

Determinación de
Nitrógeno por el
Método Kjeldahl

PanReac 
AppliChem
ITW Reagents

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:



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. Cuánto 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 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.



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.

2. Destilación

Durante el proceso de destilación los iones amonio (NH_4^+) se convierten en amoníaco (NH_3) mediante la adición de un álcali (NaOH). El amoníaco (NH_3) es arrastrado al vaso receptor por medio de una corriente de vapor de agua.



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 [$\text{B}(\text{OH})_3$] en solución acuosa al 2-4%. El amoníaco es capturado cuantitativamente por la solución de ácido bórico formando iones amonio solvatados.



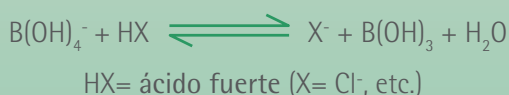
- También pueden utilizarse otros ácidos, dosificados con precisión, como el ácido sulfúrico o clorhídrico para capturar el amoníaco en forma de iones amonio solvatados.



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 y una mezcla de indicadores. El rango de concentración de la solución utilizada varía entre 0,01N a 0,5N dependiendo de la cantidad de iones amonio presentes. 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 NH_3) se valora con una solución estandarizada de hidróxido sódico y la cantidad de amoníaco se calcula por diferencia. Esta valoración se llama **valoración indirecta o por retroceso**.



Esquema del proceso

Las cantidades de muestra óptimas (de 0,01 a 5 g) dependen del contenido de nitrógeno esperado, pero también afecta la elección de la concentración del valorante. El límite de las cantidades de muestra normalmente necesita ser determinado experimentalmente. Debería contener de 30 a 140 mg de N. Idealmente, el tamaño de partícula debería ser <1 mm. La muestra debe ser homogénea y se debe moler o triturar si es necesario.

El volumen de ácido sulfúrico 98% utilizado va en función del consumo esperado de ácido sulfúrico en la reacción redox que convierte el ácido sulfúrico en dióxido de azufre. Al final de la digestión, debe quedar un exceso de ácido en cantidad suficiente para mantener los iones de amonio no volátiles en solución y prevenir la pérdida de amoniaco volátil. Típicamente, para 1 g de muestra, se usan dos comprimidos de Kjeldahl de 5 g junto con 20 mL de ácido sulfúrico al 98% y se aplican tiempos de digestión de 90 minutos. Una buena proporción es de 1 g de mezcla de catalizador Kjeldahl por cada 2 mL de ácido sulfúrico al 98%.

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

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

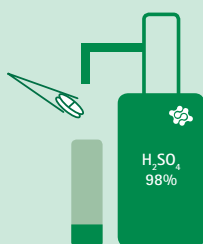
1. DIGESTIÓN



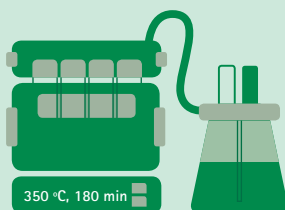
4,8920 g

Balanza

- Agitar la muestra de leche con cuidado para que no forme espuma.
- Pesar con precisión aproximadamente 5 g de la muestra homogénea.



- Introducir la muestra en un matraz de digestión.
- Añadir 2 tabletas Kjeldahl de 5 g de catalizador de Missouri.
- Añadir 20 mL de Ácido Sulfúrico 98%
- Con cuidado, suspender la muestra agitando el tubo suavemente.



350 °C, 180 min

Bloque calefactor Scrubber

- Colocar el tubo o matraz de digestión con la muestra en la unidad de digestión y en el bloque calefactor.
- Calentar la mezcla (350 - 380 °C) hasta la aparición de humos blancos.
- Continuar el calentamiento durante unos 180 minutos.
- 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 totalmente transparente con un ligero color azul debido al Cu del catalizador.
- Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se añaden con precaución 100 ml de agua.
- A continuación, la muestra es transferida a la unidad de destilación.

2. DESTILACIÓN

2

Se añaden 50 mL de sodio hidróxido al 50 % para neutralizar el pH de la muestra y convertir el NH_4^+ en NH_3 .

3

Una corriente de vapor de agua se burbujea en la muestra y arrastra el NH_3 formado.

1

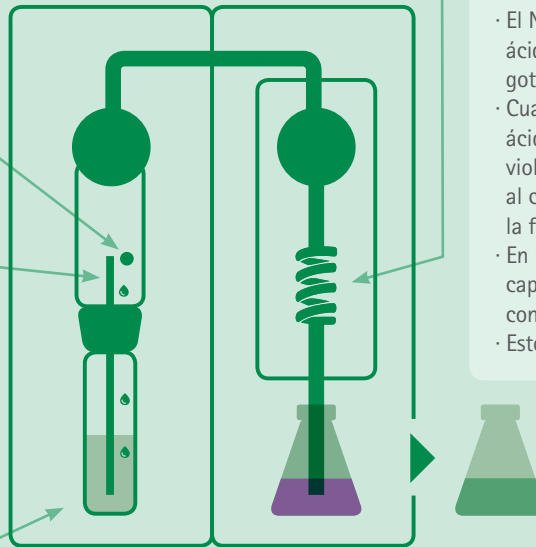
Muestra ya digerida con ácido sulfúrico 98 %

4

El NH_3 condensa.

