
NORMA CUBANA

NC

ISO 1871: 2013
(Publicada por la ISO en 2009)

**CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS — DIRECTRICES
GENERALES PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO
POR EL MÉTODO KJELDAHL
(ISO 1871:2009, IDT)**

Meat and meat products — General guidelines for the determination of
nitrogen by the Kjeldahl method

ICS: 67.120.10

1. Edición Diciembre 2013
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, 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 1871: 2013

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 70"eCarne y productos cárnicos" en el que están representadas las siguientes entidades:
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria (IIIA-MINAL)
 - Instituto de Medicina Veterinaria (IMV-MINAG)
 - Laboratorio de Cuba Control, S.A.
 - Empresa Cárnica Tauro
 - Empresa Cárnica Habana
 - Grupo Empresarial de la Industria Alimentaria (GEIA)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 1871: 2009 *Food and feed products — General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.*

© NC, 2013

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, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Introducción

El análisis de productos de origen animal o vegetal usados como alimentos y piensos incluye la determinación de su contenido de nitrógeno según el método Kjeldahl. En principio este método puede estandarizarse cuando generalmente es aceptado que diferentes aparatos o procedimientos operativos son equivalentes si sus resultados son similares. El propósito de este documento es describir las etapas del método, los puntos críticos asociados y los objetivos que deben alcanzarse como mínimo para asegurar que el método se aplicó correctamente. Este documento proporciona directrices generales; no pretende remplazar las normas internacionales que están en uso actualmente.

CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS – DIRECTRICES GENERALES PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR EL MÉTODO KJELDAHL

Aviso: El uso de esta Norma Cubana involucra materiales peligrosos, operaciones y equipos. Esta norma no se propone tratar todos los problemas de seguridad asociados a su uso. Es responsabilidad del usuario de esta norma establecer prácticas de seguridad apropiadas y determinar previo a su uso la aplicación de limitaciones reguladoras.

1 Objetivo

Esta Norma Cubana proporciona directrices generales para la determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl. Se aplica a alimentos y piensos que contienen compuestos nitrogenados que pueden ser determinados directamente por el método Kjeldahl.

Nota: Este principio de medición no toma en cuenta el nitrógeno de los nitratos y nitritos.

2 Principio

Digestión de una porción de ensayo con ácido sulfúrico concentrado en la presencia de catalizadores para convertir el nitrógeno orgánico en sulfato de amonio. Se adiciona un exceso de hidróxido de sodio a la digesta ya enfriada para liberar el amoníaco. Se destila el amoníaco liberado dentro de un exceso de una disolución de ácido bórico y entonces se valora con una solución patrón de ácido clorhídrico. El contenido de nitrógeno se calcula de la cantidad de amoníaco producida.

Nota: En el texto siguiente, el término nitrógeno se refiere al nitrógeno orgánico.

3 Reactivos

Use sólo reactivos de grado analítico reconocido, *a no ser que se especifique otra cosa*, y agua destilada o desmineralizada o agua de una pureza equivalente.

3.1 Ácido sulfúrico, prácticamente libre de compuestos nitrogenados y de densidad $\rho_{20} = 1,83$ g/mL a 1,84 g/mL.

3.2 Catalizadores (ver 5.2.1).

3.3 Disolución de ácido bórico (10 g/L a 40 g/L dependiendo del aparato usado). Si usa la valoración colorimétrica del punto final, la disolución de ácido bórico deberá contener el indicador (el pH o el color de esta mezcla debe ser ajustado antes de usarla).

3.4 Ácido clorhídrico patrón (0,02 mol/L a 0,50 mol/L) o **disolución de ácido sulfúrico** (0,01 mol/L a 0,25 mol/L). El título de la disolución, c_t , deberá conocerse al menos hasta 0,001 mol/L.

3.5 Indicadores, los cuales deben cambiar de color entre pH = 4 y pH = 5.

Nota: Hay varios indicadores disponibles. Un indicador mixto de rojo de metilo y verde bromocresol es el usado comúnmente. Hay disoluciones de ácido bórico listas para usar que contienen indicadores mixtos.

3.6 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), min. 30 % fracción de masa.

