}$$

(Ec. 1)

El valor de 2,58 es el valor tabulado en una distribución-t correspondiente a un intervalo de confianza del 99% ($\alpha = 0,01$) y con el máximo número de grados de libertad (∞).⁷ La Tabla 2 resume los valores del coeficiente de variación de la repetibilidad del procedimiento (C.V.%), mediante la aplicación de la Ecuación 1 para diferentes valores de LA y número de replicados (n).⁷

	PARAMETROS				
	Selectividad	Linealidad	Exactitud	Precisión	LC
Cambio de tipo de muestra o matriz	si	si	si	no	si ¹
Cambio sustancial en instrumentos	si	si	no	si	si ¹
Cambio de condiciones operacionales	si	no	no	si	si ¹
Cambio en el proceso de síntesis del analito	si	si	si	no	si ¹

Tabla 1. Parámetros a revalidar según los cambios.

¹ El Límite de Cuantificación (LC) sólo se calcula si procede.

LA	Nº de replicados (n)					
	1	2	3	4	5	6
99,0-101,0 %	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
98,5-101,5 %	0,6	0,8	1,0	1,2	1,3	1,4
98,0-102,0 %	0,8	1,1	1,3	1,6	1,7	1,9
95,0-105,0 %	1,9	2,7	3,4	3,9	4,3	4,8
90,0-110,0 %	3,9	5,5	6,7	7,8	8,7	9,5
85,0-115,0 %	5,8	8,2	10,1	11,6	13,0	14,2

Tabla 2. Coeficiente de variación (C.V.%) en función del límite de aceptación (LA) y el nº de replicados (n).⁷

MATERIAL Y MÉTODO DE ANÁLISIS

El análisis de nitrógeno mediante el método Kjeldahl se inicia con una etapa de mineralización de la muestra de taurina. En el presente trabajo se pesa la muestra con una balanza analítica Mettler AE200 (resolución= 0,1 mg; Tolerancia= ± 0,5 mg) y la mineralización se realiza con el *bloque digestor JPSelecta* (Figura 2) utilizando ácido sulfúrico concentrado y Se/K₂SO₄ en tabletas como catalizador. Se calienta hasta unos 370 °C y se mantiene a esta temperatura durante unos 30 minutos. De esta manera, el nitrógeno contenido en la muestra se convierte en amonio, mientras que el resto de materia orgánica se oxida a agua y dióxido de carbono (Ec. 2).

Una vez digerida la muestra se basifica con NaOH al 40% (Ec. 3). El amoniaco generado se destila por arrastre con vapor y se recoge en una disolución de H₃BO₃ al 4% (Ec. 4). La disolución de borato amónico obtenida se valora con una disolución patrón de H₂SO₄ (Ec. 5).^{11,13}

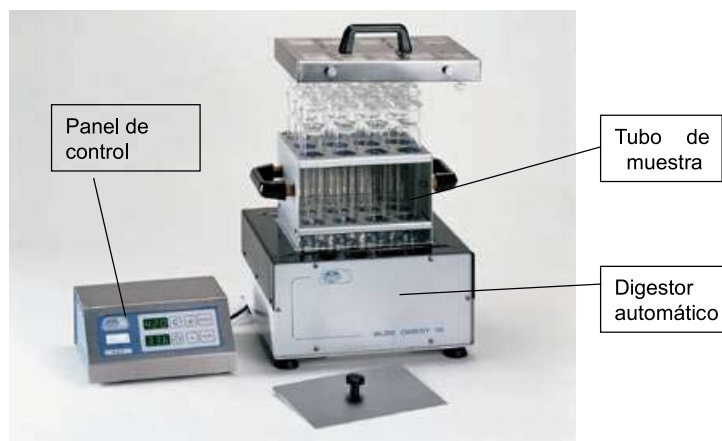


Figura 2: Bloque digestor JPSelecta.