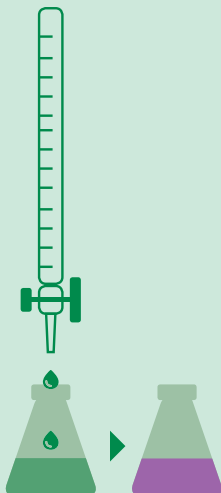
5

- El NH_3 se captura en 50 mL de ácido bórico al 4 % conteniendo 6 - 7 gotas de indicador de Tashirol.
- Cuando el NH_3 reacciona con el ácido bórico, la solución vira de rojo violeta a verde (pH 4,4-5,8) debido al cambio del indicador al pasar de la forma ácida a la forma básica.
- En la solución de ácido bórico se capturan alrededor de 150 mL del condensado.
- Esto puede llevar aprox. 5 minutos.



Unidad de destilación

3. 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, podemos calcular el número de moles de átomos de nitrógeno en la muestra y luego el % de proteína en la muestra de leche.

Reactivos utilizados en el análisis Kjeldahl

1. Digestión

1.1. Catalizadores Kjeldahl

Los catalizadores 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 considerablemente 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.

En muestras que contienen agua, por ejemplo, en determinaciones de nitrógeno total Kjeldahl (NTK), se pueden formar espuma y fuertes salpicaduras debido a las tabletas Kjeldahl. En estos casos es apropiado utilizar una mezcla de catalizador en polvo y perlas reguladoras de ebullición.

Además, los tiempos de digestión dependen del tipo de muestra, el volumen de ácido sulfúrico, la proporción de ácido y sal y el tipo de catalizador. Por ejemplo, las grasas, aceites y los compuestos heterocíclicos aromáticos se digieren más fácilmente si el catalizador contiene selenio.

El uso de cobre como catalizador se está volviendo más común por ser más respetuoso con el medioambiente. Actualmente, el selenio o el cobre se utilizan como catalizadores en más del 90% de las digestiones de Kjeldahl que se realizan en todo el mundo.



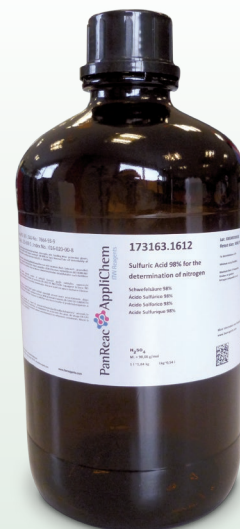
Producto	Código	Peso tableta	Envase	Composición					Recomendación
				Na ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Se	TiO ₂	
Catalizador Kjeldahl (Cu) (0,3% en CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	173350.1213	3,5 g	3,5 kg		3,489 g	0,010 g			Catalizador de Missouri. Compatibilidad ambiental debido al bajo contenido de cobre, pero la digestión lleva más tiempo.
	173350.1214	5 g	5 kg		4,985 g	0,015 g			
Catalizador Kjeldahl (Cu) (1,96% en CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	177033.1214	5 g	5 kg		4,902 g	0,098 g			
Catalizador Kjeldahl (Cu) (6,25% en CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	174428.1211	1 g	1000 g		0,938 g	0,0625 g			
	174428.1246	4 g	4 kg		3,75 g	0,25 g			
Catalizador Kjeldahl (Cu) (9% en CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	175639.12111	1,65 g	1650 g		1,501 g	0,148 g			Tableta universal. Para aplicaciones micro Kjeldahl se recomiendan tabletas de 1,5 g aprox. Buen rendimiento y bajo impacto en el medio ambiente.
	175639.1214	5 g	5 kg		4,55 g	0,45 g			
Catalizador Kjeldahl (Cu) (10,26% en CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletas	177040.1246	4 g	4 kg		3,589 g	0,410 g			
Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (1,5% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 2% Se) polvo	172429.1211	-	1000 g		0,965 g	0,015 g	0,02 g		Catalizador de Wieninger. Apropiado para muestras que contienen agua.
Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (1,5% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 2% Se) tabletas	172926.1211	1 g	1000 g		0,965 g	0,015 g	0,02 g		Catalizador de Wieninger.
	172926.1213	3,5 g	3,5 kg		3,377 g	0,052 g	0,07 g		
	172926.1214	5 g	5 kg		4,825 g	0,075 g	0,1 g		
Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (9% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 0,9% Se) tabletas	175570.1246	4 g	4 kg		3,60 g	0,36 g	0,036 g		
Catalizador Kjeldahl (Cu-TiO ₂) tabletas	173349.1296	3,71 g	3,71 kg	1,75 g	1,75 g	0,104 g		0,104 g	Perfecto equilibrio entre digestión rápida e impacto medioambiental.
	173349.1214	5 g	5 kg	2,358 g	2,358 g	0,1415 g		0,1415 g	
Catalizador Kjeldahl (Se) tabletas	173348.1213	3,5 g	3,5 kg		3,49 g		0,003 g		Digestión rápida, aunque no óptimo para el medioambiente.
	173348.1214	5 g	5 kg		4,99 g		0,005 g		