3.7 Disolución de hidróxido de sodio, min. 30 % fracción de masa.

3.8 Agentes antiespumantes.

Ejemplo: silicona, parafina líquida

3.9 Sulfato de amonio o cloruro de amonio (pureza mínima 99,9 %).

Inmediatamente antes de usarlo, seque el sulfato de amonio $104 \pm ^\circ\text{C}$ por al menos 2 h. Déjelo enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador.

Nota: Pueden usarse disoluciones de concentración conocida.

3.10 Triptófano o acetanilida o hidrocloreuro de lisina (pureza mínima de 99 % fracción de masa).

Estos reactivos deben mantenerse en un lugar seco.

Aviso: No seque estos reactivos en una estufa antes de usarlos.

3.11 Sacarosa, con un contenido de nitrógeno menor que una fracción de masa de 0,002 %

Aviso: No seque la sacarosa en una estufa antes de usarla.

4 Aparatos y materiales

Los aparatos usuales del laboratorio y, en particular, los siguientes:

4.1 Balanza analítica, capaz de pesar con una aproximación de 0,001 g.

4.2 Sistemas de digestión, destilación por vapor y valoración.

Ellos se usan para realizar las operaciones descritas en la cláusula 5 y asegurar que se cumplan los objetivos descritos en 5.5.3 y 5.5.4.

4.3 Reguladores de la ebullición (si se necesitan), por ejemplo granos de piedra pómez, perlas de vidrio, óxido de aluminio (corindón) o carburo de silicio.

4.4 Papel de pesada o medio, libre de compuestos nitrogenados y adecuado para la porción de ensayo y el tipo de producto.

5 Método operativo

Nota: Según sea la naturaleza de la muestra, puede ser necesario preparar previamente al análisis la porción de ensayo para obtener una muestra homogénea (molido, homogenización, etc.).

5.1 Porción de ensayo

La porción de ensayo, la cantidad de la cual depende del supuesto contenido de nitrógeno determinado por el método Kjeldahl, debe ser representativa de la muestra y contener entre 0,005 g y 0,2 g de nitrógeno.

La porción de ensayo puede obtenerse por pesada con una balanza analítica (4.1), para dar la masa, m , en gramos o usando una pipeta para dar el volumen, V_t , en mililitros.

La porción de ensayo puede introducirse directamente dentro del tubo o por medio de un soporte (4.4).

Puede ajustarse la cantidad de la porción de ensayo de acuerdo con la composición del producto que se analiza y la cantidad de ácido sulfúrico (ver 5.2.2).

5.2 Digestión

5.2.1 Catalizadores

Es importante diferenciar entre los catalizadores que por si mismos facilitan la digestión y aquellas sustancias usadas para elevar el punto de ebullición del líquido durante la digestión. Usualmente

estas sustancias son sulfato de potasio o también sulfato de sodio. Ellas se añaden en cantidad suficiente para elevar el punto de ebullición del ácido entre 380 °C y 430 °C. El catalizador más usado es el cobre en la forma de sulfato de cobre o mezclado con óxido de titanio.

La adición opcional de peróxido de hidrógeno (3.6) sobre la base de 3 mL a 5 mL por tubo previamente al calentamiento acelera la digestión pero debe usarse con sumo cuidado para asegurar que no se pierda nitrógeno en forma de vapor. Además, debe tenerse mucho cuidado cuando se añada el peróxido de hidrógeno en los tubos, pues se produce una fuerte reacción exotérmica.

La cantidad de sulfato de potasio que proporcione el catalizador no deberá ser menor de 7g.

En dependencia de los sectores de actividad, se usan varias composiciones. Ellas deben reunir los requerimientos del ensayo en blanco (5.5.2) y los ensayos de control (5.5.3 y 5.5.4).

5.2.2 Adición de ácido

Es importante usar una cantidad suficiente de ácido sulfúrico para asegurar la digestión teniendo en cuenta:

- consumo de ácido por la materia orgánica de la muestra, considerando que 1g de grasa consume 10 mL de ácido sulfúrico, 1g de proteína 5 mL y 1g de carbohidrato 4 mL;
- consumo de ácido por los reactivos (sales);
- pérdidas de ácido por evaporación.

La adición de 20 mL a 25 mL de ácido (3.1) generalmente es suficiente para una buena digestión y para mantener un exceso de ácido en el final de la reacción.

5.2.3 Calentamiento

AVISO – Las operaciones siguientes deben realizarse bajo una campana extractora de gases muy bien ventilada.

