



Quito – Ecuador

**NORMA  
TÉCNICA  
ECUATORIANA**

**NTE INEN 16**

Segunda revisión  
2015-01

**LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE  
CONTENIDO DE NITRÓGENO. MÉTODO KJELDAHL**

MILK AND MILK PRODUCTS. DETERMINATION OF NITROGEN BY KJELDAHL METHOD

<p><b>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</b></p>	<p><b>LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE NITRÓGENO MÉTODO KJELDAHL</b></p>	<p><b>NTE INEN 16:2015 Segunda revisión 2015-01</b></p>
--	---	---

## 1. OBJETO

1.1 Esta norma describe el método para determinar el contenido de nitrógeno en la leche.

## 2. ALCANCE

2.1 Esta norma se aplica a la leche cruda, pasteurizada y en polvo, ya sea entera, semidescremada o descremada y otros productos lácteos como se muestra en el Anexo A.

## 3. DEFINICIONES

3.1 Para efectos de esta norma, se adoptan las definiciones contempladas en la NTE INEN 3 y la que a continuación se detalla:

3.1.1 *Contenido de nitrógeno.* Fracción de masa de nitrógeno (ver nota 1) determinada por el procedimiento establecido en esta norma.

## 4. PRINCIPIO

4.1 Una porción de ensayo se lleva a digestión con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y sulfato de potasio, usando sulfato de cobre (II) como catalizador para que de este modo se convierta el nitrógeno orgánico presente en sulfato de amonio. La función del sulfato de potasio es elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y proporcionar una mezcla oxidante más fuerte para la digestión. A la muestra fría luego de la digestión, se añade hidróxido de sodio en exceso para liberar amoníaco. El amoníaco liberado es destilado en un exceso de solución de ácido bórico para luego ser titulado con ácido clorhídrico. El contenido de nitrógeno se calcula a partir de la cantidad de amoníaco producido.

## 5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Equipos y materiales usuales de laboratorio, en particular, los siguientes:

5.1.1 *Baño de agua*, capaz de mantenerse a  $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

5.1.2 *Matraces Kjeldahl*, de 500 mL y 800 mL de capacidad.

5.1.3 *Balanza analítica*, capaz de pesar con una aproximación de 0,1 mg.

5.1.4 *Núcleos de ebullición*, por ejemplo esferas de vidrio (ver nota 2), material poroso, granallas de zinc, piezas duras de porcelana, gránulos de óxido de aluminio fundido, anfótero de alta pureza, tamaño normal de malla 10.

NOTA 1. El contenido de nitrógeno se expresa como porcentaje en masa.

NOTA 2. Las esferas de vidrio de aproximadamente 5 mm de diámetro son utilizadas a veces, pero estas no promueven la eficiencia de la ebullición como los gránulos de óxido de aluminio y pueden causar problemas de formación de espuma durante la digestión. No se deben reutilizar.

**5.1.5 Bureta o pipeta automática**, capaz de suministrar 1,0 mL de la solución de sulfato de cobre (ver 6.1.2).

**5.1.6 Probetas graduadas**, de 50 mL, 100 mL y 500 mL de capacidad.

**5.1.7 Aparato de digestión** (ver nota 3), para sostener los matraces Kjeldahl (ver 5.1.2) en una posición inclinada (aproximadamente 45°), con calentadores eléctricos o quemadores a gas que no calienten los matraces por encima del nivel de su contenido, y con un sistema de extracción de vapor.

**5.1.7.1** La fuente de calor debe ser ajustable para controlar la configuración máxima del calentador que se utilizará durante la digestión. Precalear la fuente de calor hasta establecer la temperatura de evaluación. En el caso de los calentadores a gas, el período de precalentado será de 10 min y para calentadores eléctricos debe ser de 30 min. Para cada uno de los calentadores, determinar el punto de ajuste del calentador, que permita llevar 250 mL de agua incluyendo de 5 a 10 núcleos de ebullición a una temperatura inicial de 25 °C entre 5 min a 6 min hasta su punto de ebullición. Este es el ajuste máximo del calentador que se debe utilizar durante la digestión.

**5.1.8 Aparato de destilación**, hecho de vidrio de borosilicato u otro material adecuado para que pueda acoplarse a un matraz Kjeldahl (ver 5.1.2) que conste de una cabeza difusora eficiente conectada a un condensador eficaz de tubo interior recto y un tubo de salida conectado a su extremo inferior.

**5.1.8.1** Los tubos de conexión y el (los) tapón(es) deben ser ajustados y preferiblemente deben ser de neopreno.

**5.1.9 Matraces cónicos**, de 500 mL de capacidad, graduados cada 200 mL.

**5.1.10 Bureta** (ver nota 4), de 50 mL de capacidad, graduado por lo menos cada 0,01 mL, cumpliendo con los requisitos.

