

Compendium C. Gerhardt

ANALYSE DE L'AZOTE

LA MÉTHODE DE JOHAN KJELDAHL

Développement historique

D'un point de vue historique, les méthodes d'analyse officielles pour la détermination d'azote sont déjà « vieilles ». Johan Kjeldahl (Fig. 1) publia sa « Nouvelle méthode de détermination de l'azote dans les corps organiques » en 1883 et révolutionna ainsi l'analyse de l'azote [1]. La polyvalence de la méthode et la mise en œuvre simple de l'analyse, ainsi que sa grande précision, en ont fait la méthode de référence dans le secteur de l'alimentation humaine et animale. Dans l'analyse des sols et des eaux aussi, et partout où l'azote lié doit être déterminé, la méthode garde encore toute son importance.

Alors que Johan Kjeldahl, dans le laboratoire de la brasserie danoise Carlsberg, cherchait surtout à déterminer la teneur en protéines du moût, Jean Dumas, à Paris, s'intéressait à l'analyse par combustion des substances naturelles pour obtenir leur teneur en carbone et en hydrogène. Ce faisant, les deux chercheurs partaient d'une idée de base commune : un échantillon doit être complètement minéralisé pour que l'azote soit extrait de l'échantillon et déterminable en tant que valeur de mesure. Kjeldahl accomplissait cette minéralisation avec de l'acide sulfurique très concentré, tandis que Jean Dumas effectuait la combustion de l'échantillon avec de l'oxygène pur. Bien que les deux idées fondamentales semblent au premier abord simples et d'une logique cohérente, leur mise en œuvre dans la pratique de laboratoire comprend de nombreuses étapes critiques et exige une grande attention du personnel de laboratoire compétent.

Étapes de l'analyse selon la méthode Kjeldahl

Pour l'essentiel, l'analyse est constituée des étapes de travail suivantes :

- Minéralisation de l'échantillon avec de l'acide sulfurique
- Distillation de la solution minéralisée avec de la vapeur d'eau
- Titrage du distillat et calcul des résultats



Fig. 1 : Johan Kjeldahl

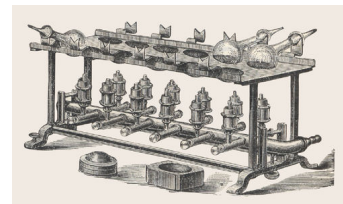


Fig. 2 : Appareil de minéralisation classique selon J. Kjeldahl avec des brûleurs à gaz et des flacons inclinés Kjeldahl à large cou et à fond rond [2]

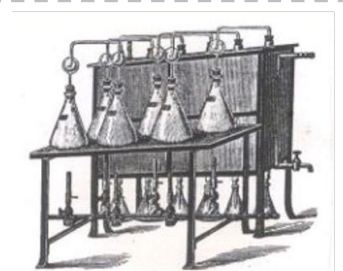
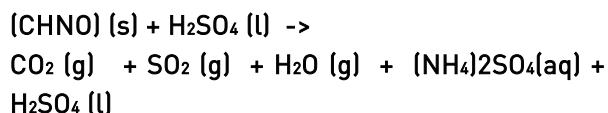


Fig. 3 : Appareil à brûleurs à gaz pour la distillation de solutions de minéralisation



La minéralisation acide

La minéralisation selon Kjeldahl est basée sur le principe selon lequel l'échantillon est détruit par oxydation avec de l'acide sulfurique concentré et bouillant. L'azote lié est détaché sans perte de sa matrice de liaison et transformé complètement en azote d'ammonium inorganique ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$). Après la réaction de minéralisation, la totalité de l'azote de l'échantillon est présente sous forme d'azote d'ammonium.



Ceci est techniquement faisable uniquement dans des grands ballons à fond rond et avec de puissants radiateurs à gaz. La figure 2 montre un appareil de minéralisation classique, comprenant déjà 6 emplacements, avec des brûleurs à gaz - une première tentative de traitement en série de la minéralisation acide. Une telle minéralisation dans l'acide sulfurique bouillant durait environ 3 à 5 heures et était adaptée pour des quantités d'échantillon allant jusqu'à 10 g - une méthode très universellement applicable, donc.

Aujourd'hui, on utilise pour ce faire des systèmes de minéralisation en bloc ou à infrarouges, qui répondent aux exigences modernes de sécurité en laboratoire. Le transfert de chaleur ne s'effectue plus directement au-dessus de la flamme du brûleur à gaz, mais par des radiateurs en fonte ou un rayonnement infrarouge sans contact. L'acide sulfurique bouillant doit se condenser presque complètement sur les

parois de verre, indépendamment de la source de chaleur, et revenir dans la solution de minéralisation. La figure 4 montre la situation idéalisée avec une solution de minéralisation (verte), la condensation des vapeurs d'acide et un collecteur d'aspiration installé pour les gaz corrosifs de la minéralisation.