Generalmente deben seguirse las instrucciones del fabricante relativas al uso de los aparatos. El sistema de digestión debe hacerse homogéneo, por ejemplo creando un diagrama térmico o un diagrama de eficiencia del proceso de digestión (5.5.3).

Los agentes productores de humo deben llevarse al punto de ebullición incrementando la temperatura gradualmente o por etapas. Deben usarse tres o cuatro gotas de agente antiespumante por tubo (3.8). Para productos “secos” (i. e. sin humedad visible), los tubos se colocarán directamente en una unidad precalentada.

Se eliminarán los humos ácidos con un sistema de extracción adecuado para el aparato usado.

Una extracción excesiva puede causar cristalización y una pérdida de nitrógeno (ver Anexo A).

En todos los casos, la temperatura y el tiempo de la digestión deben determinarse según los requerimientos de la prueba de control de la digestión (5.5.3).

Nota: El calentamiento a 420 °C durante dos horas es apropiado para numerosas matrices.

La digesta que se obtenga debe estar clara y libre de partículas negras.

Al final del proceso de digestión, deje enfriar los tubos alejados de cualquier contaminación posible. En este estado, las porciones de ensayo pueden guardarse y destilarse más tarde.

Nota: El paso de dilución con agua como se describe en 5.3.1 puede hacerse en este estado para evitar la cristalización.

5.3 Destilación del amoniaco

5.3.1 Alcalinización

Diluya la digesta con agua y entonces alcalinice adicionando al menos 3 mL de disolución de hidróxido de sodio (3.7) por mililitro de ácido sulfúrico (3.1) usado para el proceso de la digestión.

Nota: El volumen de la disolución de hidróxido de sodio adicionada (3.7) puede ser menor si su fracción de masa es mayor que 30 %.

AVISO – Tenga cuidado cuando adicione la disolución, pues el medio se calienta mucho.

5.3.2 Destilación

Realice la destilación con el aparato sujeto a consideración en su condición usual. Colecte el destilado en la disolución de ácido bórico (3.3), que contendrá el indicador (3.5). Ajuste el pH antes del comienzo de la destilación hasta que haya un cambio de color a gris (indicador de verde bromocresol + rojo de metilo).

Hay varios criterios para determinar el final de la destilación, por ejemplo, cuando se ha recogido un volumen determinado del destilado, después de un tiempo de destilación fijado y así sucesivamente. Asegúrese que la destilación sea completa, de acuerdo con las pruebas de control (5.5), y que no haya exceso por arrastre del líquido alcalino.

5.4 Valoración

Se valora el destilado obtenido con ácido sulfúrico (3.1) o clorhídrico (3.4); esto puede hacerse simultáneamente o después de la destilación. La valoración pos-destilación deberá realizarse tan pronto como sea posible después de la destilación. Hay dos métodos para detectar el punto final.

- Por colorimetría visual o usando un sistema óptico de medición: Se alcanza el punto final cuando el indicador cambia de color. En el caso de la colorimetría visual, es importante valorar cada prueba refiriéndose a las condiciones obtenidas en el ensayo en blanco.
- Por análisis potenciométrico con un sistema de medición del pH: Dependiendo del aparato o de los métodos operativos, el punto final puede ser un pH fijo (generalmente pH = 4,6, que corresponde al punto de inflexión de la curva de valoración), el pH obtenido en el ensayo en blanco, o el pH original de la disolución de ácido bórico.

En ambos casos, deberá chequearse la validez de las operaciones de la valoración como se describe en 5.5.4.

Anote los volúmenes del ácido de valoración obtenidos: V_0 para el ensayo en blanco y V_1 para las muestras.

5.5 Pruebas de control

5.5.1 General

Debe incluirse en cada grupo de ensayos de determinación de nitrógeno un ensayo en blanco y al menos un ensayo de control de la destilación y un ensayo de control de la digestión.

5.5.2 Ensayo en blanco

Realice un ensayo en blanco usando el método operativo descrito, reemplazando la porción de ensayo líquida con el mismo volumen de agua y adicione la cantidad apropiada de sacarosa (3.11).

Nota: En los ensayos en blanco y de control de la digestión, se usa la sacarosa como materia orgánica para consumir una cantidad de ácido sulfúrico equivalente a la de una porción de ensayo durante la digestión.