**5.1.10.1** Por otra parte se puede utilizar una bureta automática, si se cumplen con los mismos requisitos.

**5.1.11 Titulador automático provisto de un pH-metro**. El pH-metro debe ser correctamente calibrado en un rango de pH de 4 a 7, siguiendo los procedimientos de calibración normalmente utilizados en un laboratorio.

## 6. REACTIVOS Y MATERIALES

**6.1** Utilizar únicamente reactivos de grado analíticamente reconocido, a menos que se especifique lo contrario, agua destilada, desmineralizada o de pureza equivalente.

**6.2 Sulfato de potasio** ( $K_2SO_4$ ), libre de nitrógeno.

**6.3 Solución de sulfato de cobre (II)**,  $c$  ( $CuSO_4$ ), 5,0 g por 100 mL. Disolver 5,0 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) en agua, en un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir hasta la marca y mezclar.

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

**6.5 Solución de hidróxido de sodio** ( $NaOH$ ), libre de nitrógeno, que contiene 50 g de hidróxido de sodio por 100 g de solución.

NOTA 3. Alternativamente podrán utilizarse otros aparatos de digestión mientras el principio de funcionamiento sea el mismo descrito en este numeral.

NOTA 4. ISO 385-1, class A. Laboratory glassware – Burettes – Part 1: General requirements.

**6.6 Solución indicadora.** Disolver 0,1 g de rojo de metilo en etanol al 95% (fracción en volumen) en 50 mL de etanol. Disolver 0,5 g de verde de bromocresol en etanol al 95% (fracción en volumen) en 250 mL de etanol. Mezclar una parte de la solución de rojo de metilo con cinco partes de la solución verde de bromocresol o combinar y mezclar ambas soluciones.

**6.7 Solución de ácido bórico,  $c$  ( $H_3BO_3$ ), 40,0 g / L.** Disolver 40,0 g de ácido bórico en 1 litro de agua caliente, dejar enfriar a 20°C y aforar en un matraz volumétrico a 1000 mL, añadir 3 mL de solución indicadora (ver 6.6) y mezclar. Almacenar la solución, hasta que esté presente un ligero color naranja, en una botella de vidrio de borosilicato. Proteger la solución de la luz y fuentes de vapor de amoníaco durante el almacenamiento.

**6.7.1** Si se utiliza el pH-metro electrónico para el punto final de la titulación, la adición de la solución indicadora a la solución de ácido bórico puede ser omitida. Por otro lado, el cambio de color también se puede utilizar como una verificación de los procedimientos adecuados de titulación.

**6.8 El ácido clorhídrico solución estándar (ve nota 5)  $c$  (HCl),  $(0,1 \pm 0,0005)$  mol / L.** Para preparar 1 litro de solución de HCl 0,1 M, tomar 8,60 mL de HCl de pureza 36,5% a 38% y aforar a 1 litro con agua libre de  $CO_2$ .

**6.8.1** Se recomienda que el material pueda ser comprado previamente estandarizado por el fabricante para que cumplan las especificaciones anteriores.

**6.9 Sulfato de amonio  $[(NH_4)_2SO_4]$ .** Ensayo de pureza mínimo del 99,9% (fracción de masa) en material seco.

**6.9.1** Inmediatamente antes de su uso, secar el sulfato de amonio a 102 °C  $\pm$  2 °C durante no menos de 2 h. Enfriar a temperatura ambiente en un desecador.

**6.10 El triptófano ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) o clorhidrato de lisina ( $C_6H_{15}ClN_2O_2$ ).** Ensayo de pureza mínimo 99% (fracción de masa).

**6.10.1** No secar estos reactivos en una estufa antes de su uso.

**6.11 Sacarosa,** con un contenido de nitrógeno de no más de 0,002% (fracción de masa).

**6.11.1** No secar la sacarosa en una estufa antes de su uso.

## 7. MUESTREO

**7.1** El muestreo debe realizarse de acuerdo con la NTE INEN 4.

**7.2** Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea realmente representativa y no haya sido dañada o cambiada durante el transporte o almacenamiento.

## 8. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

**8.1** Calentar la muestra para el ensayo a 38°C en baño de agua (ver 5.1.1). Mezclar suavemente la muestra en varias ocasiones, invirtiendo el frasco sin provocar formación de espuma por el batido. Enfriar la muestra a temperatura ambiente inmediatamente antes de pesar la porción de ensayo (ver 9.1) (ver nota 6).