Reactivos utilizados en el análisis Kjeldahl

1. Digestión

1.2. Ácido y oxidante para la digestión

En aplicaciones generales de alimentos y piensos, se utiliza ácido sulfúrico al 98% para las digestiones. Sin embargo, las aplicaciones especiales pueden requerir modificaciones en la concentración de ácido sulfúrico o mezclas de ácidos. Como ejemplo, las determinaciones de proteínas de la leche y derivados a menudo se llevan a cabo utilizando un ácido sulfúrico al 69% para reducir el riesgo de formación de espuma.



También se pueden añadir agentes oxidantes para mejorar aún más la velocidad. El peróxido de hidrógeno es el más ampliamente utilizado ya que acelera la descomposición del material orgánico y también tiene una acción antiespumante para controlar la formación de espuma durante la digestión. Sin embargo, es extremadamente reactivo y el riesgo de pérdidas de nitrógeno es bastante alto. Si la formación de espuma es el único problema, 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. Esto se hace para evitar salpicaduras de la muestra debido a la ebullición provocada por el calor de reacción desprendido al mezclar el ácido concentrado y la base. Además, si las muestras se diluyen con 10-20 mL de agua justo después del enfriamiento, se puede evitar la cristalización.

Producto	Código	Envase
Ácido Sulfúrico 98% para determinación de nitrógeno	173163.1611	1000 ml
	173163.1612	2,5 L
	173163.0716	25 L
Hidrógeno Peróxido 30% p/v (100 vol.) para análisis	121076.1211	1000 ml
	121076.1214	5 L
Silicona líquida antiespumante (ORG) grado técnico	211628.1208	100 ml
	211628.1209	250 ml
	211628.1210	500 ml
Agua para análisis, ACS	131074.1211	1000 ml
	131074.1212	2,5 L
	131074.1214	5 L
	131074.1315	10 L

2. Destilación

2.1 Álcalis para neutralización y liberación de amoníaco

La muestra ácida se neutraliza por medio de una solución concentrada de hidróxido sódico. Por lo general, se agrega lentamente NaOH al 50% desde el cuello del matraz. Al ser más pesado, forma una capa debajo de la mezcla de digestión ácida diluida. Generalmente, por cada 5 mL de ácido sulfúrico concentrado usado en la digestión, se requieren 20 mL de hidróxido de sodio al 50% para hacer que la mezcla digerida sea fuertemente alcalina ($\text{pH} > 11$). Los iones de amonio se convierten en amoníaco que se transfiere al recipiente receptor por medio de destilación al vapor.



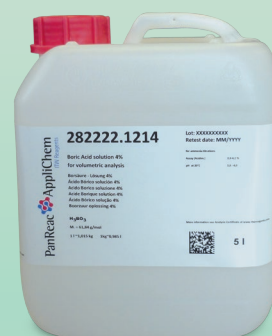
Producto	Concentración	Código	Envase
Sodio Hidróxido	Lentejas	131687.1210	500 g
		131687.1211	1000 g
		131687.1214	5 kg
		131687.0416	25 kg
	50 % p/v	141571.1214	5 L
	40 % p/p	171220.1211	1000 ml
		171220.1214	5 L
		171220.1315	10 L
		171220.0715	10 L
		171220.0716	25 L
32 % p/v	122666.1211	1000 ml	
	122666.1214	5 L	

La destilación debería durar lo suficiente como para recuperar más del 99,5% del amoníaco en el recipiente receptor. Un tiempo de destilación típico es de 4 minutos con una potencia de vapor del 100%.

2.2 Soluciones para recogida del amoníaco

El recipiente receptor para el destilado se llena con una solución absorbente para capturar el gas amoníaco disuelto. Dependiendo del volumen de la mezcla de digestión y el método seguido, se deben recoger de 15 a 150 mL de condensado en el matraz receptor para asegurar la recuperación completa del nitrógeno. Las soluciones receptoras pueden ser ácido bórico, ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. El ácido bórico es el método de elección porque permite la automatización.

