
NORMA CUBANA

NC

ISO 8968-1: 2010
Publicada por la ISO en 2001

**LECHE — DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE
NITRÓGENO — PARTE 1: MÉTODO KJELDAHL (MÉTODO DE
REFERENCIA)
(ISO 8968-1: 2001, IDT)**

**Milk — Determination of nitrogen content — Part 1: Kjeldhal method
(Reference method)**

ICS: 67.100.10

1. Edición Diciembre 2010
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 8968-1:2010

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 35 de Leche y productos lácteos, integrado por representantes de las siguientes entidades:

- | | |
|---|--|
| -Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA) | -EPL Holguín |
| -Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos (INHA) | -EPL Guantánamo |
| -Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV) | -EPL Pinar del Río |
| -Oficina Nacional de Normalización (ONN) | -EPL Villa Clara |
| -Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) | -EPL Río Zaza |
| -Unión Nacional de Industrias Lácteas | -EPL Bayamo |
| -Empresa Lácteos Coppelia (EPL) | -EPL Santiago |
| -EPL Isla de la Juventud | -EPL Complejo Lácteo |
| -EPL Habana | -EPL Ciego de Avila |
| -EPL Matanzas | -EPL Tunas |
| -EPL Escambray | - Inst. Investig. en Normalización. ININ |
| -EPL Camaguey | -Alimport MINCEX |
| -Ministerio del Comercio Interior (MINCIN) | - Laboratorio CUBA Control S.A |
| -Instituto de Investig.de la Industria Alimenticia (IIIA) | -LABIOFAM Unidad de Producción 2 |

- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la ISO 8968-1: 2001 (IDF 20-1:2001) Milk. Determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldhal method. (Reference method).

© NC, 2010

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

LECHE — DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO PARTE 1: MÉTODO KJELDAHL

ADVERTENCIA: El uso de esta parte de ISO 8968 (IDF 20) puede involucrar el uso de materiales, funcionamientos y equipos arriesgados. Esta norma no pretende referirse a todas las normas de seguridad asociadas con su uso. Es la responsabilidad del usuario de esta norma establecer la seguridad apropiada y las prácticas saludables y determinar la pertinencia a priori de las limitaciones para usar la misma.

1 Alcance

La ISO 8968 (IDF 20) especifica un método para la determinación del contenido de nitrógeno en leche líquida, entera o desnatada, por el método de Kjeldahl.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para referencias fechadas, solo es aplicable la edición citada. Para referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento de referencia (incluyendo cualquier enmienda).

ISO 707:1985 Leche y Productos Lácteos. Métodos de muestreo.

ISO 5538: 2004 Leche y productos lácteos. Muestreo. Inspección por atributos.

ISO 385-1, Cristalería de Laboratorio. Buretas. Parte 1: Requisitos Generales.

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los siguientes términos y definiciones:

3.1 contenido de nitrógeno

La fracción de masa de nitrógeno determinado por el procedimiento especificado en esta parte de de ISO 8968 (IDF 20)

NOTA: El volumen de nitrógeno se expresa como un porcentaje de masa

4 Principio

Se pesa una determinada cantidad de leche, se digiere con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y sal de Dubois, que eleva el punto de ebullición del ácido sulfúrico, en presencia de sulfato de cobre II como catalizador, con el objetivo de convertir el nitrógeno de los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal.

El amoniaco liberado por la adición de un exceso de una disolución de Hidróxido de sodio se destila y recoge en una disolución de ácido bórico, valorándose posteriormente con una disolución de ácido clorhídrico.

5 Reactivos

Use sólo reactivos de calidad analítica reconocida, a menos que sea especificado de otra manera, y agua destilada o desmineralizada de pureza equivalente.

5.1 Sal de Dubois (K_2SO_4), libre de nitrógeno.

5.2 Solución de sulfato de cobre (II), $c(CuSO_4) = 5,0$ g por 100 mL.

Disuelva 5,0 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en el agua, en un frasco volumétrico de 100 de mL. Diluya con el agua hasta la marca y mezcle.

5.3 Ácido sulfúrico (H_2SO_4), con una fracción de masa de por lo menos 95% a 98%, libre de nitrógeno ($p_{20} = 1,84$ g/mL aproximadamente).