NOTA 5. A menudo, los errores sistemáticos (que pueden evitarse) introducidos por un analista al diluir un ácido concentrado y luego determinar la molaridad del ácido, puede reducir la reproducibilidad del método. El analista no debe usar una solución para titulación que tenga una concentración superior a 0,1 mol/L, ya que esto podría reducir el volumen total por titulación de la muestra y la incertidumbre en la legibilidad de la bureta que podría convertirse en un porcentaje mayor del valor. Esto tendrá un impacto negativo sobre la repetibilidad y reproducibilidad del método. Las mismas situaciones y otras fuentes de error se presentan cuando otro ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) se sustituye por ácido clorhídrico. Así, estas sustituciones no son recomendables.

NOTA 6. Se aconseja este tamaño de la muestra para la aplicación de este método para productos lácteos diferentes, ver el Anexo A.

## 9. PROCEDIMIENTO

**9.1 Porción de ensayo y tratamiento previo.** En un matraz Kjeldahl limpio y seco (ver 5.1.2), añadir 5 a 10 núcleos de ebullición (ver 5.1.4), 15,0 g de sulfato de potasio (ver 6.2), 1,0 mL de solución de sulfato de cobre (II) (ver 6.3), y aproximadamente 5 mL  $\pm$  0,1 mL de la muestra preparada (ver capítulo 8), pesar con una aproximación de 0,1 mg y 25 mL de ácido sulfúrico (ver 6.4). Usar el ácido sulfúrico para lavar cualquier solución de sulfato de cobre (II), sulfato de potasio o porción remanente en el cuello del matraz. Si algún residuo carbonizado aún queda en el cuello, enjuagar con una pequeña cantidad de agua. Mezclar suavemente el contenido del matraz Kjeldahl.

### 9.2 Determinación

**9.2.1 Digestión.** Encender el sistema de extracción de vapor del aparato de digestión (ver 5.1.7) antes de comenzar. Calentar el matraz Kjeldahl y su contenido (ver 9.1) en el equipo de digestión, estableciendo la temperatura lo suficientemente baja de tal manera que la espuma no suba hasta el cuello del matraz Kjeldahl. Digerir con este ajuste del calentador hasta que aparezca vapor blanco en el matraz después de aproximadamente 20 min. Aumentar la temperatura del calentador a la mitad del ajuste máximo determinado en el numeral 5.1.7.1 y continuar su calentamiento durante 15 min. Al final del período de 15 min, aumentar el calor a la posición máxima determinada en el numeral 5.1.7.1. Después de la digestión se presenta un color (azul – verde claro), continuar la ebullición durante 1 hora a 1,5 horas al ajuste máximo. Si el líquido no hierve, puede ser que el ajuste del quemador este demasiado bajo. El tiempo total de digestión debe ser entre 1,8 h y 2,25 h.

**9.2.1.1** Para determinar el tiempo específico necesario de ebullición para las condiciones de análisis en un laboratorio que utiliza un conjunto particular de aparatos, seleccionar una muestra de leche de alto contenido de proteínas y grasa para determinar su contenido de proteínas usando diferentes tiempos de ebullición (1 hora a 1,5 horas) después de la clarificación. El resultado medio de proteína se incrementa al aumentar el tiempo de ebullición, se vuelve constante y luego disminuye cuando el tiempo de ebullición es demasiado largo. Seleccionar el tiempo de ebullición que produce el resultado máximo de proteína.

**9.2.1.2** Al final de la digestión, esta debe ser clara y libre de material no digerido. Se debe permitir que la muestra digerida se enfríe a temperatura ambiente en un matraz descubierto y separado de la fuente de calor durante un período de aproximadamente de 25 min. Si el matraz se deja sobre los quemadores calientes para enfriar, se necesitará más tiempo para llegar a la temperatura ambiente. La muestra después de la digestión, enfriada debe ser líquida o líquida con pocos cristales pequeños en la parte inferior del matraz al final del período de 25 min. de enfriamiento. Después de la digestión no dejar la muestra sin diluir en los matraces durante toda la noche. La muestra, después de la digestión no diluida, puede cristalizarse durante este período y será muy difícil conseguir que se diluya de nuevo en solución (ver nota 7).

**9.2.1.3** Añadir 300 mL de agua en los matraces Kjeldahl de 500 mL o 400 mL de agua cuando se utilizan matraces Kjeldahl de 800 mL. Utilizar también agua para lavar el cuello del matraz. Mezclar bien el contenido para asegurarse que los cristales se separen y disuelvan. Añadir 5 a 10 núcleos de ebullición (ver 5.1.4). Dejar que la mezcla se enfríe de nuevo a temperatura ambiente antes de la destilación. Las muestras después de la digestión se pueden tapar y mantener para la destilación para un momento posterior.

---

NOTA 7. La cristalización excesiva después de 25 min es el resultado de la pérdida de ácido indebida durante la digestión y puede resultar valores bajos en la prueba. La excesiva pérdida de ácido es causada por la aspiración excesiva de vapor o por un tiempo prolongado de la digestión causada por un ajuste máximo incorrecto del quemador.

