

Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl



Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl

El método Kjeldahl se utiliza para la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas e inorgánicas.

Desde hace más de 100 años se está utilizando el método Kjeldahl para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras. La determinación del nitrógeno Kjeldahl se realiza en alimentos y bebidas, carne, piensos, cereales y forrajes para el cálculo del contenido en proteína. También se utiliza el método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno en aguas residuales, suelos y otras muestras.

Es un método oficial y descrito en múltiples normativas: **AOAC, USEPA, ISO, DIN, Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias.***

El método Kjeldahl consta de tres etapas:



¿Cuáles son las limitaciones del método Kjeldahl? Este método sólo mide el nitrógeno unido a componentes orgánicos (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos) y el amonio de la muestra. **Este método no es adecuado para compuestos que contienen nitrógeno en grupos azo y nitro o en anillos** (quinoleína, piridina, nitrato, nitrito, etc.).

1. Digestión

El objetivo del procedimiento de digestión es romper todos los enlaces de nitrógeno de la muestra y convertir todo el nitrógeno unido orgánicamente en **iones amonio (NH_4^+)**.

El carbono orgánico y el hidrógeno forman dióxido de carbono y agua. En este proceso la materia orgánica se carboniza dando lugar a la formación de una espuma negra. Durante la digestión, la espuma se descompone y finalmente se convierte en un líquido claro que indica que la reacción química ha terminado. Para ello, la muestra se mezcla con **ácido sulfúrico** a temperaturas entre **350 y 380 °C**. Cuanto más alta sea la temperatura, más rápido será el proceso de digestión. La digestión también se puede acelerar con la adición de sales y catalizadores. Se añade **sulfato de potasio** y/o **sulfato de sodio** para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y se añaden **catalizadores** para aumentar la velocidad y la eficiencia del procedimiento de digestión. También se pueden añadir agentes oxidantes para mejorar aún más la velocidad.

El tiempo de digestión depende de la estructura química de la muestra, la temperatura, las cantidades de sal sulfato y de catalizador.



Una vez la digestión ha finalizado, se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente, se diluye con agua y se trasvasa a la unidad de destilación.

* Algunos ejemplos de estos procedimientos oficiales son:

- Análisis de leche: EN ISO 8968, AOAC 991.20, Nitrógeno total en leche; AOAC 991.22 y 991.23, Contenido de Nitrógeno de proteína en leche; Reglamento (CE) N° 273/2008, Métodos para el análisis y evaluación de la calidad de la leche y productos lácteos.
- Análisis de agua: USEPA método 351.2, Determinación del nitrógeno total Kjeldahl en agua.
- Análisis de piensos: Reglamento (CE) N° 152/2009, Métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos - Determinación del contenido de proteína cruda.
- Análisis de productos farmacéuticos: Farmacopea Europea (Ph. Eur.) método 2.5.9., Farmacopea de los Estados Unidos (USP), método <461>. Determinación de nitrógeno.

Catalizadores Kjeldahl

Los catalizadores Kjeldahl están compuestos por más del 97% de una sal que provoca un aumento en la temperatura de ebullición del ácido sulfúrico y del 1-3% de un tipo de catalizador o una mezcla de catalizadores para aumentar la velocidad y la eficiencia del procedimiento de digestión. Los catalizadores típicos son selenio o sales metálicas de cobre o titanio.

La selección de un determinado catalizador depende de aspectos ecológicos y tóxicos o de razones más prácticas como el tiempo de reacción o la formación de espuma y la pulverización. Por ejemplo, el catalizador que contiene selenio reacciona más rápido pero es tóxico, mientras que un catalizador que contiene cobre es **más seguro para las personas y el medio ambiente**, pero da un proceso de digestión más lento. Un compromiso ideal es el catalizador mixto que consiste en cobre y sulfato de titanio.