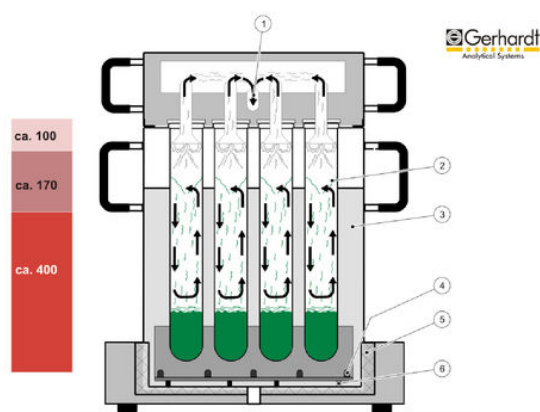


Fig. 4 : appareil de minéralisation moderne selon Kjeldahl avec radiateurs en fonte disposés en blocs, sur l'exemple du modèle KJELDATHERM 20 de C. Gerhardt.

À gauche, en rouge : la courbe de température dans le tube de minéralisation

1-aspiration, 2-ligne de retour et zone de condensation, 3-portoir de tubes, 4-élément chauffant, 5+6 isolation

Pour empêcher la fuite de gaz corrosifs dans l'air du laboratoire, l'appareil de minéralisation est généralement raccordé à un puissant épurateur de gaz. Celui-ci condense les gaz acides formés et neutralise dans la seconde étape les gaz acides restants avec une solution de soude caustique.

La figure 5 montre un tel épurateur de gaz, avec un flacon de lavage pour la condensation et un autre pour la neutralisation des vapeurs acides ainsi qu'une puissante pompe centrifuge permettant de générer une légère pression négative, réglable.



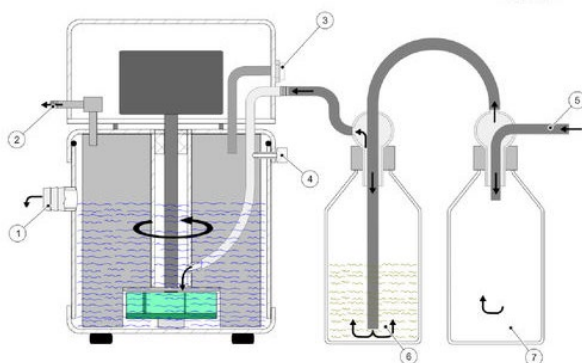


Fig. 5 : épurateur de gaz TURBOSOG de C. Gerhardt, pour l'aspiration et la neutralisation des vapeurs acides.

1-écoulement d'eau, 2-sortie de gaz, 3-entrée d'eau, 4-régulation du rendement d'aspiration, 5-entrée gaz de minéralisation, 6-flacon de neutralisation avec hydrate de potassium, 7-flacon de condensation

Quantité d'acide pour la minéralisation

La quantité d'acide sulfurique est déterminée par trois facteurs :

- consommation pour l'oxydation de la matrice organique des échantillons
- Pertes par évaporation au cours du processus de cuisson
- Transformation du sulfate de potassium en bisulfate de potassium

Alors que les deux derniers facteurs sont constants dans les mêmes conditions de minéralisation, la quantité d'acide sulfurique qui est nécessaire pour l'oxydation varie en fonction du poids initial et de la composition de l'échantillon. Pour l'oxydation des graisses et des protéines, par exemple, il faut deux à trois fois plus d'acide sulfurique que pour les glucides. Le tableau 1 montre des quantités d'acide sulfurique calculées par gramme d'échantillon de divers substrats.

Matériau de l'échantillon	Consommation d'acide sulfurique [g] pour 1 g d'échantillon
Sucre de canne	8,36
Farine de céréales	6,27
Gélatine	17,64
Acide oléique	19,87

Tab. 1 : quantités d'acide pour la minéralisation

La perte par évaporation doit être maintenue aussi faible que possible. À la fin de la minéralisation, il reste idéalement un excès d'acide sulfurique inutilisé. Dans la routine de laboratoire, on choisit, pour simplifier, une quantité standardisée d'acide sulfurique qui est d'environ 20 ml pour un poids net d'échantillon de 1 à 5 g.

Température de minéralisation

Pour la minéralisation selon Kjeldahl, on utilise exclusivement de l'acide sulfurique concentré. Celui-ci bout de manière azéotrope à 338 °C (à 98%). Afin de permettre une transformation plus rapide, on utilise, conformément à la règle de van't Hoff, le fait que l'addition d'un sel de sulfate augmente le point d'ébullition de l'acide sulfurique.