**9.2.2 Destilación.** Abrir el suministro de agua al condensador del aparato de destilación (ver 5.1.8). Añadir 75 mL de solución de hidróxido de sodio (ver 6.5) a la muestra diluida de la digestión (ver 9.2.1) verter cuidadosamente la solución por el cuello inclinado del matraz Kjeldahl para formar una capa en la parte inferior del bulbo del matraz. Debe haber una interfaz limpia entre las dos soluciones. Para reducir la posibilidad de pérdida de amoniaco, inmediatamente después de la adición de la solución de hidróxido de sodio al matraz Kjeldahl, conectar rápidamente al aparato de destilación (ver 5.1.8). La punta del tubo de salida del condensador sumergir en 50 mL de la solución de ácido bórico (ver 6.1.6) contenida en un matraz cónico (ver 5.1.9). Agitar vigorosamente el matraz de Kjeldahl para mezclar su contenido completamente hasta que no sean visibles capas separadas de solución en el matraz. Poner el matraz sobre el calentador. Encender el quemador a un ajuste lo suficientemente alto como para hervir la mezcla. Continuar la destilación hasta que comience la ebullición irregular, a continuación desconecte inmediatamente el matraz de Kjeldahl y apague la hornilla. Apagar el condensador de agua. Enjuagar el interior y exterior de la punta del tubo de salida de agua y recoger el lavado en un matraz cónico y mezclar.

**9.2.2.1** La tasa de destilación debe ser de tal manera, que se reúna aproximadamente 150 mL de destilado antes que la ebullición irregular inicie. El volumen total de contenido en el matraz cónico será de aproximadamente 200 mL. Si el volumen de destilado recogido es inferior a 150 mL, entonces es probable que se haya añadido menos de 300 mL de agua para diluir la muestra después de la digestión. La eficiencia del condensador debe ser tal, que la temperatura del contenido del matraz cónico no sea superior a los 35 °C durante la destilación cuando se utiliza un punto final colorimétrico.

**9.2.3 Titulación** (ver notas 8 y 9). Titular el contenido del matraz cónico (ver 9.2.2) con el ácido clorhídrico (ver 6.8) utilizando una bureta (ver 5.1.5). El objetivo es alcanzar la primera traza de color rosa en el contenido. Estimar la lectura de la bureta que debe tener una aproximación a 0,05 mL. Una placa iluminada y un agitador magnético pueden ayudar a visualizar el punto final.

**9.2.3.1** Alternativamente, titular el contenido del matraz (ver 9.2.2) con el ácido clorhídrico (ver 6.8) utilizando un titulador adecuadamente calibrado provisto de un medidor de pH (ver 5.1.11). El punto final de pH de la titulación se alcanza a pH 4,6, al conseguir el punto final de la curva de titulación (punto de inflexión). Leer en el valorador automático la cantidad del titulante utilizada.

**9.3 Ensayo en blanco.** Siempre se titula los blancos con el mismo ácido clorhídrico (ver 6.8) y bureta (ver 5.1.5) o un titulador automático provisto de un pH-metro (ver 5.1.11) como el que se utiliza en las etapas del ensayo. Llevar a cabo un ensayo en blanco siguiendo el procedimiento descrito en los numerales 9.1 hasta el numeral 9.2.3. Sustituir la porción de ensayo con 5 mL de agua y aproximadamente 0,85 g de sacarosa (ver nota 10) (ver 6.11).

**9.3.1** Mantener un registro de los valores en blanco. Si los valores de los blancos cambian, identificar la causa.

NOTA 8. La primera traza de color rosa se observa entre pH 4,6 y 4,3 para el sistema indicador y 4% de solución de ácido bórico que se especifica en este método. En la práctica la tasa de cambio de pH en función de la adición de 0,1 mol/L de HCl es muy rápida dentro de rango de pH. Esta toma 0,05 mL de 0,1 mol/L de HCl para cambiar el pH en 0,3 unidades en el rango de pH de 4,6 a 4,3 en este sistema.

NOTA 9. Estadísticas de rendimiento dentro y entre laboratorios de este método fueron determinadas usando un punto final de color en la titulación. Comparando los resultados de las pruebas finales, incluyendo sus pruebas en blanco, obtenidas con un punto final de pH a 4,6 con el punto final colorimétrico por titulación, se mostró satisfactoriamente y estadísticamente que no hubo diferencia significativa entre ellos.

NOTA 10. El propósito de la sacarosa en un blanco o un estándar de recuperación es la de actuar como 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 residual libre al final de la digestión es demasiado baja, la recuperación de nitrógeno por ambas pruebas de recuperación en el 9.4.2 y 9.4.3 será baja. Sin embargo, si la cantidad de ácido residual presente al final de la digestión es suficiente para retener todo el nitrógeno, pero las condiciones de temperatura y el tiempo durante digestión no fueron 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.

