

CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO/PROTEÍNA TOTAL CON THERMO SCIENTIFIC™ FLASHSMART™





El método Dumas

A mediados del Siglo XIX, el químico francés Jean Baptiste Dumas desarrolló un método de combustión que permitía analizar el contenido de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno en materia orgánica. La técnica consistía en incinerar la muestra en un recipiente cerrado y recoger los gases producidos (CO₂, H₂O y N₂) en esferas de vidrio con distintos reactivos. Luego cada esfera era pesada para calcular el porcentaje de cada gas. A pesar de la sencillez del experimento, la falta de instrumental adecuado hizo que este método cayera en desuso al propagarse el Método de Kjeldhal, desarrollado en 1883.

DUMAS VS. KJELDHAL

Uno de los parámetros más importantes en cualquier alimento, es sin duda el porcentaje de Proteínas: Por ejemplo un exceso de proteína en alimento de forraje puede ser perjudicial para el ganado, pero una deficiencia puede ser mortal. El precio de la soja y otros granos se determina en base al porcentaje de Proteína. Ciertos productos alimenticios, por ejemplo las formulaciones infantiles, deben cumplir con un contenido mínimo de proteína.

Actualmente el método más utilizado para determinar contenido de Nitrógeno y Proteína Total es el Kjeldahl: una extensa digestión y retro-titulación, que genera una gran cantidad de residuos tóxicos, especialmente de Mercurio. Incluso con el avenimiento de autotituladores, el tiempo de análisis y cantidad de masa requerida son mucho mayores respecto del Método Dumas.

ANALIZANDO NITRÓGENO Y PROTEÍNAS CON EL FLASHSMART

El Analizador Elemental Orgánico FlashSmart™ utiliza el método Dumas modificado, que permite cuantificar el porcentajes de cada elemento en distintos tipos de muestras, ya sean orgánicas o no. Para medir el porcentaje de Proteína de una muestra, una pequeña masa (alrededor de 100 – 500 mg) se coloca en una cápsula de estaño, dentro del Analizador Elemental Orgánico FlashSmart. Este lleva a la muestra a combustión a 1800°C por unos segundos, descomponiéndola rápida y completamente. Los gases producidos

pasan por un reactor con distintos catalizadores para convertirse completamente en CO₂, H₂O, N₂, y SO₂; por lo que también es posible medir el porcentaje de Azufre. Una columna cromatográfica separa eficientemente los gases, que son detectados mediante una TCD, y en menos de 10 minutos se obtiene el porcentaje de Nitrógeno en la muestra y por lo tanto, de Proteínas.

A PESAR DE LA SENCILLEZ DEL EXPERIMENTO, LA FALTA DE INSTRUMENTAL ADECUADO HIZO QUE ESTE MÉTODO CAYERA EN DESUSO AL PROPAGARSE EL MÉTODO DE KJELDHAL, DESARROLLADO EN 1883.

CEREALES Y LEGUMBRES

Introducción

Los Cereales y las Legumbres son dos de los cultivos más ampliamente plantados en el mundo ya que son el principal componente de la dieta humana y forrajera para ganado. Uno de los nutrientes más



FIGURA 1

Jean Baptiste Dumas, químico y político francés.

importantes es la proteína y el monitoreo del contenido de nitrógeno debe ser exacto para determinar la calidad nutricional de estos productos. Además de su importancia en la dieta, el contenido de proteína es un indicador de calidad y por lo tanto precio para la compra-venta de granos en el mercado internacional. La globalización del mercado alimenticio requiere entonces un control exacto y confiable de las características del producto tanto por su valor comercial como para resguardar la salud del consumidor y la reputación del vendedor: dadas las regulaciones existentes en distintos mercados para el rotulado y el contenido de proteína, el cliente es quien compara calidad y define el precio basado en ese porcentaje de proteína declarada. Por estas razones, es necesario el uso de una técnica sencilla y automatizada que permita un análisis rápido con excelente reproducibilidad, y evite el riesgo asociado a la manipulación de sustancias químicas tóxicas. Una alternativa al clásico método Kjeldahl, basado en el método Dumas (por combustión), ha sido desarrollado y aprobado por varias asociaciones como la AOCA, AOAC, AACC, AOCS, ASBC, ISO, IFFO, IDF y otras.