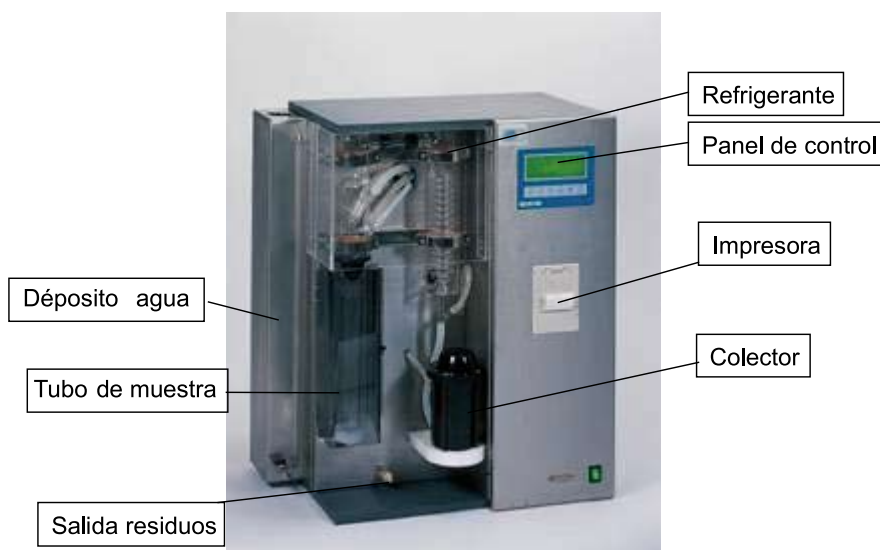
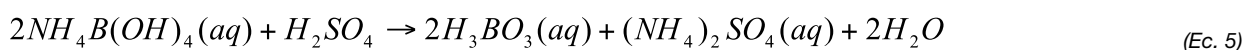
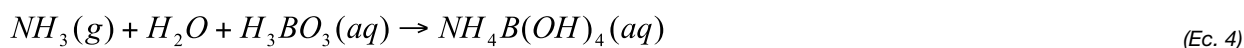
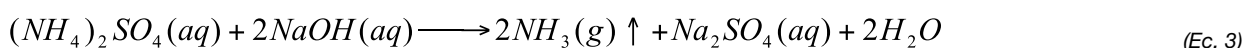
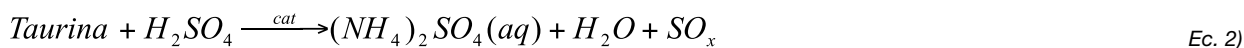


Figura 3: Destilador automático microKjeldahl PN 1430 JPSelecta.



Con el fin de automatizar el método, se ha utilizado el *destilador automático microKjeldahl PN 1430 JPSelecta*. Dicho equipo dosifica la cantidad deseada de reactivos para el análisis, hace la destilación de la muestra proveniente de la etapa de digestión y una valoración "on line" del destilado, detectando el punto final automáticamente por un cambio de color.¹³ (Figura 3)

El volumen de ácido sulfúrico utilizado para valorar la disolución de borato amónico permite calcular el porcentaje de nitrógeno (N en % p/p) presente en la muestra (Ec. 6):

$$N \% (p/p) = V (\text{mL H}_2\text{SO}_4) * \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} * N(\text{eqH}_2\text{SO}_4/\text{L}) * \frac{1 \text{ eq NH}_4\text{B(OH)}_4}{1 \text{ eq H}_2\text{SO}_4} * \frac{14,01 \text{ g N}}{1 \text{ eq NH}_4\text{B(OH)}_4} * \frac{1}{P(\text{g})} * 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Siendo:

V (mL H₂SO₄): volumen en mL de ácido sulfúrico para valorar la disolución de borato amónico.

N (eq H₂SO₄/L): concentración del ácido sulfúrico en unidades de normalidad.

P (g): peso en gramos de muestra.