L'augmentation de la température de réaction accélère l'oxydation et par conséquent la transformation en sulfate d'ammonium, selon l'équation d'Arrhénius pour la constante de vitesse k de la réaction de minéralisation. La température de minéralisation T a donc un effet direct sur la constante de vitesse k de la réaction, puisque les deux variables sont associées entre elles par une fonction exponentielle. Une augmentation de la température de 10 °C augmente la vitesse de réaction par un facteur de 2, lorsque l'énergie d'activation $E_A = 60 \text{ kJ / mol}$. Une accélération d'un facteur de 25 résulterait d'une énergie d'activation de $E_A = 250 \text{ kJ / mol}$. Des dépendances typiques pour différentes matrices d'échantillons organiques sont présentées dans la figure 6.



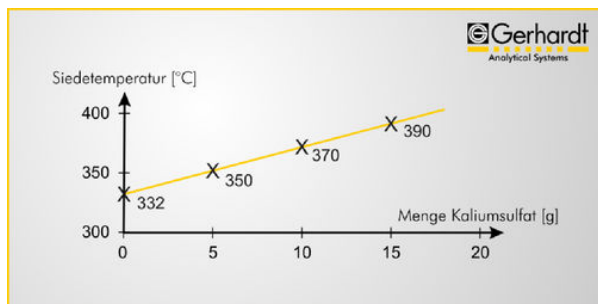


Fig. 6 : dépendances entre température d'ébullition de 20 ml d'acide sulfurique concentré et les quantités de sel de sulfate ajoutées en grammes.

L'addition de 5 g de sulfate de potassium provoque une élévation du point d'ébullition d'environ 20 °C avec 20 ml d'acide sulfurique concentré. Il est d'usage d'ajouter 10 g de sels de sulfate dans cette quantité d'acide sulfurique, ce qui permet d'obtenir une température de minéralisation plus élevée, sans pertes par évaporation significatives. Les conditions standard sont une température de réglage de 400 °C pour la minéralisation simultanée de jusqu'à 20 échantillons dans un récipient de minéralisation de 250 ml. Les sulfures de métaux lourds utilisés autrefois à cet effet ne sont plus utilisés aujourd'hui pour des raisons écologiques, et l'on a accepté une durée légèrement plus longue de minéralisation par des catalyseurs moins dangereux [3]. L'utilisation de mélanges de catalyseurs conditionnés sous forme de comprimés s'avère très pratique. Ceux-ci sont disponibles dans le commerce dans les compositions les plus courantes et l'acide sulfurique concentré dans un rapport de 2 comprimés de 20 ml d'acide.

N° d'article	Composition
12-0328	5,0 g K ₂ SO ₄ + 0,5 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O
12-0329	5,0 g K ₂ SO ₄ + 0,15 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O + 0,15 g TiO ₂

Si, dans le système de minéralisation, on règle la température de consigne à 400 °C, l'acide sulfurique concentré se met en ébullition et génère une ligne de retour / de condensation sur la paroi du verre de minéralisation. Cela a pour effet que des parties d'échantillons éventuellement bouillies sont relavées et qu'après environ 1 à 2 heures de temps de réaction, la minéralisation est terminée, ce qui est

reconnaisable à la couleur verte de la solution de minéralisation, en raison des sels de cuivre (figure 7).

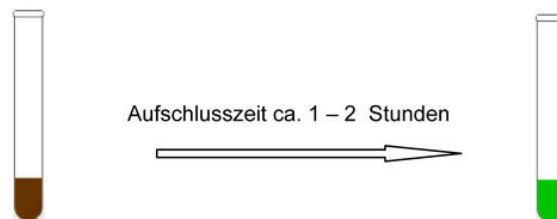
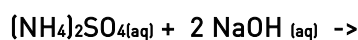


Fig. 7 : changement de couleur de la solution de minéralisation, passant du brun au vert, en raison de l'utilisation de sels de cuivre pour la minéralisation acide selon Kjeldahl

La distillation de la solution minéralisée

Pour poursuivre la détermination de l'azote, on libère d'abord une quantité d'ammoniac de la solution de minéralisation d'acide sulfurique en ajoutant une solution concentrée de soude caustique (NaOH à 33%) et on le distille pour le séparer de cette solution.



Ces distillations étaient réalisées, de manière classique, avec des appareils à brûleur à gaz (Fig. 3). Le brûleur à gaz chauffe le récipient Erlenmeyer et le distillat est transféré dans le récipient de récupération (plus bas, derrière le radiateur) via le pont de Claisen. Avant la distillation, on devait créer avec une grande prudence une sous-couche de lessive de soude concentrée sous la solution de minéralisation à l'acide sulfurique et ajouter de l'eau pour la dilution. Alors seulement, le chauffage pour la distillation pouvait être démarré, les trois liquides, acide sulfurique, soude et eau formant alors un mélange assez impressionnant, dans une réaction fortement exothermique. Le distillat est recueilli dans une fiole d'Erlenmeyer remplie d'environ 70 ml d'acide borique, à l'arrière de l'appareil, et ensuite titré avec de l'acide en tant que solution étalon.