5.4 Solución de hidróxido de sodio (NaOH), libre de nitrógeno, conteniendo 50 g de hidróxido de sodio por cada 100 g de solución.

5.5 Solución de indicador

Disuelva 0,1 g de rojo de metilo en etanol al 95% (v/v fracción de volumen). Diluya a 50 mL con el etanol. Disuelva 0,5 g de bromocresol verde en 250 mL de etanol al 95% (v/v fracción de volumen). Mezcle una parte de la solución de rojo de metilo con cinco partes de la solución de bromocresol verde o mezcle las dos soluciones preparadas.

5.6 Solución de ácido bórico, $c(H_3BO_3) = 40,0$ g/L.

Disuelva 40,0 g de ácido bórico en agua caliente en un frasco volumétrico de 1 000 mL hasta la marca. Deje refrescar la solución hasta 20 °C. Agregue 3 mL de la solución del indicador (5.5) y mezcle. Guarde la solución que será de color naranja claro en una botella de borosilicato. Proteja la solución de la luz y gases de amoníaco durante el almacenamiento.

Si se usa un metro pH para determinar el punto final de la valoración, la suma de la solución del indicador a la solución del ácido bórico puede omitirse. Por otro lado, el cambio en el color también puede usarse como un chequeo apropiado del procedimiento de valoración.

5.7 Solución volumétrica estándar de ácido clorhídrico, $c(HCl) = (0,1 \pm 0,0005)$ mol/L.

Se recomienda que este reactivo se compre para el uso en la industria de alimentos o que no exceda la especificación anterior.

NOTA: A menudo errores sistemáticos (que pueden evitarse) introducidos por el analista, al diluir el ácido concentrado y determinando su molaridad, pueden reducir la reproducibilidad del método. El analista no debe usar una solución para la valoración que tenga una concentración mayor que 0,1 mol/L, porque esto reducirá el volumen total de la muestra valorada y daría una lectura incierta en la bureta, aumentando el valor en porcentaje de la valoración. Esto tendrá un impacto negativo en la repetibilidad y reproducibilidad del método. Los mismos problemas y otros errores adicionales pueden presentarse cuando se sustituye un ácido por otro, por ejemplo, cuando el ácido sulfúrico es sustituido por el ácido clorhídrico. Por lo que estas sustituciones no se recomiendan.

5.8 Sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$, en polvo, de concentración mínima de 99,9% (fracción de masa).

Antes de su uso, secar el sulfato de amonio a temperatura de $102 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, por no menos de 2 horas. Refresque en un desecador.

5.9 Triptófano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) o clorhidrato de lisina ($C_6H_{15}ClN_2O_2$), de concentración mínima de 99% (fracción de masa). No seque estos reactivos en un horno antes del uso.

5.10 Sacarosa, con un contenido de nitrógeno de no más de 0,002% (en fracción de masa). No seque la sacarosa en un horno antes del uso.

6. Aparatos

6.1 Baño de agua, capaz de mantener la temperatura a $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

6.2 Frascos Kjeldahl, de 500 mL o 800 mL, de capacidad.

6.3 Balanza analítica, de 0,1 mg. de precisión.

6.4 Facilitadores de la ebullición, por ejemplo, brillado de piedra pómez, polvo de cinc, pedazos duros de porcelana o gránulos de alta-pureza anfóteros de alundum (i.e. carbarundum), habituales, tamaño de malla 10. No rehúse los facilitadores.

NOTA: A veces pueden usarse cuentas de vidrio de aproximadamente 5 mm de diámetro, pero estas no podrían promover una ebullición eficaz, como los gránulos del alundum y pueden presentarse problemas más complicados, durante la digestión, con estas cuentas.

6.5 Bureta o pipeta automática, capaz de entregar 1,0 mL de la disolución de sulfato de cobre II (5.2).

6.6 Matraces aforados de 50 mL, 100 mL y 500 mL de capacidad.

6.7 Aparato para la digestión, para sostener los frascos Kjeldahl (6.2) en una posición inclinada (45° aproximadamente), con calentadores eléctricos o mecheros de gas que no calientan los frascos por sobre el nivel de sus contenidos y con un sistema extractor de humo.