Objetivo

Demostrar la performance analítica del Analizador Elemental Thermo Scientific™ FlashSmart™ en calidad de alimentos, rotulado de cereales y leguminosas;

y cumplimiento de las normas internacionales. El Analizador Elemental FlashSmart™ basa su operación en la Combustión Dinámica (Método Dumas) del material, por lo que no requiere digestión previa ni químicos tóxicos, a la vez que provee una importante ventaja en cuanto al tiempo, automatización y determinación cuantitativa del Nitrógeno en un amplio rango de concentraciones.

Método

El Analizador Elemental FlashSmart™ utiliza muestras pesadas en contenedores de Estaño que son introducidas dentro del reactor de combustión desde el automuestreador Thermo Scientific MAS Plus. Las muestras líquidas pueden introducirse con el automuestreador Thermo Scientific AI/AS 1310 o en forma manual mediante una jeringa. Una cantidad de oxígeno precisamente determinada por la función OxyTune® es agregada y la combustión llega a 1800°C brevemente, por lo que es posible analizar cualquier sustancia que se descomponga por debajo de esa temperatura (incluso aleaciones metálicas).

En esta configuración del FlashSmart™, como se ve en la Figura 3, luego de la combustión los gases producidos son arrastrados por un flujo de Helio hacia un segundo reactor lleno con cobre, luego sendas trampas para CO₂ and H₂O, una columna de GC, y finalmente un Detector de Conductividad Térmica

EL ANALIZADOR ELEMENTAL FLASHSMART™ BASA SU OPERACIÓN EN LA COMBUSTIÓN DINÁMICA (MÉTODO DUMAS) DEL MATERIAL, POR LO QUE NO REQUIERE DIGESTIÓN PREVIA NI QUÍMICOS TÓXICOS

FIGURA 2

Analizador Elemental Thermo Scientific™ FlashSmart™.



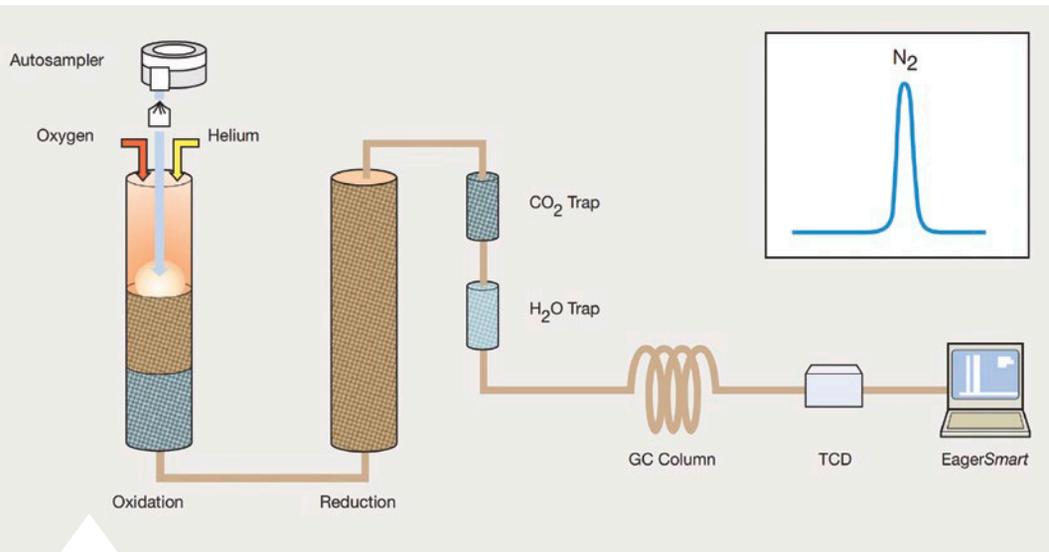


FIGURA 3.
Configuración "Nitrógeno/Proteína" del Analizador Elemental FlashSmart™.

(TCD). El reporte completo de la corrida analítica se genera automáticamente desde el Software Thermo Scientific™ EagerSmart™, que controla íntegramente el instrumento.

Resultados

Las muestras se homogeneizaron con un Molino hasta un tamaño de partícula de 1 mm, y se secaron en horno a 130°C durante 1 hora. La calibración se realizó con Ácido Aspártico con el factor K como método. El contenido de proteína se calculó utilizando un factor de 6.25. En la Tabla 1 se reporta la reproducibilidad obtenida analizando una muestra de Soja, no hay cambios significativos observables en el valor de Nitrógeno y Proteína al cambiar la masa de la muestra de 100 a 300 mg.