**9.3.2** La cantidad del titulante utilizada en el blanco debe ser siempre mayor que cero. Los blancos dentro del mismo laboratorio deben ser consistentes a través del tiempo. Los valores típicos en blanco son iguales o inferiores a 0,2 mL (ver nota 11).

#### **9.4 Pruebas de recuperación**

**9.4.1** La precisión del procedimiento debería ser revisada periódicamente por medio de las pruebas de recuperación siguientes, llevadas a cabo de conformidad con el numeral 9.1 a 9.2.3.

**9.4.2** Compruebe que no haya pérdida de nitrógeno mediante el uso de una porción de muestra de 0,12 g de sulfato de amonio (ver 6.9), junto con 0,85 g de sacarosa (ver 6.11) (ver nota 12).

**9.4.2.1** El porcentaje de nitrógeno recuperado será entre 99,0% y 100,0% para todas las posiciones en el aparato. Para recuperaciones de menos de 99%, la concentración del titulante es mayor que el valor declarado, o la pérdida de nitrógeno pudo haberse producido en la digestión o destilación. Es posible utilizar una mezcla de sulfato de amonio y una pequeña cantidad de ácido sulfúrico (la cantidad de residuo que queda al final de una digestión) en un matraz Kjeldahl. Diluir en un volumen normal de agua, añadir la cantidad normal de hidróxido de sodio y destilar. Si la recuperación de nitrógeno es todavía baja con la misma cantidad, la pérdida de nitrógeno está en el aparato de destilación y no en el de la digestión. La probable causa podría ser un tubo con fuga en un sistema tradicional o las puntas de los condensadores no fueron sumergidos bajo la superficie del ácido bórico al inicio de la destilación. El aparato debe pasar estas pruebas antes verificar las recuperaciones descritas por el procedimiento en numeral 9.4.3.

**9.4.2.2** En el caso de que la recuperación de nitrógeno sea superior al 100%, y no se observe pérdida de nitrógeno, las posibles causas podrían ser las siguientes:

- a) el sulfato de amonio está contaminado;
- b) la concentración real del titulante es inferior a su valor declarado;
- c) la calibración de la bureta para la titulación está mal;
- d) la temperatura del titulante está por encima de la temperatura de calibración de la bureta; o
- e) el flujo de salida del titulante de la bureta excede la velocidad máxima a la que la calibración de la bureta es válida.

**9.4.3** Verificar la eficiencia del procedimiento de la digestión utilizando 0,16 g de clorhidrato de lisina o 0,18 g de triptófano (ver 6.10) junto con 0,67 g de sacarosa (ver 6.11).

**9.4.3.1** Por lo menos una fracción de masa de 98% de nitrógeno debe ser recuperada. Si la recuperación es inferior a 98%, después de haber recuperado una fracción de masa del 99% al 100% en sulfato de amonio, entonces el tiempo o la temperatura de digestión es insuficiente (siga el procedimiento del numeral 9.2.1 y nota 7) o hay una muestra de material que no está digerida (es decir, muestra carbonizada) en el interior del matraz Kjeldahl. La evaluación final del desempeño se hace mejor por la participación en un programa de ensayos de aptitud dentro y entre laboratorios, los parámetros estadísticos se calculan con base en el análisis de muestras de ensayo de leche.

**9.4.4** Resultados más bajos en cualquiera de las pruebas de recuperación (o superior a 100,0% en el numeral 9.4.2) indican fallas en el procedimiento o una incorrecta concentración de la solución de ácido clorhídrico (ver 6.8).

---

NOTA 11. Si el blanco ya es color rosa antes del comienzo de la titulación, algo está mal. Por lo general, en estos casos, los matraces cónicos no están limpios o el agua proveniente del vapor puede condensarse en el exterior del aparato condensador y gotear en el matraz de recogida causando contaminación.

NOTA 12. La verificación de la recuperación de sulfato de amonio no da información sobre la capacidad de las condiciones de la digestión de liberar nitrógeno, que está enlazado en las estructuras de proteínas.

## 10. CÁLCULOS

### 10.1 Cálculo del contenido de nitrógeno

10.1.1 Calcular el contenido en nitrógeno de la muestra,  $w_N$ , utilizando la siguiente ecuación:

$$w_N = \frac{1,4007(V_S - V_b)M_r}{m} \quad (1)$$

donde:

- $w_N$  es el contenido de nitrógeno de la muestra, expresado como porcentaje en masa;
- $V_S$  es el valor numérico del volumen, en mililitros, del ácido clorhídrico (ver 6.8) utilizado en la determinación (9.2.3), expresado por lo menos con una aproximación de 0,05 mL;
- $V_b$  es el valor numérico del volumen, en mililitros, del ácido clorhídrico (ver 6.8) utilizado en el ensayo en blanco (ver 9.3), expresado por lo menos con una aproximación de 0,05 mL;
- $M_r$  es el valor numérico de la molaridad exacta del ácido clorhídrico (ver 6.8), expresado con cuatro decimales
- $m$  es el valor numérico, en gramos, de la porción de la masa de ensayo (ver 9.1), expresado con una aproximación de 0,1 mg.