Código de producto	Nombre de producto	Peso tableta	Tamaño de envase	Composición					Recomendación
				Na ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Se	TiO ₂	
173350.0413	Catalizador Kjeldahl (Cu) (0,3% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletas		3,489 g	0,010 g			Catalizador de Missouri. Compatibilidad ambiental debido al bajo contenido de cobre, pero la digestión lleva más tiempo.
173350.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletas		4,985 g	0,015 g			
174428.1211	Catalizador Kjeldahl (Cu) (6,25% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	1 g	1000 g / 1000 tabletas		0,938 g	0,0625 g			
174428.0446		4 g	4 kg / 1000 tabletas		3,75 g	0,25 g			
175639.0414	Catalizador Kjeldahl (Cu) (9% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	5 g	5 kg / 1000 tabletas		4,55 g	0,45 g			Tableta universal. Para aplicaciones micro Kjeldahl se recomiendan tabletas de 1,5 g aprox. Buen rendimiento y bajo impacto en el medio ambiente.
177040.0446	Catalizador Kjeldahl (Cu) (10,26% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	4 g	4 kg / 1000 tabletas		3,589 g	0,410 g			
172926.1211	Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (1,5% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 2% Se) tabletas	1 g	1000 g / 1000 tabletas		0,965 g	0,015 g	0,02 g		Catalizador de Wiener.
172926.0413		3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletas		3,377 g	0,052 g	0,07 g		
172926.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletas		4,825 g	0,075 g	0,1 g		
175570.0446	Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (9% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 0,9% Se) tabletas	4 g	4 kg / 1000 tabletas		3,60 g	0,36 g	0,036 g		
173349.0496	Catalizador Kjeldahl (Cu-TiO ₂) tabletas	3,71 g	3,71 kg / 1000 tabletas	1,75 g	1,75 g	0,104 g		0,104 g	Perfecto equilibrio entre digestión rápida e impacto medioambiental.
173349.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletas	2,358 g	2,358 g	0,1415 g		0,1415 g	
173348.0413	Catalizador Kjeldahl (Se) tabletas	3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletas		3,49 g		0,003 g		Digestión rápida, aunque no óptimo para el medioambiente.
173348.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletas		4,99 g		0,005 g		
177768.0414	Catalizador Kjeldahl (Se) tabletas	5 g	5 kg / 1000 tabletas		4,95 g		0,05 g		Digestión rápida, aunque no óptimo para el medioambiente.
177010.0431	Catalizador Kjeldahl tabletas (Cu) (0,3% CuSO ₄ ·5H ₂ O)	6 g	3 kg / 500 tabletas		6 g	0,025 g			Catalizador respetuoso con el medio ambiente

Ácido y oxidante para la digestión

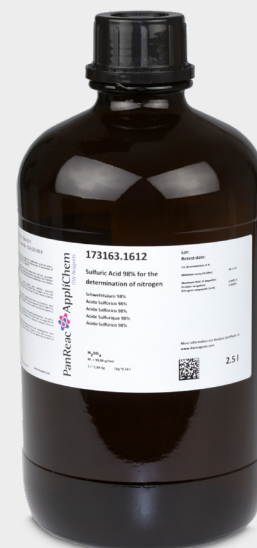
En aplicaciones generales de alimentos y piensos, se utiliza ácido sulfúrico al 98% para las digestiones.

También se pueden añadir agentes oxidantes para mejorar aún más la velocidad. El peróxido de hidrógeno es el más utilizado, ya que acelera la descomposición de la materia orgánica y también tiene una acción antiespumante para controlar la formación de espuma durante la digestión, lo que resulta particularmente ventajoso cuando la muestra contiene grasas o hidratos de carbono. Sin embargo, el uso de peróxido de hidrógeno, que es muy reactivo en presencia de ácido sulfúrico, puede causar la pérdida de nitrógeno como gas N₂. Por lo tanto, el peróxido de hidrógeno solo se recomienda cuando hay una mejora apreciable en el tiempo de digestión, y debe ser añadido a la muestra de forma gradual. Si la formación de espuma es el único inconveniente, es mejor usar 1-3 gotas de una emulsión antiespumante comercial.