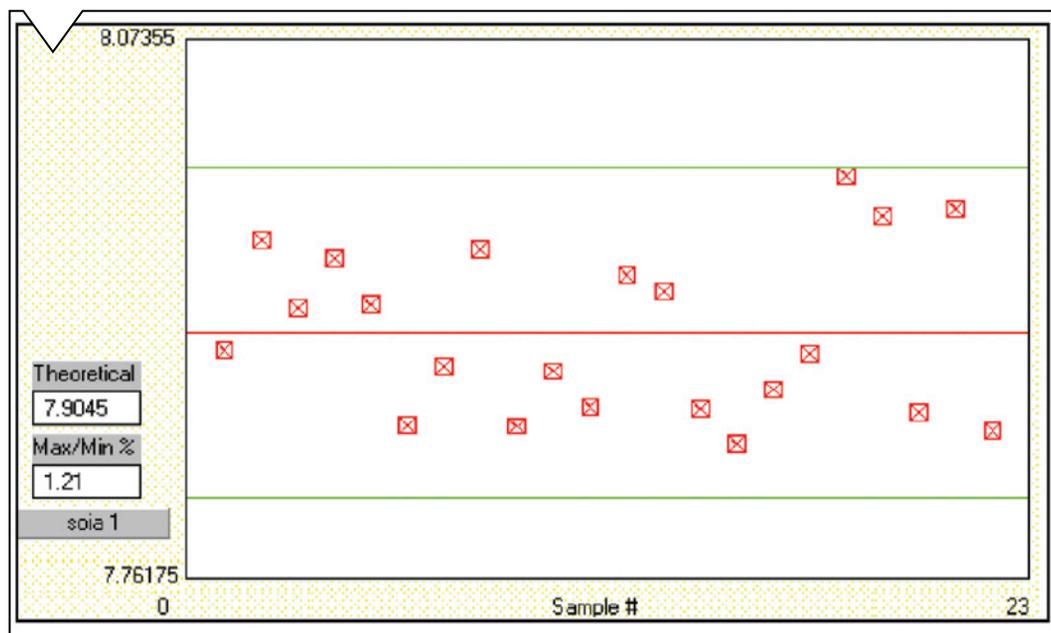
La Figura 4 muestra el gráfico estadístico de la dispersión de los datos de la corrida reportada en la Tabla 1. La excelentemente baja fluctuación obtenida demuestra la estabilidad del sistema y por lo tanto la reproducibilidad de los resultados, para una corrida de 22 muestras, con un valor Promedio para Nitrógeno de 7.90% y 0.06 para la RSD.

Por otra parte, en la Tabla 3 se muestra la determi-

Weight (mg)	N%	Protein %
103.4	7.89	49.34
205.9	7.96	49.74
296.6	7.92	49.49
217.4	7.95	49.67
189.8	7.92	49.50
200.2	7.85	49.06
232.4	7.88	49.28
230.2	7.95	49.70
188.5	7.85	49.06
211.8	7.88	49.26
178.9	7.86	49.13
216.0	7.94	49.61
188.0	7.93	49.55
185.1	7.86	49.12
242.5	7.84	49.00
186.7	7.87	19.19
202.9	7.89	49.33
218.0	7.99	49.97
198.7	7.97	49.82
204.0	7.86	49.11
220.1	7.98	49.85
206.2	7.85	49.05

TABLA 1
Reproducibilidad del porcentaje de Nitrógeno/Proteína en una muestra de Soja para distintas masas.

FIGURA 4
Gráfico Estadístico para los datos reportados en la Tabla 1.



Analytical Conditions	
Combustion Temperature	950 °C
Reduction Temperature	840 °C
Oven Temperature	50 °C
Helium Flow Rate Measurement Reference	140 ml/min 100 ml/min
Oxygen Flow Rate	300 ml/min
Total Run Time	less than 5 minutes
Nominal Sample Weight	200-300 mg
Standard	50-100 mg Aspartic acid
Calibration Method	K factor

TABLA 2
Condiciones de la corrida Analítica utilizada para las mediciones realizadas.



nación de Nitrógeno y Proteína en varias muestras de cereales y legumbres, para validar el sistema en distintas condiciones de contenido total de Nitrógeno y Proteína. Los datos muestran una excelente reproducibilidad: en todos los casos, la desviación estándar fue menor que 2%, en cumplimiento de la normativa AOAC 990.03 para alimento animal. No se observó ningún efecto memoria al cambiar la muestra, lo que significa una completa detección del Nitrógeno presente en la muestra.