10.1.2 Expresar los resultados obtenidos con cuatro decimales, si es necesario para los cálculos posteriores. En el caso de resultados finales, expresar el contenido de nitrógeno con tres decimales y para el contenido de proteína con dos decimales. Los resultados obtenidos no se deben redondear aún más hasta que el uso final del valor del ensayo sea hecho (ver nota 13).

### 10.2 Cálculo del contenido de proteína cruda

10.2.1 Calcular el contenido en proteína cruda de la muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$w_p = w_N * 6,38 \quad (2)$$

donde

- $w_p$  es la 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 con cuatro decimales (ver 10.1);
- 6,38 es el factor de multiplicación generalmente aceptado para expresar el contenido de nitrógeno como contenido de proteína cruda. También llamada factor de conversión utilizado para los productos lácteos.

10.2.2 Expresar los resultados obtenidos para el contenido de proteína cruda con tres decimales, si es necesario para cálculos posteriores. En el caso de ser resultados finales (ver 9.1), éstos se expresan con dos decimales.

NOTA 13. Esto es particularmente cierto para los valores que se van a utilizar en cálculos posteriores. Un ejemplo se presenta cuando los valores de ensayos individuales obtenidos del análisis de muchos materiales de muestra son usados para el cálculo estadístico de desempeño del método para la variación dentro y entre laboratorios. Otro ejemplo, se presenta cuando los valores se utilizan como una referencia para la calibración del instrumento (por ejemplo, analizador infrarrojo de leche) donde los valores de muchas muestras se utilizan en un cálculo de regresión simple o múltiple. En tal caso, los resultados obtenidos no deben ser redondeados antes de que se utilicen para los cálculos posteriores.



## 11. PRECISIÓN

**11.1 Ensayos entre laboratorios.** Los valores de los límites de repetibilidad y reproducibilidad se deriva del resultado de un estudio entre laboratorios llevado a cabo de acuerdo con ISO 5725 (ver nota 14). Los detalles de la prueba entre laboratorios del método se resumen en las referencias en el pie de página (ver nota 15). Los valores derivados de esta prueba no pueden ser aplicables a rangos de concentración y matrices diferentes a las indicadas.

**11.2 Repetibilidad.** La diferencia absoluta entre dos resultados de pruebas independientes e individuales, obtenidas utilizando el mismo método, con idénticos materiales de prueba en el mismo laboratorio por el mismo operador con el mismo equipo dentro de un intervalo corto de tiempo, no será más de 5% de los casos mayores que 0,006% de contenido de nitrógeno (0,038% de contenido de proteína cruda).

**11.3 Reproducibilidad.** La diferencia absoluta entre dos resultados individuales, obtenidos utilizando el mismo método, con idéntico material de prueba en laboratorios diferentes, con distintos operadores y utilizando equipos diferentes, no será más de 5% de los casos mayores que 0,007 7% de contenido de nitrógeno (0,049% de contenido de proteína cruda).

## 12. INFORME DE RESULTADOS

**12.1** El informe del ensayo debe especificar:

**12.1.1** Toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra;

**12.1.2** El método de muestreo utilizado, si se conoce;

**12.1.3** El método de ensayo utilizado;

**12.1.4** Todos los detalles operativos no especificados en esta norma o considerados como opcionales, junto con los detalles de cualquier incidente que pueda haber influido en el (los) resultado(s);

**12.1.5** El resultado de la (las) prueba(s) obtenido;

**12.1.6** Si la repetibilidad se ha comprobado, citar el resultado final obtenido;

**12.1.7** Si la recuperación se ha comprobado, citar el resultado final obtenido.

---

NOTA 14. ISO 5725:1986 (la totalidad de sus partes) se utilizó para obtener los datos de precisión.

NOTA 15. BARBANO, D.M. CLARK, J.L., DUNHAM, C.E. and FLEMING, J.R. Kjeldahl methods for determination of total nitrogen content. Of milk: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 1990, pp 849-859.

LYNCH, J.M., BARBANO, D.M. and FLEMING, J.R. Performance evaluation of direct forced-air total solids and Kjeldahl total nitrogen methods: 1990 through 1995. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 80, 1997, pp, 1038-1043.