Después de la digestión y antes de la neutralización del ácido sulfúrico con hidróxido sódico concentrado, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y se diluye con agua destilada para evitar salpicaduras de la muestra. Además, si las muestras se diluyen con 10-20 mL de agua justo después del enfriamiento, se puede evitar la cristalización.

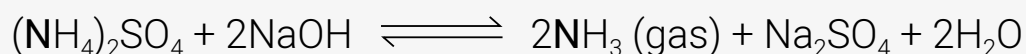
Código de producto	Nombre de producto	Número CAS	Tamaño de envase
173163.1611	Ácido Sulfúrico 98% para determinación de nitrógeno	7664-93-9	1 L
173163.1612			2,5 L
173163.0716			25 L
131077.1211	Hidrógeno Peróxido 33% p/v (110 vol.) (Reag. USP) para análisis, ACS, ISO*	7722-84-1	1 L
211628.1210	Silicona líquida antiespumante (ORG) grado técnico		500 mL
131074.1211	Agua para análisis, ACS	7732-18-5	1 L
131074.1212			2,5 L
131074.1214			5 L
131074.1315			10 L
131074.0716			25 L

*La concentración de peróxido de hidrógeno expresada en volúmenes significa el volumen de oxígeno gas liberado por la descomposición de un volumen de peróxido de hidrógeno (1 mL de una solución de 100 volúmenes genera 100 mL de oxígeno gas cuando se descompone completamente).



2. Destilación

La muestra ácida se neutraliza por medio de una solución concentrada de hidróxido sódico. Durante el proceso de destilación los iones amonio (NH₄⁺) se convierten en amoníaco (NH₃) que es arrastrado al vaso receptor por medio de una corriente de vapor de agua (destilación al vapor).



El vaso receptor para el destilado se llena con una solución absorbente para capturar el gas amoníaco disuelto. La solución absorbente más común es el ácido bórico [B(OH)₃] en solución acuosa al 2-4%. También pueden utilizarse otros ácidos, dosificados con precisión, como el ácido sulfúrico o clorhídrico para capturar el amoníaco en forma de iones amonio solvatados.

El ácido bórico es el método de elección porque permite la automatización.



Álcalis para neutralización y liberación de amoníaco

Código de producto	Nombre de producto	Número CAS	Tamaño de envase
131687.1210	Sodio Hidróxido lentejas	1310-73-2	500 g
131687.1211			1 kg
131687.1214			5 kg
131687.0416			25 kg
141571.1214	Sodio Hidróxido solución 50% p/v	1310-73-2	5 L
171220.1214	Sodio Hidróxido solución 40% p/p	1310-73-2	5 L
171220.1315			10 L
171220.0715			10 L
171220.0716			25 L
122666.1211	Sodio Hidróxido solución 32% p/v	1310-73-2	1 L
122666.1214			5 L
176682.1214	Sodio Hidróxido solución 32% p/p	1310-73-2	5 L
176682.0715			10 L
176682.0716			25 L



Soluciones para recogida del amoníaco



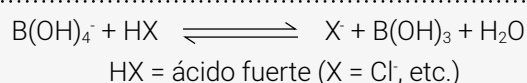
Código de producto	Nombre de producto	Número CAS	Tamaño de envase
283334.1214	Solución Fijadora de Amoníaco 1% (Ácido Bórico 1%*)	10043-35-3	5 L
287096.1214	Ácido Bórico solución 2%	10043-35-3	5 L
287096.0716			25 L
282222.1211	Ácido Bórico solución 4%	10043-35-3	1 L
282222.1214			5 L
181023.1211	Ácido Clorhídrico 0,1 mol/L	7647-01-0	1 L
181023.1212			2,5 L
181023.1214			5 L
181023.0715			10 L
181023.1315	Ácido Clorhídrico 0,5 mol/L	7647-01-0	10 L
181022.1211			1 L
181022.1214			5 L
181022.1315	Ácido Sulfúrico 0,05 mol/L (0,1N)	7664-93-9	10 L
181061.1211			1 L
181061.1315			10 L
181061.0716	Ácido Sulfúrico 0,1 mol/L (0,2N)	7664-93-9	25 L
182011.1211			1 L
181060.1315	Ácido Sulfúrico 0,25 mol/L (0,5N)	7664-93-9	10 L
181059.1211	Ácido Sulfúrico 0,5 mol/L (1N)	7664-93-9	1 L
181059.1315			10 L