El calentador debe ser ajustable para controlar que se fije el máximo calor durante la digestión. Precaliente el calentador en calor fijo para evaluación. En el caso de un calentador de gas, el período de precalentamiento será de 10 minutos y para un calentador eléctrico será de 30 minutos. Determine el calentador a usar y ponga 250 mL de agua y añada de 5 a 10 del facilitador de ebullición con una temperatura inicial de 25 °C , hasta su punto de ebullición en 5 a 6 minutos. Este es el calentamiento máximo a ser usado durante la digestión.

6.8 Aparato de destilación, hecho de cristal de borosilicato u otro material conveniente en el que pueda encajarse un frasco Kjeldahl (6.2) consistente en una salpicadura-cabeza eficaz conectado a un condensador eficaz con el tubo interno recto y un tubo de salida unido a su parte inferior final. El empalme del tubo y tapones serán apretados fuertemente y preferentemente será de neoprene.

6.9 Frascos cónicos graduados, de 500 mL de capacidad y 200 mL, de valor de división.

6.10 Bureta graduada, de 50 mL de capacidad y de 0,01 mL, de valor de división, cumpliendo los requisitos de ISO 385-1, clase A.

Alternativamente, puede usarse una bureta automática si cumple los mismos requisitos.

6.11 Valorador automático provisto de un pH-metro.

El pH-metro debe calibrarse correctamente en el rango de pH 4 a 7 siguiendo el procedimiento normal de calibración del laboratorio.

7 Muestra

El muestreo no es objetivo del método especificado en esta parte de la ISO 8968/ IDF 20. Un método de muestreo recomendado se da en la ISO 707. Es importante que el laboratorio reciba una muestra verdaderamente representativa, que no se haya dañado o sufrido cambios durante su transporte o almacenamiento.

8 Preparación de la muestra

Caliente la muestra en el baño de agua (6.1) a 38 °C. Con suavidad mezcle completamente la muestra invirtiendo la botella de la muestra varias veces sin batir o causar espuma. Refresque la temperatura de la muestra, inmediatamente pese la porción de ensayo (9.1).

NOTA: El tamaño de la muestra aplicable a otros productos lácteos, aparece en el anexo A.

9 Procedimiento

9.1 Porción de la muestra y pre-tratamiento

Agregue a un frasco Kjeldahl limpio y seco (6.2), 5 a 10 facilitadores de ebullición (6.4), 15,0 g de la sal de Dubois (5.1), 1,0 mL de la solución de sulfato de cobre (II) (5.2), 5 mL \pm 0,1 mL aproximadamente de la muestra de ensayo preparada (cláusula 8), pesado lo más cercano a los 0,1 mg y 25 mL de ácido sulfúrico (5.3). Use el ácido sulfúrico para lavar cualquier solución de sulfato de cobre(II), sal de Dubois o porción de la muestra que estén en el cuello del frasco. Si cualquier contenido carbonizado todavía permanece en el cuello, enjuáguelo con una cantidad pequeña de agua. Suavemente, mezcle los volúmenes del frasco Kjeldahl.

NOTA: Para el tamaño de la muestra de ensayo para aplicar este método a los productos lácteos, vea el Anexo A.

9.2 Determinación

9.2.1 Digestión

Encienda el sistema extractor de humo del aparato de digestión (6.7) antes de empezar la digestión. Caliente el frasco Kjeldahl y su contenido (9.1) en el aparato de digestión usando un calentador, con calor lo suficientemente bajo, de forma tal que el contenido carbonizado no haga espuma en el cuello del frasco Kjeldahl. Digiera a este calor hasta que aparezcan humos blancos en el frasco, después de aproximadamente 20 minutos. Aumente el calentador a la mitad del máximo determinado en 6.7 y continúe calentando por 15 minutos. Al final del período de 15 minutos aumente el calor al máximo determinado en 6.7. Después de que el contenido aclara (con color azul-verde claro), continúe hirviendo de 1 h a 1,5 h máximo. Si el líquido no hierve, puede ser que el calor del quemador esté demasiado bajo. El tiempo de la digestión total estará entre 1,8 h (1h y 48 min) y 2,25 h (1h y 15 min).