## ANEXO A

### PROCEDIMIENTO MODIFICADO PARA EL ANÁLISIS DE OTROS PRODUCTOS LÁCTEOS CUANDO NO EXISTE UNA NORMA SEPARADA PARA ESTOS PRODUCTOS

#### A.1 General

**A.1.1** El procedimiento descrito en esta norma ha sido optimizado y su rendimiento evaluado para el análisis de la leche bovina. Si una norma separada no existe, un laboratorio puede utilizar el mismo procedimiento, con una ligera modificación, para la determinación del contenido de nitrógeno de una gama de productos lácteos. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que el procedimiento y los resultados para los mismos no se han validado para los usos indicados.

#### A.2 Procedimiento

**A.2.1** Pesar con precisión de 0,1 mg la masa necesaria de la porción de muestra, tomada de una muestra debidamente preparada, como se describe a continuación. Procedimiento de la determinación del contenido de nitrógeno utilizando el método descrito en el numeral 9.1 al 9.4.

**A.2.2** Las cantidades de ácido sulfúrico (ver 6.4) y la solución de hidróxido de sodio (ver 6.5) utilizadas en la digestión y el proceso de destilación no deben ser cambiadas. Cambios en la relación de ácido, a otros componentes mediante el incremento de la cantidad de ácido, disminuye al punto de ebullición inicial de la mezcla en la digestión y esto no es recomendable.

**A.2.3** Un tamaño adecuado de la porción de prueba se debe utilizar cuando se trabaja con los reactivos como se especifica en esta norma. La porción de ensayo apropiada para cualquier muestra de ensayo puede ser estimada como se indica a continuación: La cantidad óptima de proteína por matraz Kjeldahl (ver numeral 5.1.2) deberá estar comprendida entre 0,15 g y 0,30 g por matraz para cualquier muestra de ensayo. Así, si una muestra de ensayo promedio del queso Cheddar, que contiene 24,00% de proteína, la porción de masa de la muestra debe estar entre 0,625 g y 1,25 g. La decisión de utilizar masas que se promedien en el extremo inferior del rango o en el extremo superior del rango, depende de la cantidad de ácido del resto de los componentes de la muestra (es decir, la grasa e hidratos de carbono) que se consumen durante la digestión.

**A.2.4** El método describe una adición de 25 mL (aprox. 46 g) de ácido sulfúrico a la porción de muestra en el matraz Kjeldahl. Para el final de la digestión, aproximadamente 15 g de ácido sulfúrico tiene que ser dejado en el matraz para retener todo el nitrógeno.

**A.2.5** Cabe señalar que el ácido sulfúrico es consumido por la porción de ensayo y también se pierde debido a la volatilización durante la digestión. La pérdida por volatilización puede ser igual a la cantidad consumida por la materia orgánica en una porción de ensayo. La cantidad final de ácido residual será una función de ambos procesos. La pérdida excesiva de ácido por volatilización (causada por la aspiración excesiva de gases durante la digestión o los cuellos de los matraces que son demasiado calientes) puede resultar también un poco de ácido residual que queda al final de la digestión, aunque el tamaño de la porción de prueba sea correcto.

**A.2.6** Poco ácido residual se traducirá en la cristalización de la digestión después de 25 min de enfriamiento y recuperación mínima de nitrógeno.

**A.2.7** La crema que contiene 40% de grasa es un ejemplo de un producto difícil. En este caso, el contenido de proteína o de nitrógeno de la muestra es bajo y el contenido de grasa es alto. Suponga que una muestra de crema contiene en promedio alrededor del 40% de grasa, proteína 1,9% y el 2,9% de lactosa. Para conseguir 0,15 g de proteína en el matraz Kjeldahl (ver 5.1.2), utilizar una porción de muestra de 7,89 g. Esta porción de ensayo podría contener 3,16 g de grasa, que por sí mismo consumiría 56,9 g (30,9 mL) de ácido sulfúrico en la digestión sin permitir cualquier pérdida de ácido sulfúrico debido a la volatilización (basado en la suposición de que 1 g de grasa consume 18 g de ácido sulfúrico durante la digestión). Este es un ejemplo donde la cantidad de porción de ensayo debe ser reducida para permitir una cantidad adecuada de ácido sulfúrico que permanezca al final de la digestión. En el caso de las muestras de prueba como crema, la titulación debe ser utilizada con la concentración más baja (0,01 mol/L). En estos casos, la cantidad de la porción de ensayo necesita

ser reducida para permitir una cantidad adecuada de ácido sulfúrico para que permanezca al final de la digestión.

**A.2.8** La cantidad de sacarosa necesaria para un blanco o normas de recuperación de otros productos de la leche bovina puede ser determinada como sigue:

**A.2.8.1** En primer lugar, se requiere una estimación del contenido aproximado de grasa, proteína e hidratos de carbono para el tipo de material de la muestra de ensayo y la porción de la masa de ensayo aproximada para ser utilizada en la digestión.