5.5.3 Ensayo de la digestión

Realice un ensayo de control de la digestión usando el método operativo descrito anteriormente, reemplazando la porción de ensayo por la misma cantidad de triptófano o acetanilida o hidrocloreuro de lisina (3.10) como la cantidad de nitrógeno en las muestras y adicione la cantidad apropiada de sacarosa (3.11).

Calcule el porcentaje de la fracción de masa del nitrógeno recuperada, que deberá estar entre 98 % y 101 %.

5.5.4 Ensayos de la destilación

Realice un ensayo en blanco de la destilación-valoración usando el método operativo descrito en 5.3, pero sin una porción de ensayo.

El volumen que se obtenga debe sustraerse de aquel del ensayo de destilación-valoración.

Realice un ensayo de destilación-valoración bajo las mismas condiciones con una porción de ensayo de la sal de amonio (3.9) que corresponda a la cantidad de nitrógeno en las muestras.

Calcule el porcentaje de la fracción de masa del nitrógeno recuperada, que deberá estar entre 98 % y 101 %.

6 Expresión de los resultados

El contenido de nitrógeno, expresado como un porcentaje de la fracción de masa o en gramos por 100 mL, es igual a:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c_t \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

ó

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c_t \times 14 \times 100}{V_t \times 1000}$$

donde

m es la masa, en gramos, de la porción de ensayo;

c_t es el título, en moles por litro, del ácido clorhídrico o del sulfúrico;

V_0 es el volumen, en mililitros, del ácido clorhídrico o del sulfúrico usado en la valoración del ensayo en blanco;

V_1 es el volumen, en mililitros, del ácido clorhídrico o del sulfúrico usado en la valoración de la porción de ensayo;

V_t es el volumen, en mililitros, de la porción de ensayo.

Anexo A
(informativo)

Fuentes potenciales de error

Fallos observados	Causas	Soluciones propuestas
1. Durante la digestión		
Demasiadas salpicaduras o espuma	Demasiado rápida la elevación de la temperatura Muestras de ensayo grasas o azucaradas Un volumen demasiado grande de muestras líquidas	Reducir la velocidad del calentamiento o ajustar los pasos Usar un agente antiespumante Usar una porción de ensayo más pequeña
Partículas negras en la digesta	Inapropiada relación tiempo /temperatura de la digestión	Optimizar las condiciones: chequear la digestión (5.5.3) chequear las proporciones muestra/ácido/catalizador
Cristalización en pelotitas	Pérdida de ácido debida a un sistema de extracción de gases muy poderoso	Reduzca la velocidad de extracción: esta puede reducirse tan pronto desaparezcan los humos blancos Chequear las proporciones muestra/ácido/catalizador
2. Durante la destilación y determinación del contenido de nitrógeno		
Resultado del ensayo de destilación-valoración demasiado bajo	Pérdida de amoníaco Insuficiente ácido bórico Incompleto arrastre del amoníaco Medición incorrecta del título del ácido El ensayo en blanco de la destilación-valoración resultó demasiado alto	Chequear que las uniones entre las partes de los aparatos estén bien ajustadas (sellos e instrumentos de vidrio) Incrementar el volumen o la concentración de la disolución de ácido bórico Incrementar el tiempo de destilación Valorar el ácido Realizar un nuevo ensayo en blanco

<p>Resultado del ensayo de destilación-valoración demasiado alto</p>	<p>Medición incorrecta del título del ácido Contaminación debida a vapor de amoniaco Arrastre de hidróxido de sodio en el destilado</p>	<p>Valorar el ácido Evitar manipular amoniaco en los alrededores Reduzca el volumen de agua adicionado antes de la destilación</p>
<p>Resultado del ensayo de la digestión demasiado bajo</p>	<p>Inapropiada relación tiempo /temperatura de la digestión</p>	<p>Optimizar las condiciones: chequear la digestión (5.5.3) chequear las proporciones muestra/ácido/catalizador</p>

Bibliografía

[1] ISO 5983-1:2005, Animal feeding stuffs — Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content — Part 1: Kjeldahl method

[2] ISO 8968-1:2001, Milk — Determination of nitrogen content — Part 1: Kjeldahl method

[3] ISO 20483:2006, Cereals and pulses — Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content — Kjeldahl method.