Para determinar el tiempo requerido para la ebullición en las condiciones de análisis de un laboratorio en particular, usando un aparato específico, seleccione para el análisis de leche una proteína alta y una muestra de leche de grasa alta y determine el contenido de proteína usando

tiempos de ebullición diferentes (1 h a 1,5 h) después de que aclare. A mayor contenido de proteína mayor será el tiempo de ebullición, pero este valor disminuye si el tiempo de ebullición se hace muy largo. Seleccione el tiempo de ebullición que rinda el resultado máximo de proteína.

Al final de la digestión, el contenido estará claro y libre del material no digerido. Permita refrescar el contenido en un frasco abierto sin la tapa a la temperatura del local por un período de aproximadamente 25 minutos y tápelo. Si el frasco se deja en los quemadores calientes, tomará mucho más tiempo para alcanzar la temperatura ambiente. El contenido refrescado debe ser líquido o líquido con algunos cristales pequeños en el fondo del frasco, al final del período de refrescamiento de 25 minutos. No deje el contenido puro toda la noche en los frascos, pues puede cristalizar durante este período y será muy difícil de volver a la solución.

NOTA: La cristalización excesiva después de los 25 minutos es el resultado de pérdida ácida indebida, durante la digestión y puede producir valores bajos en la prueba. La pérdida ácida indebida es causada por la aspiración excesiva de humo o por un tiempo de la digestión excesivamente largo, causado por una acción máxima incorrecta del quemador.

Agregue 300 mL de agua a los frascos Kjeldahl de 500 mL ó 400 mL de agua al usar frascos Kjeldahl de 800 mL. Use el agua también para lavar debajo del cuello del frasco. Mezcle los volúmenes completamente, asegurando que se disuelvan los cristales. Agregue de 5 a 10 facilitadores de la ebullición (6.4). Deje refrescar la mezcla de nuevo a la temperatura del local antes de la destilación. Los contenidos diluidos pueden ser tapados y retenidos para destilar más tarde.

9.2.2 Destilación

Encienda el condensador de agua del aparato de destilación (6.8). Agregue 75 mL de solución de hidróxido de sodio (5.4) al contenido diluido (9.2.1) vertiendo la solución cuidadosamente hacia abajo por el cuello inclinado del frasco Kjeldahl para formar una capa al fondo de la bombilla del frasco. Debe haber una interfase limpia entre las dos soluciones. Para reducir la posibilidad de pérdida del amoníaco, inmediatamente después de la adición de la solución del hidróxido de sodio al frasco Kjeldahl, conecte rápidamente el aparato de destilación (6.8). La punta del tubo de salida del condensador se sumerge en 50 mL de la solución de ácido bórico (5.6) contenida en un frasco cónico (6.9). Agite vigorosamente el frasco Kjeldahl para mezclar sus volúmenes completamente hasta que no sea visible separación de fases en la solución en el frasco. Ponga el frasco abajo en el quemador. Encienda el quemador a calor fijo y alto para hervir la mezcla. Continúe la destilación hasta que empiece la ebullición irregular (golpeando) y entonces inmediatamente desconecte el frasco Kjeldahl y apague el quemador. Apague el condensador de agua. Enjuague con agua corriente por dentro y por fuera la punta del tubo de salida, recolectando el destilado en el frasco cónico y mezcle.

La proporción de la destilación será de aproximadamente 150 mL del destilado que había antes que comenzara la ebullición irregular. El volumen total del frasco cónico será de aproximadamente 200 mL. Si el volumen de destilado reunido es menor de 150 mL entonces es probable que se haya añadido menos de 300 mL de agua para diluir el contenido.

La eficiencia del condensador será tal que la temperatura del contenido dentro del frasco cónico no exceda los 35 °C durante la destilación, cuando se use un método colorimétrico para determinar el punto final.

9.2.3 Valoración

Valore los volúmenes del frasco cónico (9.2.2) con el ácido clorhídrico (5.7) usando una bureta (6.5). El punto final se alcanza al primer rastro de color rosa en los volúmenes. Estime la lectura de

la bureta con una aproximación de 0,05 ml. Un plato agitador magnético iluminado puede ayudar a visualizar el punto final.

Alternativamente, valore los volúmenes del frasco cónico (9.2.2) con el ácido clorhídrico (5.7) usando un valorador automático propiamente calibrado equipado con un pH-metro (6.11). El punto final del pH de la valoración se alcanza a pH 4,6, siendo el punto de inflexión de la curva. Lea en el valorador automático la cantidad de valorante que utilizó.