Para estudiar la contribución del sistema instrumental en la variabilidad de los resultados, se realiza un estudio previo de confirmación metrológica del destilador automático utilizando un patrón de sulfato amónico. Se determina la incertidumbre de los resultados, según la cantidad de nitrógeno y la normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la valoración (Tabla 3).¹³

La incertidumbre del equipo (u_{equipo}) se ha obtenido a partir de la suma cuadrática de la contribución de la incertidumbre del patrón, la resolución del equipo, la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos (Ec. 7):^{14,15}

$$u_{\text{equipo}} = \sqrt{u_{\text{patrón}}^2 + u_{\text{resolución}}^2 + u_{\text{precisión}}^2 + u_{\text{exactitud}}^2} \quad (\text{Ec. 7})$$

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 3), y teniendo en cuenta que la USP recomienda utilizar H₂SO₄ 0,1 N cuando se analizan más de 2 o 3 mg de nitrógeno,¹¹ se ha decidido realizar el análisis de taurina con una cantidad de muestra equivalente a 10 mg de nitrógeno, es decir, con 0,1 g de muestra. En tal caso, el error asociado al sistema instrumental se considera adecuado (U= ±1,4%) ya que permitiría controlar el producto dentro del intervalo de aceptación establecido en las especificaciones (100-LA =100-98,5 = 1,5%). Cabe destacar que en estas condiciones, y realizando replicados independientes, la contribu-

ción del error de la pesada (± 0,5%) queda incluida en el término de la precisión.

Por otra parte, al considerar que el valor máximo permitido para el coeficiente de variación de repetibilidad (C.V.%) es de 1,4% y aplicar el modelo propuesto por AEFI para un valor de LA de 98,5% se obtiene que el número de replicados a realizar es de 6 (Tabla 2).

ANÁLISIS DE TAURINA

Para realizar los análisis se dispone de una muestra de taurina que se considera como material de referencia interno. Su contenido en nitrógeno ha sido determinado mediante el análisis Kjeldahl convencional y cumple las especificaciones de la USP.

Los seis replicados del análisis del porcentaje en nitrógeno (N en % p/p), realizados con 0,1 g de muestra de taurina

mg N	H ₂ SO ₄				
	0,02 N	0,05 N	0,10 N	0,25 N	0,50 N
0,5	3,1 %	-			
1	5,5 %	2,9 %			
2	4,3 %	2,2 %			
3	-	2,4 %			
4	4,7 %	2,1 %			
5	3,3 %	2,0 %	1,7 %		
6	2,7 %	-	-		
7	-	1,4 %	-		
8	4,2 %	-	-		
10		1,8 %	1,4 %	1,4 %	
13		1,4 %	-	-	
15		1,3 %	1,6 %	-	
20		1,5 %	1,4 %	1,4 %	4 %
25			1,4 %	-	-
30			2,2 %	1 %	-
35			2,5 %	-	-
40			1,4 %	2,2 %	3,2 %
50				1,1 %	0,4 %
100				1,2 %	1,3 %
150					2 %
200					1,8 %

Tabla 3. Incertidumbre expandida del equipo ($U = 2 * u_{\text{equipo}}$; $k=2$; $p=95\%$) según la concentración de ácido sulfúrico utilizado y la masa de nitrógeno analizada (mg N).

N ° de replicados	Peso (g)	Volumen H ₂ SO ₄ (mL)	N (mg)	N (% p/p)
1	0,1089	8,27	11,58	10,64
2	0,1051	8,25	11,56	10,61
3	0,1071	8,51	11,92	10,95
4	0,1094	8,25	11,56	10,61
5	0,1068	8,49	11,89	10,92
6	0,1089	8,26	11,57	10,62
			Promedio	10,72
			Desviación estándar	0,16
			C.V.(%)	1,5

Tabla 4. Análisis de una muestra de taurina (0,1 g) con H₂SO₄ 0,1 N.

N ° de replicados	Peso (g)	Volumen H ₂ SO ₄ (mL)	N (mg)	N (% p/p)
1	0,5072	7,80	54,72	10,94
2	0,5052	7,86	55,15	11,03
3	0,5396	7,91	55,51	11,10
4	0,5127	7,89	55,36	11,07
5	0,5022	7,93	55,62	11,12
6	0,5043	7,98	56,01	11,20
			Promedio	11,08
			Desviación estándar	0,09
			C.V.(%)	0,8

Tabla 5. Análisis de una muestra de taurina (0,5 g) con H₂SO₄ 0,5 N.

y utilizando H₂SO₄ 0,1 N, proporcionan los resultados de la Tabla 4.