**A.2.8.2** En segundo lugar, durante la digestión 1 g de grasa consumirá aproximadamente 18 g de ácido sulfúrico, 1 g de proteína consumirá alrededor de 9 g de ácido sulfúrico y 1 g de carbohidratos consumirá aproximadamente 7 g de ácido sulfúrico.

**A.2.9** Basándose en la información anterior, la cantidad de ácido consumido por una porción de ensayo y el de la sacarosa necesaria para consumir la misma cantidad de ácido durante la digestión puede ser calculada. La cantidad calculada de sacarosa debe ser usada en el blanco y en el nivel de recuperación de sulfato de amonio.

**A.2.10** Para el estándar de recuperación de nitrógeno de los aminoácidos (ver 8.4.3), reducir la cantidad de sacarosa por la cantidad de ácido a ser consumido (calculado como proteína) por el clorhidrato de lisina o el triptófano. Se supone que la recuperación de nitrógeno de la digestión para el aparato utilizado, es el mismo para las muestras de ensayo distintas de la leche, sin llevar a cabo experimentos de recuperación para producir condiciones que logren niveles similares de ácido sulfúrico residual al final de la digestión.

**A.2.11** Para los productos lácteos deshidratados como la leche en polvo se procederá de acuerdo a las directrices descritas en este anexo.

## APÉNDICE Z

### Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 3 *Leche y productos lácteos. Definiciones.*

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4 *Leche y productos lácteos. Muestreo.*

Norma ISO 5725 *Accuracy (trueness and precision) o measurement methods and results (todas las partes).*

### Z.2 BASES DE ESTUDIO

ISO 8968-1: 2001, *Milk — Determination of nitrogen content — Part 1: Kjeldahl method.*

AOAC Official Method 991.20:2006 *Nitrogen (Total) in Milk. Kjeldahl Methods.*

AOAC Official Method 936.15:2005 *Standard Solution of Hydrochloric Acid.*

NTC 5025, 2001-12-19. *Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de nitrógeno.*

## INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

**Documento:** TÍTULO: LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DEL **Código ICS:**  
**NTE INEN 16** **CONTENIDO DE NITRÓGENO. MÉTODO DE KJELDAHL** **67.100.10**  
**Segunda revisión**

<b>ORIGINAL:</b> Fecha de iniciación del estudio:	<b>REVISIÓN:</b> Fecha de aprobación del Consejo Directivo 1983-06-14 Oficialización con el Carácter de Obligatoria por Acuerdo Ministerial No. 271 del 1984-04-18 publicado en el Registro Oficial No. 748 del 1984-05-21  Fecha de iniciación del estudio: 2012-04-23
--	---

Fechas de consulta pública: 2012-05-03 a 2012-05-18

**Subcomité Técnico: LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS**

Fecha de iniciación: 2012-06-13

Fecha de aprobación: 2012-06-20

Integrantes del Comité Técnico:

**NOMBRES:**

**INSTITUCIÓN REPRESENTADA:**

Dra. Ana María Hidalgo (Presidenta)  
Ing. Edwin Vera Calle  
Ing. Jaime Campaña  
Dr. Raúl Naranjo  
Bioquím. Elena Larrea  
Quím. Alimentos Paola Cuji  
Ing. Angélica Tutasi  
Ing. Lorena Tapia  
Ing. Juan Morales  
Gabriela Salazar  
Ing. María José Andrade  
Ing. Gisela Medina (Secretaría Técnica)

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL  
CAPEIPI  
DEFENSORÍA DEL PUEBLO  
INEN  
INEN  
MIPRO  
MIPRO (DIDECO)  
PASTEURIZADORA QUITO  
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
INEN

Otros trámites: Esta NTE INEN 16:2015 (Segunda revisión), reemplaza a la NTE INEN 16:1984 (Primera revisión)

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

Oficializada como: Voluntaria  
Registro Oficial No. 413 de 2015-01-10

Por Resolución No. 14516 de 2014-12-19

---

Servicio Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre  
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891  
Dirección Ejecutiva: E-Mail: [direccion@normalizacion.gob.ec](mailto:direccion@normalizacion.gob.ec)  
Dirección de Normalización: E-Mail: [consultanormalizacion@normalizacion.gob.ec](mailto:consultanormalizacion@normalizacion.gob.ec)  
Dirección Zonal Guayas: E-Mail: [inenguayas@normalizacion.gob.ec](mailto:inenguayas@normalizacion.gob.ec)  
Dirección Zonal Azuay: E-Mail: [inencuenca@normalizacion.gob.ec](mailto:inencuenca@normalizacion.gob.ec)  
Dirección Zonal Chimborazo: E-Mail: [inenriobamba@normalizacion.gob.ec](mailto:inenriobamba@normalizacion.gob.ec)  
[URL:www.normalizacion.gob.ec](http://www.normalizacion.gob.ec)