NOTA 1 El primer rastro de color rosa se observa entre el pH 4,6 y 4,3 para el sistema del indicador y 4% solución del ácido bórico especificado en este método. En la práctica la proporción de cambio de pH en función de la adición de 0,1 mol/L HCl es muy rápido dentro de este rango de pH. Toma aproximadamente 0,05 ml de 0,1 mol/L HCl para cambiar el pH por 0,3 unidades en el rango de pH de 4,6 a 4,3 en este sistema.

NOTA 2 Dentro de las estadísticas inter-laboratorios para este método, se usan valoraciones colorimétricas para determinar el punto final. Comparando los resultados finales del ensayo, se obtuvo un punto final con un pH 4,6, que mostró que, estadísticamente, no existía ninguna diferencia significativa entre ellas.

9.3 Prueba en blanco

Siempre valore el blanco con el mismo ácido clorhídrico (5.7) y bureta (6.5) o valorador automático provisto con un pH-metro (6.11) como el usado para las porciones de ensayo. Lleve a cabo una prueba en blanco siguiendo el procedimiento descrito en 9.1 a 9.2.3. Reemplace la porción de la prueba con 5 ml de agua y aproximadamente 0,85 g de sacarosa (5.10).

Guarde un registro de los valores del blanco. Si hay cambio de valores para el blanco, identifique la causa.

NOTA 1 El propósito de la sacarosa en un blanco o un recobrado normal es actuar como el material orgánico para consumir una cantidad de ácido sulfúrico durante la digestión que es aproximadamente equivalente a una porción de ensayo. Si la cantidad de ácido sulfúrico libre residual al final de la digestión es demasiado baja, la recuperación de nitrógeno por ambas pruebas de recuperación, en 9.4.2 y 9.4.3, será baja. Sin embargo, si la cantidad presente del ácido residual al final de la digestión es suficiente para retener todo el nitrógeno, pero las condiciones de temperatura y tiempo durante la digestión no eran suficientes para liberar todo el nitrógeno de una muestra, la recuperación de nitrógeno en 9.4.2 será aceptable y la recuperación de nitrógeno en 9.4.3 será baja.

La cantidad de valorante usada en la prueba en blanco siempre debe ser mayor que cero. Los blancos dentro del mismo laboratorio deben ser consistentes a través del tiempo. Los valores típicos de blanco son iguales o menores de 0,2 mL.

NOTA 2 Si el blanco es casi de color rosa antes de comenzar la valoración, es que hay algún error. En estos casos los frascos cónicos no están completamente limpios o hay aire húmedo condensado por fuera del condensador que ha goteado dentro del frasco colector y puede causar una contaminación.

9.4 Prueba de recobrado

9.4.1 La exactitud del procedimiento debe verificarse regularmente por medio de la siguiente prueba de recobrado, según 9.1 a 9.2.3.

9.4.2 Chequee que no haya ocurrido pérdida de nitrógeno por el uso de una cantidad de porción de ensayo de 0,12 g de sulfato del amonio (5.8) junto con 0,85 g de sacarosa (5.10).

NOTA: El control del recobrado de sulfato de amonio no da información sobre la capacidad de la digestión para liberar el nitrógeno que está en la estructura de la proteína.

El porcentaje de nitrógeno recuperado estará entre 99,0% y 100,0% para todas las posiciones en el aparato. Para los recuperados menores que 99%, la concentración del valorante es superior que el valor declarado, o puede haber ocurrido pérdida de nitrógeno en la digestión o destilación. Es posible usar una mezcla de sulfato de amonio y una pequeña cantidad de ácido sulfúrico (la cantidad de residuo que permanece al final de la digestión) en el frasco Kjeldahl. Dilúyalo con un volumen normal de agua, agregue la cantidad normal de hidróxido de sodio y destile. Si el recuperado de nitrógeno todavía es bajo, la pérdida de nitrógeno está en el aparato de destilación y no en el de la digestión. Es probable que la causa sea que la tubería esté resquebrajada en un sistema tradicional o que las puntas de los condensadores no estén sumergidas bajo la superficie del ácido bórico en la destilación. El aparato debe ser chequeado según el procedimiento 9.4.3, antes de comenzar el ensayo.