Como se observa, la precisión de los resultados es del mismo orden de magnitud que el criterio de aceptación establecido, pero el promedio de los resultados obtenidos (10,72% N) es inferior a lo esperado y se encuentra fuera de especificaciones (11,03-11,36% N).¹²

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

Se supone que el resultado fuera de especificaciones lo produce el peso de muestra, ya que según el procedimiento utilizado, en el que el peso de muestra es de 0,1 g, un error de 0,002 g ($\pm 2\%$) provocaría que los resultados estuvieran fuera de especificaciones (11,03-11,36% N).

Se decide pesar 0,5 g de muestra, que equivalen a unos 50 mg de nitrógeno, y utilizar ácido sulfúrico 0,5 N. Además, en estas condiciones de trabajo se reduce notablemente la incertidumbre del método (Tabla 3).

Los replicados del análisis del porcentaje en nitrógeno realizados con 0,5 g de muestra de taurina, utilizando H₂SO₄ 0,5 N proporcionan los siguientes resultados (Tabla 5).

En este caso el valor promedio obtenido para el porcentaje de nitrógeno es de 11,08%. Se considera correcto el análisis ya que este valor se encuentra dentro de las especificaciones requeridas (11,03 - 11,36% N) y sólo uno de los resultados no cumple con dichas especificaciones.¹² Además el coeficiente de variación obtenido (C.V.% = 0,8) cumple con el criterio de aceptación establecido (1,4%).

REVALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo y redactado el procedimiento normalizado de trabajo (PNT),

	USP	PNT
Peso muestra (g)	0,03	0,5
mg N	3	50
Catalizador	K ₂ SO ₄ / CuSO ₄	K ₂ SO ₄ / Se
conc. H₂SO₄ (N)	0,1	0,5

Tabla 6. Resumen de las condiciones de trabajo según método: USP y Método optimizado.

es necesario realizar la revalidación del mismo ya que se han realizado modificaciones respecto al método de análisis descrito en la USP.¹¹ Los cambios de condiciones operacionales realizados se resumen en la Tabla 6.

Para el estudio de revalidación será necesario estimar la selectividad y la precisión del método (Tabla 1). No es necesario hacer un estudio del límite de cuantificación, ya que no se trabaja con una cantidad crítica de analito.

Para el estudio de la precisión del método, se dispone de los resultados presentados en la Tabla 5, que se consideran adecuados (C.V.% = 0,8)

Para demostrar la selectividad del método, se estudia la exactitud mediante el cálculo de la recuperación de la muestra de taurina (material de referencia interno) y garantizando así la ausencia de interferencias (Tabla 7).

N ° de replicados	Peso (g)	Recuperación (%)
1	0,5072	97,8
2	0,5052	98,6
3	0,5396	99,2
4	0,5127	98,9
5	0,5022	99,4
6	0,5043	100,1
Promedio		99,0

Tabla 7. Estudio de la recuperación en una muestra de taurina

	Método inicial	Método optimizado
Peso muestra (g)	0,1	0,5
conc. H₂SO₄ (N)	0,1	0,5
Número de análisis	6	5
Promedio resultados (% N)	10,72%	11,08%
C.V.(%)	1,5	0,8

Tabla 8. Resultados del análisis de taurina según método: inicial y optimizado.

El valor promedio obtenido para la recuperación es del 99,0%, valor que cumple con las especificaciones de la farmacopea.

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que el método es selectivo y preciso y por tanto, se considera revalidado.

En la Tabla 8 se resumen las condiciones de trabajo y los resultados obtenidos.