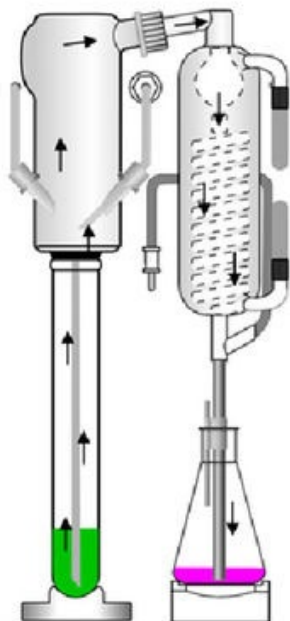
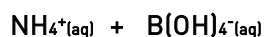
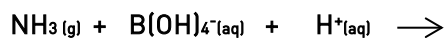


Fig. 8 : Distillation à la vapeur d'eau avec VAPODEST de C. Gerhardt.

L'étape de distillation peut être raccourcie à moins de quatre minutes en utilisant de la vapeur d'eau comme support (Fig. 8).

Après addition d'une solution d'hydroxyde de sodium, la vapeur introduite extrait la composante volatile ammoniac de la solution de minéralisation (verte) et transporte l'ammoniac, via la tête de distribution et le réfrigérant, dans la solution de récupération contenant de l'acide borique (rose). L'ammoniac et l'acide borique réagissent alors de manière stoechiométrique pour former du borate d'ammonium, ce qui empêche la fuite de l'ammoniac. On titre finalement l'excès d'acide borique avec une base et on peut donc tirer des conclusions quantitatives sur la teneur en azote dans l'échantillon original.

Récupération de l'ammoniac dans l'acide borique :



Calcul de la teneur en azote

À partir de la consommation de solution étalon (H^+) lors du titrage de l'excès d'acide borique, on obtient par simple conversion la teneur d'azote de l'échantillon initial, en pourcentage.

On utilise pour cela l'équation suivante :

$$\% \text{ N} = (\text{C}_{\text{eq}} * (\text{V} - \text{V}_{\text{BL}}) * \text{M} * 100 \%) / \text{E}$$

dans laquelle :

C_{eq} concentration équivalente de solution étalon [mol/l]

V consommation solution étalon échantillon [l]

V_{BL} consommation solution étalon pour blanc [l]

M masse molaire azote [g/mol]

E poids net de l'échantillon [g]

La figure suivante montre un résumé d'un système complet pour l'analyse de l'azote selon la méthode Kjeldahl :



Fig. 9 : système complet pour l'analyse de l'azote selon Kjeldahl, constitué d'un système de minéralisation 20 emplacements KT-L20 (milieu) avec épurateur de gaz TURBOSOG (à droite) et unité de distillation à la vapeur d'eau VAPODEST 500 avec titrage implémenté (à gauche).

Résumé

L'analyse de l'azote / des protéines par la méthode de Kjeldahl se présente comme un procédé d'analyse complexe, car comprenant plusieurs étapes. Elle est utilisée pour la détermination des protéines dans l'alimentation humaine et animale et elle est universellement applicable en raison de son poids initial élevé. Elle s'est imposée au fil des ans comme la méthode de référence dans l'analyse alimentaire. Malgré l'arrivée en force de méthodes alternatives, comme p. ex. l'analyse par combustion selon Dumas également évoquée,



l'analyse selon Kjeldahl domine jusqu'à aujourd'hui. Et ce, non seulement en raison de sa grande flexibilité et de son applicabilité universelle pour les échantillons non homogènes, mais aussi en raison de sa grande précision et de sa grande fiabilité.

C. GERHARDT GMBH & CO. KG

Cäsariusstraße 97
53639 Königswinter
GERMANY

+49 2223 2999 – 0

info@gerhardt.de

www.gerhardt.de

[1] Zeitschrift für Analytische Chemie, Herausgeber Dr. C. Remigius Fresenius. 22. année, éditions C.W. Kreidels Verlag 1883. p. 366-382, J. Kjeldahl « Nouvelle méthode de détermination de l'azote dans les corps organiques ».

[2] Illustration du catalogue C. Gerhardt de l'année 1914.

[3] Dr. H. Hadorn, Ch. Obrist, Systematische Versuche mit verschiedenen Katalysatoren für den Kjeldahl-Aufschluß, Deutsche Lebensmittel Rundschau, Heft 3, 1973 S. 109/114.