En el caso que el recuperado de nitrógeno exceda el 100%, no podrá observarse pérdida de nitrógeno. En este caso, puede deberse a algunas de las causas siguientes:

- a) el sulfato de amonio está contaminado;
- b) la concentración real del valorante es más baja que su valor declarado;
- c) la calibración de la bureta para la valoración tiene problemas.
- d) la temperatura del valorante está muy por encima de la temperatura de calibración de la bureta;
- e) la velocidad máxima de flujo de salida de la bureta de la sustancia valorante excede a la velocidad máxima de salida a la cual está calibrada la bureta.

9.4.3 Para el chequeo de la eficiencia de la digestión use 0,16 g de clorhidrato de lisina ó 0,18 g de triptófano (5.9) junto con 0,67 g de sacarosa (5.10).

Al menos una fracción de masa de 98% de nitrógeno se recuperará. Si el recuperado es menor del 98%, después de tener una fracción de masa de 99% a 100% de recuperado del sulfato de amonio, entonces la temperatura o tiempo de digestión fueron insuficientes (siga el procedimiento en 9.2.1, párrafo 1 y nota) o hay material de la muestra no digerido dentro del frasco Kjeldahl. La evaluación final del rendimiento se realiza por un programa dentro de – e inter-laboratorios donde se computan los parámetros estadísticos basado en el análisis de muestras de leche.

9.4.4 Resultados bajos en cualquiera de las pruebas de recuperado (o mayores que 100,0% en 9.4.2) indican fallos en el procedimiento y/o inadecuada concentración de la solución de ácido clorhídrico (5.7).

10 Cálculo y expresión de los resultados

10.1 Cálculo de volumen de nitrógeno

10.1.1 Cálculo del contenido de nitrógeno de la muestra, W_N , usando la ecuación siguiente:

$$W_N = \frac{1,4007 (V_S - V_b) Mr}{m}$$

W_N es el contenido de nitrógeno de la muestra, expresada como un porcentaje por masa;

V_S es el valor numérico del volumen, en mililitros, del ácido clorhídrico (5.7) que se usó en la determinación (9.2.3), con una aproximación de 0,05 ml;

V_b es el valor numérico del volumen, en mililitros, de ácido clorhídrico (5.7) usado en la prueba (9.3), con una aproximación de 0,05 ml;

M_r es el valor numérico exacto de la molaridad del ácido clorhídrico (5.7), expresado a cuatro lugares decimales;

M , es el valor numérico, en gramos, de la masa de la porción de la prueba (9.1), con una aproximación de 0,1 mg;

10.1.2 Exprese los resultados obtenidos a cuatro lugares decimales, para los cálculos adicionales. En el caso de resultados finales, expréselos para el contenido del nitrógeno a tres lugares decimales y para el contenido de proteína a dos lugares decimales. Los resultados obtenidos no deben redondearse más allá hasta obtener el valor final de la prueba.

NOTA: Esto es particularmente cierto cuando los valores serán usados para cálculos adicionales. Un ejemplo es cuando los valores de muchas muestras individuales se usan para calcular estadísticamente el desempeño del método, para la variación inter-laboratorios. Otro ejemplo es cuando los valores se usan como una referencia para la calibración del instrumento (por ejemplo el análisis infrarrojo de la leche) donde se usarán los valores de muchas muestras en el cálculo de la regresión múltiple o simple. Los resultados obtenidos no deben redondearse antes de que ellos se usen para los cálculos adicionales.

10.2 Cálculo de volumen de la proteína cruda

10.2.1 Cálculo del contenido de proteína cruda de la muestra, (W_p) usando la ecuación siguiente:

$$W_p = W_N \times 6,38$$

Donde:

W_p es el contenido de proteína cruda de la muestra, expresada como un porcentaje de la masa,

W_N es el contenido de nitrógeno de la muestra, expresado como un porcentaje de la masa a cuatro lugares decimales (10.1);

6,38 el multiplicando generalmente aceptado, factor para expresar el contenido de nitrógeno como el contenido de proteína crudo.

10.2.2 Exprese los resultados obtenidos para el contenido de proteína cruda a tres lugares decimales, para los cálculos adicionales. En el caso de resultados finales (vea 10.1), exprese éstos a dos lugares decimales.