En la Tabla 4 se reporta una comparación de los resultados para distintos cereales obtenidos mediante el Analizador Elemental FlashSmart™ y la titulación tradicional vía Kjeldahl. Los datos son perfectamente comparables entre ambos métodos, lo que demuestra la validez del método de combustión para el Análisis de Nitrógeno y Proteína.

Sample	W(mg)	N%	Prot. %	RSD%
Corn	276.7	1.38	8.62	8.60
	240.8	1.40	8.77	
	247.5	1.39	8.71	
	272.2	1.43	8.93	
	285.7	1.38	8.61	
	272.9	1.37	8.57	
	247.5	1.37	8.57	
	256.8	1.37	8.58	
	241.3	1.37	8.58	
259.2	1.38	8.60	0.40	
259.2	2.99	18.70		
255.7	2.99	18.68		
Wheat HRS	258.2	3.01	18.82	0.44
	213.9	2.24	14.00	
	250.9	2.26	14.12	
Wheat CPS-W	250.2	2.25	14.09	0.49
	254.4	2.28	14.23	
Wheat SWS	233.4	2.29	14.28	\
	230.9	2.30	14.37	
	296.0	3.99	24.96	
300.7	4.00	25.01		
307.5	3.98	24.89		
297.4	3.96	24.75		
310.7	4.01	25.08		
309.1	3.97	24.82		
310.5	3.99	24.94		
265.1	3.98	24.90		
270.0	3.97	24.84		
327.9	4.01	25.08	0.53	
297.0	3.92	24.49		
301.0	3.88	24.25		
Green Peas	323.0	3.91	24.45	0.45
	320.0	4.48	28.00	
	312.4	4.45	27.81	
Brown Peas	284.9	4.48	28.03	0.45
	315.0	4.46	27.89	
	290.5	4.44	27.73	
	290.5	4.44	27.73	

TABLA 3
Comparativa entre el Método Kjeldhal y el Analizador FlashSmart™ para distintas muestras: Soja, Lentejas, Arroz, Trigo y Porotos.

TABLA 4
Determinación del porcentaje de Nitrógeno/Proteína en distintos Cereales y Legumbres.

Sample	Kjeldahl Method Protein %	FlashSmart Elemental Analyzer Protein %
Soya	39.18	39.20
Lentils	27.19	27.17
Rice	7.00	7.08
Wheat	10.89	10.91
Beans	23.38	23.35

Technical Specification			FlashSmart Analyzers									
Element	Theoretical %	Uncertainty (±)	1		2		3		4		5	
			%	RSD %	%	RSD %	%	RSD %	%	RSD %	%	RSD %
N	2.20	0.07	2.18	0.26	2.19	0.26	2.20	0.26	2.18	0.26	2.18	0.26
			2.17		2.18		2.19		2.19			
			2.17		2.18		2.19		2.18			

TABLA 5

Datos para Nitrógeno obtenidos para el Material de Referencia de Pasta Seca.

BIPEA Ref. Mat.	Moisture %	Fat %	Carbohydrate %	Kjeldahl Protein		Combustion Protein	
				Av. %	Tolerance	Av. %	Tolerance
Feed for Sow	9.8	2.8	48.7	16.0	0.6	16.2	0.6
Dehydrated Alfalfa	7.7	-	29.3	14.8	0.6	15.1	0.6
Hiperproteic Powder	-	0.8	-	85.4	3.4	86.4	3.5

TABLA 6

Datos certificados para los Materiales de Referencia BIPEA: Alimento para Porcinos, Alfalfa Deshidratada y Polvo Hiperproteico.

BIPEA Ref. Mat.	Feed for Sow		Dehydrated Alfalfa		Hiperproteic Powder	
	%	N %	N %	Protein %	N %	Protein %
		2.61	2.43	15.21	13.74	85.90
		2.61	2.42	15.13	13.72	85.70
Average %		2.61	2.42	15.17	13.73	85.84
RSD %		0.00	0.29	0.37	0.10	0.10

TABLA 7

Datos para los Materiales de Referencia BIPEA obtenidos por el FlashSmart™.

