

Compendio C. Gerhardt

ANÁLISIS DE NITRÓGENO

EL MÉTODO DE JOHAN KJELDAHL

Evolución histórica

Desde el punto de vista histórico, los métodos de análisis oficiales para la determinación de nitrógeno son antiguos. Johan Kjeldahl (fig.1) publicó en el año 1883 su "Nuevo método para determinar nitrógeno en compuestos orgánicos" y con él revolucionó el análisis de nitrógeno [1]. La versatilidad de este método y la fácil ejecución del análisis con una precisión elevada lo han convertido en modelo de referencia en el sector alimentario y de piensos. En el análisis de suelos, del agua y allí donde deba determinarse el nitrógeno, este método sigue teniendo la misma importancia que antes.

Mientras Johan Kjeldahl buscaba con ahínco el contenido de proteínas del mosto de cerveza en el laboratorio de la cervecería danesa Carlsberg, Jean Dumas se interesaba en París por el análisis de combustión de sustancias naturales para determinar el contenido de carbono y de hidrógeno. Los dos investigadores partieron de una idea común: una muestra debe digerirse completamente para poder extraer y determinar como magnitud el nitrógeno contenido en ellas. Kjeldahl efectuó esta digestión con ácido sulfúrico muy concentrado, mientras que Jean Dumas quemó la muestra con oxígeno puro. Aunque al principio las dos ideas básicas parecían ser fáciles y lógicamente consecuentes, su puesta en práctica en el laboratorio tuvo muchas fases críticas y requirió de mucha atención por parte del personal cualificado del laboratorio.

Pasos del análisis del método Kjeldahl

El análisis se compone principalmente de los siguientes pasos de trabajo:

- Digestión de muestras con ácido sulfúrico
- Destilación de la solución de digestión con vapor de agua
- Valoración del destilado y cálculo del resultado



Fig. 1: Johan Kjeldahl

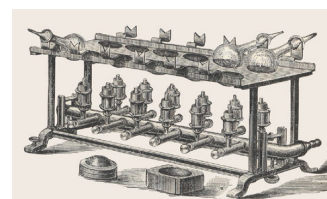


Fig. 2: Aparato de digestión clásico según el método de J. Kjeldahl con quemadores de gas y matraces de fondo redondo de cuello largo Kjeldahl inclinados [2]

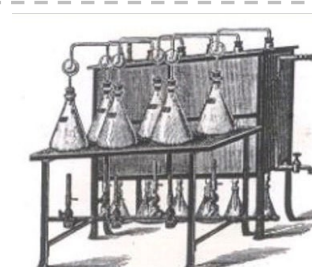
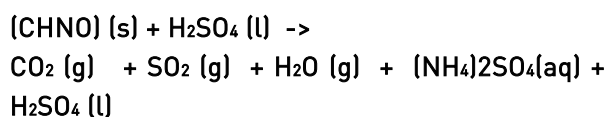


Fig. 3: Aparato con quemadores de gas para la destilación de soluciones de digestión



La digestión ácida

La digestión conforme al método Kjeldahl se basa en el principio de que la muestra se destruye por oxidación con ácido sulfúrico concentrado en ebullición. El nitrógeno se separa sin pérdidas de su matriz de enlace y se transforma completamente en nitrógeno amoniacal inorgánico (NH_4^{+-}N). Una vez finalizada la reacción de digestión, todo el nitrógeno de la muestra debe haberse convertido en nitrógeno amoniacal.



Desde el punto de vista técnico esto solo puede llevarse a cabo en matraces de fondo redondo lo suficientemente grandes y con calentadores de gas potentes. La figura 2 muestra un aparato de digestión clásico de 6 posiciones con quemadores de gas: el primer intento de ejecución en serie de la digestión ácida. Este tipo de digestión en ácido sulfúrico en ebullición duraba aprox. 3 - 5 horas y era adecuada para cantidades de muestras de hasta 10 g; lo que se dice un procedimiento de aplicación universal.

Hoy en día se utilizan sistemas de digestión en bloque o de infrarrojos que cumplen los requisitos de seguridad en el laboratorio acordes con los tiempos. La transmisión de calor no se realiza directamente mediante la llama abierta del quemador de gas, sino a través de los elementos calefactores de fundición o de la radiación infrarroja sin contacto. El ácido sulfúrico en ebullición debería condensarse casi completamente en las paredes del tubo, independientemente de la fuente de calor, y retornar a la solución de digestión. La figura 4 muestra la situación idealizada con la solución de digestión (verde), los vapores ácidos de condensación y un sistema de extracción añadido

para los gases corrosivos resultantes de la digestión.