* Contiene 0,00075% de Rojo de Metilo y 0,001% de Verde de Bromocresol como indicadores. Para análisis automáticos.

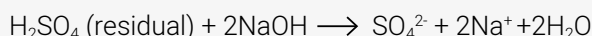
3. Valoración

La concentración de los iones amonio capturados puede determinarse por medio de dos tipos de valoración:

- Cuando se utiliza el ácido bórico como solución absorbente, posteriormente se lleva a cabo una valoración ácido-base utilizando una solución estandarizada de ácido sulfúrico o clorhídrico. El rango de concentración de la solución utilizada varía entre 0,01 mol/L a 0,5 mol/L dependiendo de la cantidad de iones amonio presentes. La detección del punto final se puede realizar manualmente, con una valoración **colorimétrica**, utilizando una combinación de indicadores. La combinación de indicadores de rojo de metilo y azul de metileno se utiliza con frecuencia en muchos métodos. El punto final de la valoración también se puede determinar potenciométricamente con un **electrodo de pH**. Esta valoración se llama **valoración directa**.



- Cuando se utiliza una solución valorada de ácido sulfúrico como solución absorbente, el ácido sulfúrico residual (es decir, el exceso que no reacciona con NH₃) se valora con una solución estandarizada de hidróxido sódico y la cantidad de amoníaco se calcula por diferencia. El punto final se detecta con un indicador de color, el más utilizado es el rojo de metilo. Esta valoración se llama **valoración indirecta o por retroceso**.



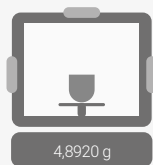
Código de producto	Nombre de producto	Concentración	Tamaño de envase
Valoración directa			
181023.1211	Ácido Clorhídrico	0,1 mol/L	1 L
181023.1212			2.5 L
181023.1214			5 L
181023.0715			10 L
181023.1315			10 L
181061.1211	Ácido Sulfúrico	0,05 mol/L	1 L
181061.1315			10 L
181061.0716			25 L
283303.1609	Indicador Mixto 4,8 (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol) Cambio de color: de rosa violeta a verde esmeralda (pH 4,8-5,5)		250 mL
282430.1609	Indicador Mixto Tashiro 4,4 (Rojo de Metilo-Azul de Metileno) Cambio de color: de rojo violeta a verde (pH 4,4-5,8)		250 mL
Valoración por retroceso			
181693.1211	Sodio Hidróxido	0,1 mol/L	1 L
181693.1214			5 L
181693.1315			10 L
281618.1208	Rojo de Metilo solución 0,1% Cambio de color: de rojo a amarillo (pH 4,2-6,2)		100 mL



Consulte nuestra gama completa de soluciones valoradas en www.itwreagents.com

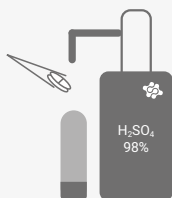
Como **ejemplo**, en las siguientes figuras se detallan los procesos de digestión, destilación y valoración para una **muestra de leche**.

DIGESTIÓN

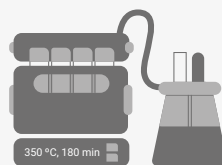


Balanza

- Pesar aprox. 5 g de la muestra homogeneizada.