Producto	Concentración	Código	Envase
Ácido Bórico	1 %. Contiene 0,00075% de Rojo de Metilo y 0,001% de Verde de Bromocresol como indicadores. Para análisis automáticos.	283334.1214	5 L
		283334.0716	25 L
	2 %	287096.1214	5 L
		287096.0716	25 L
	3 %	282928.1211	1000 ml
	4 %	282222.1211	1000 ml
282222.1214		5 L	
Ácido Clorhídrico	0,1 mol/l	181023.1211	1000 ml
		181023.1212	2,5 L
		181023.1214	5 L
		181023.0715	10 L
		181023.1315	10 L
	0,5 mol/l	181022.1211	1000 ml
		181022.1214	5 L
		181022.1315	10 L
Ácido Sulfúrico	0,05 mol/l	181061.1211	1000 ml
		181061.1214	5 L
		181061.1315	10 L
	0,1 mol/l	182011.1211	1000 ml
	0,25 mol/l	181060.1211	1000 ml
		181060.1212	2,5 L
181060.1315	10 L		



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

3. Valoración

3.1 Soluciones valoradas e indicadores

Si la solución receptora es ácido bórico, los aniones tetrahidroxiborato formados se titulan con una solución estándar de un ácido fuerte. Esta valoración se llama **valoración directa**.

- La detección del punto final se puede realizar manualmente o 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. Es preferible ajustar el pH del ácido bórico a 4,65 antes de la destilación y usar un punto final de pH 4,65 para la valoración.

Si la solución receptora es un ácido clorhídrico o un ácido sulfúrico estandarizados, el exceso de solución ácida se neutraliza exactamente mediante una solución alcalina normalizada, como el hidróxido de sodio. El punto final se detecta con un indicador de color, el más utilizado es el anaranjado de metilo. Esta valoración se llama **valoración por retroceso**.

Producto	Concentración	Código	Envase
Valoración directa			
Ácido Clorhídrico	0,1 mol/l	181023.1211	1000 ml
		181023.1212	2,5 L
		181023.1214	5 L
		181023.0715	10 L
		181023.1315	10 L
Ácido Sulfúrico	0,05 mol/l	181061.1211	1000 ml
		181061.1214	5 L
		181061.1315	10 L
Indicador Mixto 4,8 (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol) Cambio de color: de rosa violeta a verde esmeralda (pH 4,8-5,5)		283303.1609	250 ml
Indicador Mixto 4,4 (Rojo de Metilo-Azul de Metileno) (Indicador Tashiro). Cambio de color: de rojo violeta a verde (pH 4,4-5,8)		282430.1609	250 ml
Valoración por retroceso			
Sodio Hidróxido	0,1 mol/l	181693.1211	1000 ml
		181693.1214	5 L
		181693.1315	10 L
Rojo de Metilo solución 0,1% Cambio de color: de rojo a amarillo (pH 4,2-6,2)		281618.1208	100 ml

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



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:

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

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

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

Si se desea determinar el % de proteína en lugar de nitrógeno, el % de N calculado se multiplica por un factor que depende de la matriz de la muestra. Se han desarrollado muchos factores de proteínas para usar con varios tipos de muestras.

A continuación se encuentra el factor a utilizar según el tipo de alimento:

Alimento	% Nitrógeno	Factor	% Proteína
Cereales, pasta			
Arroz integral	1,3	6,25	7,9
Harina de trigo integral	2,4	5,7	13,7
Macarrones, espaguetis	1,9	5,7	11,0
Legumbres, frutos secos y semillas			
Alubias rojas	3,4	6,25	21,2
Soja y derivados	6,3	5,71	36,0
Almendras	4,9	5,18	25,3
Cacahuetes	4,8	5,46	26,0
Nueces	2,9	5,3	15,2
Semillas de girasol	3,2	5,3	17,2
Lácteos			
Leche entera	0,5	6,38	3,3
Queso (p, ej, Cheddar)	3,9	6,38	24,9
Mantequilla	0,3	6,38	2,0
Yogur	0,8	6,38	5,3
Carnes, aves y pescados			
Carne de vacuno	3,0	6,25	18,5
Pechuga de pollo	3,7	6,25	23,1
Jamón	2,8	6,25	17,6
Huevo entero	2,0	6,25	12,5
Pescado	2,6	6,25	16,0



PanReac 
AppliChem
ITW Reagents

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

AppliChem GmbH

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

Nova Chimica Srl

Via G. Galilei, 47
I-20092 Cinisello Balsamo
(Milano) Italy
Phone +39 02 66045392
Fax +39 02 66045394
info.it@itwreagents.com

www.itwreagents.com