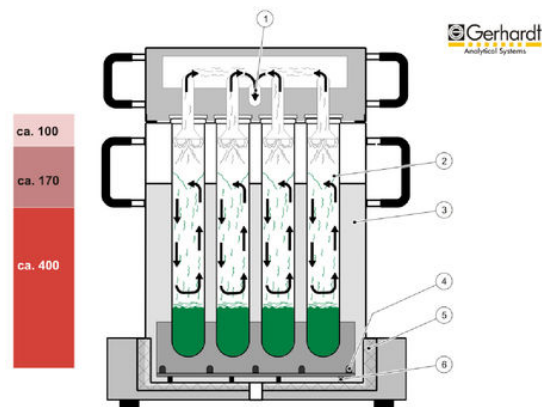


Fig. 4: Aparato de digestión moderno según el método Kjeldahl con elementos calefactores de fundición dispuestos en bloque, poniendo como ejemplo el modelo KJELDATHERM 20 de C. Gerhardt.

A la izquierda en rojo: perfil de temperatura en el tubo de digestión

1-Aspiración, 2-Línea de reflujo y zona de condensación, 3-Gradilla, 4-Elemento de calefacción tubular, 5+6 Aislamiento

Para evitar el escape de gases corrosivos en el aire del laboratorio, el aparato de digestión suele estar unido a un potente lavador de gases. El lavador condensa los gases ácidos emitidos y, en el segundo nivel, neutraliza los gases ácidos aún existentes con solución alcalina.

La figura 5 muestra un lavador de gases con una botella de lavado para la condensación y otra para la neutralización de vapores ácidos y con una potente bomba centrífuga para generar una ligera presión negativa ajustable.



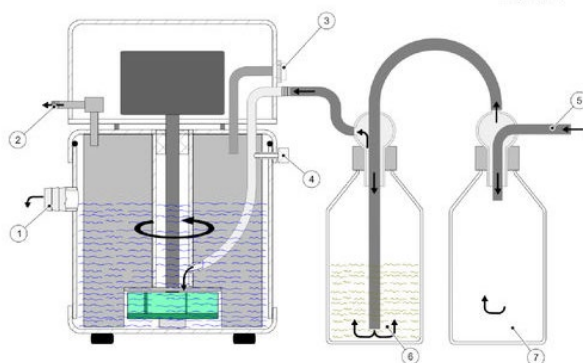


Fig. 5: Lavador de gases TURBOSOG de C. Gerhardt para aspirar y neutralizar vapores ácidos.

1-Salida de agua, 2-Salida de gas, 3-Entrada de agua, 4-Regulación del efecto de aspiración, 5-Entrada de gases de digestión, 6-Botella de neutralización con potasa cáustica, 7-Botella de condensación

Cantidad de ácido para la digestión

La cantidad de ácido sulfúrico viene determinada por tres factores:

- Consumo para la oxidación de la matriz de muestra orgánica
- Pérdidas por volatilización durante el proceso de ebullición
- Conversión de sulfato de potasio a sulfato ácido de potasio

Mientras que los dos últimos factores son constantes con las mismas condiciones de digestión, la cantidad de ácido sulfúrico necesaria para la oxidación depende del peso y de la composición de la muestra. En la oxidación de grasa y proteínas se consume por ejemplo entre el doble y el triple más de ácido sulfúrico que en la de hidratos de carbono. La tabla 1 muestra las cantidades calculadas de ácido sulfúrico por cada gramo de muestra con sustratos diferentes.

Material de la muestra	Consumo de ácido sulfúrico [g] por 1 g de muestra
Azúcar de caña	8,36
Harina de cereales	6,27
Gelatina	17,64
Ácido oleico	19,87

Tab. 1: Cantidades de ácido para la digestión

La pérdida por volatilización debería mantenerse tan baja como sea posible. Al final de la digestión lo ideal es que se presente un exceso de ácido sulfúrico sin consumir.

Para facilitar el procedimiento en la rutina del laboratorio, se elige una cantidad estándar de ácido sulfúrico de aprox. 20 ml en el caso de un peso de muestra entre 1 - 5 g.

Temperatura de digestión

Para la digestión según el método Kjeldahl se utiliza exclusivamente ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla azeotrópica ebulle a 338 °C (98 %). Para permitir la conversión más rápida, según la regla de van't Hoff, se añade sal de sulfato para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico.