OTROS PRODUCTOS ALIMENTICIOS

Exactitud y Precisión del Analizador FlashSmart™

La Exactitud y Precisión del FlashSmart™ se evaluaron analizando materiales de referencia certificados. En el primer caso, se analizó la Muestra de Referencia de Pasta Seca Thermo Scientific en cinco instrumentos en simultáneo. Luego de una calibración con 50 a 100 mg de Ácido Aspártico, se testeó por triplicado 200 a 300 mg del material. Los resultados se muestran en la Tabla 5: los valores de nitrógeno y su incerteza caen dentro de los valores esperados, confirmando la repetitividad y reproducibilidad de la técnica.

Por otra parte, se analizaron algunos Materiales de Referencia BIPEA (Bureau Inter Professionnel d'Etudes Analytiques, Francia) con distintos porcentajes de Nitrógeno. La Tabla 6 muestra los datos provistos en



los certificados de referencia, mientras que los resultados obtenidos con el FlashSmart™ se encuentran en la Tabla 7.

Finalmente, se analizaron en una única corrida varias muestras de distintos tipos de alimentos, con porcentajes de Nitrógeno entre 0.06 y 8 %. Se utilizó un factor apropiado para calcular el porcentaje de Proteína total según cada alimento. Por ejemplo, en la mayoría se utilizó el factor 6.25, pero para derivados lácteos se utilizó 6.38. La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos:

CONCLUSIONES

El Analizador Elemental FlashSmart™ basado en el método Dumas es una excelente solución para la determinación de Nitrógeno y Proteína totales, dada la superior repetitividad y reproducibilidad, ausencia de efecto memoria al cambiar de tipo de muestras, total automatización, y menor costo de análisis dada la casi total ausencia de reactivos. El tipo de muestras que se puede analizar es amplio: granos, carne, alimentos para animales, etc.; con un tiempo de análisis de 5 minutos por muestra, y sin generar desechos tóxicos (El único residuo generado en la operatoria son las cenizas y capsulas de estaño).

innovatek



Cra 21 No. 41 – 26
PBX (57) 338 0711

Bogotá, Colombia
www.innovatek.com.co
contacto@innovatek.com.co

Tel.: 011-4704-0865
info@sol-analiticas.com
www.sol-analiticas.com

Sample	Weight (mg)	N%	RSD %	Protein %	RSD %
Corn	130 - 140	1.34	0.39	8.38	0.44
		1.33		8.31	
		1.33		8.33	
Oats	250- 300	0.760	0.20	4.76	0.07
		0.763		4.77	
		0.762		4.76	
Cheese	200- 300	4.95	0.12	30.96	0.18
		4.96		31.00	
		4.97		31.07	
Baby Milk Powder	200 - 220	1.47	0.39	9.21	0.60
		1.46		9.12	
		1.46		9.11	
Biscuit (20% fat)	70 - 80	1.15	1.31	7.17	1.52
		1.16		7.26	
		1.18		7.39	
Vegetable Burger	200 - 300	0.656	0.15	4.10	0.16
		0.655		4.09	
		0.654		4.09	
Soy Cutlet	200 - 300	2.48	0.20	15.55	0.20
		2.49		15.59	
		2.48		15.54	
Concentrated Chicken	200 - 300	6.45	0.54	40.32	0.56
		6.48		40.50	
		6.41		40.06	
Blend Green Coffee	200 - 300	2.40	0.17	14.99	0.19
		2.41		15.05	
		2.40		15.01	
Cured Ham	300 - 350	4.38	0.35	27.37	0.35
		4.41		27.56	
		4.39		27.44	
Coppa (Meat Product)	300 - 350	4.49	0.81	28.06	0.80
		4.42		27.63	
		4.44		27.75	
Diet Crunch	180 - 230	1.80	0.55	11.24	0.57
		1.82		11.37	
		1.81		11.31	
Body Fit Crunch	200 - 250	7.70	0.07	48.10	0.09
		7.70		48.14	
		7.69		48.05	
Nuts Mix	50 - 60	4.18	0.24	26.12	0.23
		4.19		26.16	
		4.20		26.24	
Sesame Seeds	70 - 80	4.00	0.15	25.02	0.15
		3.99		24.97	
		3.99		24.94	
Tomato Soup Dried	140 - 180	1.62	0.55	10.10	0.55
		1.63		10.17	
		1.63		10.21	
Indian Chilli Sause	200 - 250	0.056	1.79	0.352	1.36
		0.057		0.354	
		0.055		0.345	

TABLA 8

Datos de porcentaje de Nitrógeno / Proteína para distintos alimentos: cárnicos, semillas, nueces, quesos, etc. .