11 Precisión

11.1 Prueba Inter-laboratorios

Los valores límites para la repetibilidad y reproducibilidad, se derivaron del resultado de una prueba inter-laboratorio llevada a cabo de acuerdo con (ISO 57251). Los detalles de la prueba del método inter-laboratorio se resumen en las referencias [5], [6]. Los valores derivados de esta prueba no pueden ser aplicables a otros rangos de concentración y de muestras diferentes a las que aparecen en la norma.

11.2 Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados únicos independientes de la prueba, obtenidos usando el mismo método, en la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operador que usa el mismo equipo dentro de un intervalo corto de tiempo, no será en más del 5% de los casos mayor que 0,006% para el contenido de nitrógeno (0,038% para el contenido de proteína cruda).

11.3 Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados únicos de la prueba, obtenidos usando el mismo método, en idéntico material de prueba, en laboratorios diferentes con operadores diferentes que usan un equipo diferente, no será en más del 5% de los casos, mayor que 0,007 7% para el contenido de nitrógeno (0,049% para el contenido de proteína cruda).

12 Informe de la prueba

El informe de la prueba especificará:

- toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra;
- el método de muestreo usado, si es conocido;
- el método de prueba que usó, con la referencia a esta parte de la ISO 8968-1/ IDF 20;
- todos los detalles operativos que no se especificaron en esta parte de la ISO 8968-1/ IDF 20, o que consideró opcionales, junto con los detalles de cualquier incidente que pueda haber influido en el resultado(s);
- el resultado (de la prueba) obtenido;
- si la reproducibilidad se verificó, citar el resultado final obtenido;
- si la recuperación se ha verificado, citar el resultado final obtenido.

Anexo
(informativo)

Procedimiento modificado para el análisis de otros productos lácteos cuando no existe una norma individual para ese producto.

A.1 General

El procedimiento descrito en esta parte de la ISO 8968-1/IDF 20 se ha perfeccionado y evaluado para el análisis de leche bovina. Si no existe una individual, un laboratorio puede usar el mismo procedimiento, con una ligera modificación, para la determinación del contenido de nitrógeno en una gama de productos lácteos. Sin embargo, debe notarse que no se han validado el procedimiento y su evaluación para tales usos.

A.2 Procedimiento

Pese, lo más cercano a 0,1 mg, la masa requerida de la porción de prueba, tomada de una muestra de ensayo adecuadamente preparada, como se describe debajo. Proceda con la determinación del contenido de nitrógeno que usa el método descrito en 9.1 a 9.4.

Las cantidades de ácido sulfúrico (5.3) y solución de hidróxido de sodio (5.4), usadas en la digestión y el proceso de la destilación, no deben cambiarse. Cambiando la proporción de ácido a otros componentes aumentando la cantidad ácido disminuye el punto de ebullición inicial de la mezcla en la digestión y esto no se recomienda.

Debe usarse un tamaño apropiado de porción de la prueba al trabajar con los reactivos como se especifica en esta parte de la ISO 8968-1/ IDF 20. La porción de prueba apropiada para cualquier muestra de prueba puede estimarse como sigue. La cantidad óptima de proteína por frasco Kjeldahl (6.2) estará entre 0,15 g y 0,30 g por frasco para cualquier muestra de la prueba. Así, si un promedio de muestra de la prueba de queso Cheddar contiene 24,00% de proteína, la masa de la porción de la prueba debe ser entre 0,625 g y 1,25 g. La decisión de usar masas de porción de prueba que promedian en el extremo inferior o superior del rango, depende de cuánto ácido consumirán el resto de los componentes de la muestra (es decir, la grasa e hidrato de carbono) durante la digestión.

El método describe una adición de 25 mL (aprox. 46 g) de ácido sulfúrico a la porción de la prueba en el frasco de Kjeldahl. Al final de la digestión, aproximadamente 15 g de ácido sulfúrico tienen que dejarse en el frasco para retener todo el nitrógeno.

Debe notarse que el ácido sulfúrico se consume por la porción de la muestra y también hay pérdida debido a la volatilización durante la digestión. La pérdida por la volatilización puede deberse al consumo de la materia orgánica de la muestra. La cantidad final de ácido residual estará en función de estos dos procesos. La pérdida excesiva de ácido por la volatilización (causada por la aspiración excesiva de humos durante la digestión o por estar los cuellos de los frascos demasiado calientes) puede producir muy poco ácido residual al final de la digestión aunque el tamaño de porción de prueba sea el correcto.