- Introducir la muestra en un matraz de digestión.
- Añadir 2 tabletas Kjeldahl de 5 g de catalizador de Missouri, 20 mL de Ácido Sulfúrico 98% y homogeneizar suavemente.



Bloque calefactor Scrubber

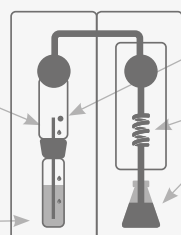
- Colocar la mezcla en la unidad de digestión/calefacción.
- Calentar la mezcla (350 - 380 °C) hasta la aparición de humos blancos y continuar el calentamiento durante 3 h aprox.

- Los vapores de agua y ácido sulfúrico se burbujan a través de una solución de hidróxido de sodio (lavador de gases o scrubber) para ser neutralizados.
- La digestión finaliza cuando la muestra pasa a ser transparente con un ligero color azul.
- Se deja enfriar la muestra y se añaden con precaución 100 mL de agua.
- La muestra es transferida a la unidad de destilación.

DESTILACIÓN

3. Una corriente de vapor de agua se burbueja en la muestra y arrastra el NH₃ formado.

1. Muestra ya digerida con ácido sulfúrico 98%.



Unidad de destilación

2. Se añaden 50 mL de NaOH 50% para neutralizar el pH y convertir el NH₄⁺ en NH₃.

4. El NH₃ condensa.

5. El NH₃ se captura en 50 mL de ácido bórico al 4% con indicador de Tashiro. La solución virará de rojo violeta a verde (pH 4,4-5,8). Se recogen aprox. 150 mL de condensado en la solución de ácido bórico.

VALORACIÓN



- Valorar con HCl 0,25 mol/L hasta que la solución tenga un ligero color violeta.
- Con la concentración y el volumen de HCl gastado en la valoración, se calcula el contenido de nitrógeno y luego el % de proteína en la muestra de leche.

Cálculos

Los cálculos para el % de nitrógeno o de proteína deben tener en cuenta qué tipo de solución receptora se utilizó y qué factores de dilución se usaron durante el proceso de destilación. En las fórmulas siguientes, "N" representa la normalidad. "mL blanco" se refiere a los mililitros de álcali consumidos en la valoración por retroceso de un blanco, si la solución receptora es ácido clorhídrico o ácido sulfúrico estandarizados, o se refiere a mililitros de solución valorada de ácido para titular un blanco si la solución receptora es ácido bórico.

- Cuando se utiliza ácido bórico como solución receptora, la fórmula es:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL ácido valorante} - \text{mL blanco}) \times N \text{ del ácido} \times 1,4007}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

- Cuando se utiliza solución valorada de ácido como solución receptora, la fórmula es:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{[(\text{mL ácido valorante} \times N \text{ del ácido}) - (\text{mL blanco} \times N \text{ del álcali})] - (\text{mL del álcali} \times N \text{ del álcali}) \times 1,4007}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Si se desea determinar el % de proteína en lugar de nitrógeno, el % de N calculado se multiplica por un factor que depende del tipo de proteína presente en la muestra, por ejemplo, para huevos o carnes el factor es 6,25, para productos lácteos es 6,38, para trigo es 5,70, soja y derivados 5,71, etc.



A173,ES;202310



PanReac
AppliChem
ITW Reagents

AppliChem GmbH

Ottoweg 4 • DE-64291 Darmstadt • Germany • Phone +49 6151 9357 0 • Fax +49 6151 9357 11
info.de@itwreagents.com

ITW Reagents, S.R.L.

Corso Milano 31 • I-20900 Monza (MB) Italy • Phone +39 039 9530 360 • Fax +39 039 9530 361
info.it@itwreagents.com

Panreac Química SLU

C/ Garraf 2, Polígono Pla de la Bruguera • E-08211 Castellar del Vallès • (Barcelona) Spain • Phone +34 937 489 400 • Fax +34 937 489 401
info.es@itwreagents.com



itwreagents.com