Se ha considerado que los valores obtenidos para la precisión (C.V.%= 0,8) y la exactitud (recuperación%= 99,0 o sesgo%=1,0) son las principales contribuciones para la estimación de la incertidumbre de los resultados. Por ello, se realiza la suma cuadrática, de forma equivalente a la presentada en la ecuación 7, y se obtiene un valor de incertidumbre de 1,3%. Utilizando este valor como criterio en la Tabla 2, el número de replicados a realizar sería de 5. Este valor se considera más adecuado que el valor de 2, número de replicados que se obtendría al aplicar estrictamente el modelo de AEFI (C.V.%= 0,8). Se prefiere la utilización de la incertidumbre ya que además de las fuentes de error asociadas a la precisión, incluye las asociadas a la exactitud. De esta manera, como se pretende obtener el número mínimo de replicados a realizar, el término de la incertidumbre permite obtener un valor que proporciona mayor fiabilidad al procedimiento analítico.

CONCLUSIONES

El método optimizado para el análisis de nitrógeno Kjeldahl, utilizando el bloque digestor y el destilador automático PN 1430 JPSelecta, permite determinar la pureza de muestras de taurina según las especificaciones de la USP, tal como se ha comprobado con su revalidación.

Las actividades de confirmación metrológica del equipo han permitido determinar las condiciones más adecuadas para realizar los ensayos (concentración de ácido y peso de muestra) teniendo en cuenta la precisión requerida por el método.

La fórmula de AEFI para estimar el valor del mínimo número de replicados a realizar, conociendo el coeficiente de variación de la repetibilidad del método (C.V.%) y el límite de aceptación de las especificaciones, puede obtener resultados más representativos cuando se sustituye el término correspondiente a la repetibilidad (C.V.%) por el de la incertidumbre.

BIBLIOGRAFIA

1. Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. The sulfur-containing amino acids: An overview 1. *Journal of Nutrition* 2006, 136 (6), 1636S-1640S.
2. *The Merck Index*; twelfth ed.; 1999.
3. Geiss, K. R.; Jester, I.; Falke, W.; Hamm, M.; Waag, K. L. The Effect of A Taurine-Containing Drink on Performance in 10 Endurance-Athletes. *Amino Acids* 1994, 7 (1), 45-56.
4. Ratamess, N. A.; Hoffman, J. R.; Ross, R.; Shanklin, M.; Faigenbaum, A. D.; Kang, J. Effects of an amino acid/creatine energy supplement on the acute hormonal response to resistance exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2007, 17 (6), 608-623.
5. Gupta, R. C.; Win, T.; Bittner, S. Taurine analogues; A new class of therapeutics: Retrospect and prospects. *Current Medicinal Chemistry* 2005, 12 (17), 2021-2039.
6. Lima, L. Taurine and its trophic effects in the retina. *Neurochemical Research* 1999, 24 (11), 1333-1338.
7. *Validación de Métodos Analíticos. Monografía de AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)*; 2001.
8. *USP 30. Validación de Procedimientos Farmacopéicos*; 2007.
9. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. Annex 15: Qualification and Validation. 25. *European Commission* 2001, <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-4/pdfs-en/v4an15.pdf>
10. Loftus, B. T.; Nash, R. A. *Pharmaceutical Process Validation*; Marcel Dekker Inc.: 1984.
11. *USP 30. Determination de Nitrógeno*; 2007.
12. *USP 30. Monografía de la taurina*; 2007.
13. Monràs, M.; Margarit, L.; Blanco-Roca, M. J. Validación del procedimiento de análisis de N-Kjeldahl en aguas residuales con el destilador automático PN 1430 Selecta. *Técnicas de laboratorio* 2003, 284, 670-675.
14. Báguena-Polo, J.; Blanco-Roca, M. J. Gestión de equipos en laboratorios de análisis químico. *Afinidad* 2006, Vol. 63, nº 521, 7-12.
15. Báguena-Polo, J.; Gotor-Navarro, G.; Broto-Puig, F.; Blanco-Roca, M. J. Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados basado en la validación de un procedimiento de análisis. Aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados. *Afinidad* 2008, Vol. 65, nº 533, 11-19.