Muy poco ácido residual producirá cristalización del contenido después de los 25 minutos de enfriamiento y recobrado bajo de nitrógeno.

La crema que contiene 40% de grasa es un ejemplo de un producto que presenta dificultades. En este caso, el contenido de proteína o nitrógeno de la muestra es bajo y el volumen de grasa es alto. Asuma que una muestra de crema promedio contiene 40% de grasa, 1,9% de proteína y 2,9% de lactosa aproximadamente. Para lograr 0,15 g de proteína en el frasco Kjeldahl (6.2), debe usarse una porción de la prueba de 7,89 g. Esta porción de la prueba contendría 3,16 g de grasa que solo consumiría 56,9 g (ca. 30,9 ml) de ácido sulfúrico en la digestión sin permitir cualquier pérdida de ácido sulfúrico debido a la volatilización (basado en el supuesto de que 1 g de grasa consumiría 18 g de ácido sulfúrico durante la digestión). Éste es un ejemplo donde la cantidad de porción de la prueba debe reducirse para permitir que una cantidad adecuada de ácido sulfúrico pueda quedar al final de la digestión. En el caso de muestras de prueba como la crema, debe usarse un valorante que tenga una concentración más baja (por ejemplo 0,01 mol/L). En estos casos la cantidad de porción de prueba necesita ser reducida para permitir que quede una cantidad adecuada de ácido sulfúrico al final de la digestión.

La cantidad de sacarosa requerida para un blanco o para un recobrado normal en otros productos que no sean la leche bovina puede determinarse como sigue:

Primero, se requiere una estimación del contenido de grasa, proteína e hidrato de carbono para el tipo de muestra de la prueba y la masa de porción de prueba aproximada a ser usada en la digestión.

En segundo lugar, durante la digestión 1 g de grasa consumirá aproximadamente 18 g de ácido sulfúrico, 1 g de proteína consumirá aproximadamente 9 g de ácido sulfúrico, y 1 g de hidrato de carbono consumirá aproximadamente 7 g de ácido sulfúrico.

Basado en la información anterior, puede calcularse la cantidad de ácido consumida por una porción de la prueba y la sacarosa necesaria para consumir la misma cantidad de ácido durante la digestión. La cantidad calculada de sacarosa debe usarse para la prueba en blanco y un recobrado de sulfato de amonio normal.

Para un recobrado de nitrógeno de aminoácidos normal (9.4.3), reduzca la cantidad de sacarosa por la cantidad de ácido que se consumirá (calculado como proteína) por el clorhidrato de lisina o el triptófano. Se asume que el recobrado de nitrógeno en la digestión para el aparato usado es el mismo para las muestras de ensayo de otras leches,

Bibliografía

- [1] ISO 707, Leches y productos lácteos. Guía de muestreo.
- [2] ISO 5725:1986, Precisión de métodos de ensayo. Determinación de repetibilidad y reproducibilidad para un método de ensayo estándar para pruebas inter-laboratorio.
- [3] ISO 5725-1:1994, Exactitud (el trueness y precisión) de métodos de la medida y resultados — la Parte 1: Principios generales y definiciones.
- [4] ISO 5725-2:1994, Exactitud (el trueness y precisión) de métodos de la medida y resultados — Parte 2: Método Básico para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad de un método de la medida normal.
- [5] BARBANO, D.M., CLARK, J.L., DUNHAM, C.E. y FLAMENCO, J.R. Método de Kjeldahl para la determinación del contenido total de nitrógeno en leche: el estudio Colaborativo. *J. Assoc. Fuera de. Anal. Chem.*, **73**, **1990**, el pp. 849-859.
- [6] LINCHE, J.M., BARBANO, D.M. y FLAMENCO, J.R. la evaluación de la Actuación de forzado-aire directo los sólidos totales y Kjeldahl los métodos de nitrógeno totales: 1990 a través de 1995. *J. Assoc. Fuera de. Anal. Chem. Int.*, **80**, **1997**, el pp. 1038-1043.