El aumento de la temperatura de reacción acelera la oxidación y, al mismo tiempo, la conversión a sulfato de amonio conforme a la llamada ecuación de Arrhenius para la constante de velocidad k de la reacción de digestión. La temperatura de digestión T tiene por lo tanto influencia directa sobre la constante de velocidad k de la reacción, ya que ambas variables están enlazadas mediante una función exponencial. Un aumento de temperatura de 10 °C aumenta la velocidad de reacción al factor 2, si la energía de activación es $E_A = 60$ kJ/mol. Una aceleración al factor 25 resultaría en una energía de activación $E_A = 250$ kJ/mol. En la figura 6 se representan dependencias típicas para diversas matrices de muestra orgánicas.



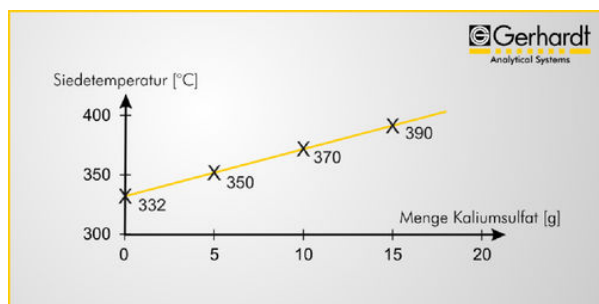


Fig. 6: Dependencias entre la temperatura de ebullición de 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y las cantidades de sal de sulfato añadidas en gramos.

Si se añaden 5 g de sulfato de potasio, resulta un aumento del punto de ebullición de aprox. 20 °C con 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Lo usual es la adición de 10 g de sales de sulfato con esta cantidad de ácido sulfúrico, lo que permite una temperatura de digestión más elevada sin grandes pérdidas de solución por evaporación. Las condiciones estándar son una temperatura de referencia de 400 °C para la digestión simultánea de hasta 20 muestras en un tubo de digestión de 250 ml. Los sulfatos de metal pesado utilizados antiguamente ya no se utilizan por motivos ecológicos; más bien se ha aceptado un tiempo de digestión algo mayor mediante el uso de catalizadores inofensivos [3]. Se ha comprobado que el uso más práctico es el de mezclas catalíticas condicionadas en forma de tabletas. Estas se comercializan en composiciones corrientes y se añaden al ácido sulfúrico concentrado en una proporción de 2 tabletas por cada 20 ml de ácido.

N.º art.	Composición
12-0328	5,0 g K_2SO_4 + 0,5 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$
12-0329	5,0 g K_2SO_4 + 0,15 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$ + 0,15 g TiO_2

Si en el sistema de digestión se ajusta una temperatura nominal de 400 °C, el ácido sulfúrico concentrado ebulle y genera una línea de reflujo/línea de condensación en la pared del tubo de digestión. Esto provoca que vuelvan a lavarse las partes de la muestra que llegan a ebullición y que, tras aprox. 1 - 2 horas de tiempo de reacción, se acabe la digestión, lo que puede comprobarse

en la solución de digestión verde debido a las sales de cobre (figura 7).

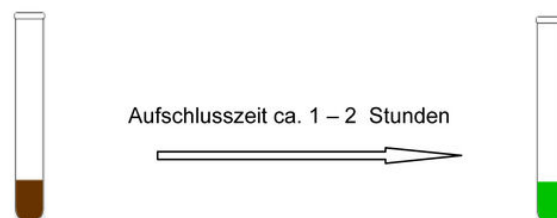
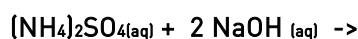


Fig. 7: Cambio de color de la solución de digestión de marrón a verde con el uso de sales de cobre en la digestión ácida según el método Kjeldahl

La destilación de la solución de digestión

Para la determinación del nitrógeno, primero se libera amoníaco de la solución de digestión de ácido sulfúrico mediante la adición de solución alcalina concentrada (33 % NaOH) y este se destila de la solución.



Aplicando el método clásico, estas destilaciones se efectuaban con aparatos con quemadores de gas (fig. 3). El quemador de gas calienta el recipiente Erlenmeyer y el destilado se conduce mediante el puente Claisen hasta el recipiente colector (situado más profundo, detrás del radiador). Antes de la destilación tenía que inyectarse con mucho cuidado solución alcalina concentrada en la solución de digestión de ácido sulfúrico y añadirse agua para diluirla. Es entonces cuando se podía iniciar el calentamiento para la destilación, donde los tres líquidos (ácido sulfúrico, solución alcalina y agua) se mezclaban en una reacción exotérmica fuerte. El destilado se recoge en una matraz Erlenmeyer llena con aprox. 70 ml de ácido bórico ubicada en la parte posterior del aparato y después se valora con ácido como disolución valorante.



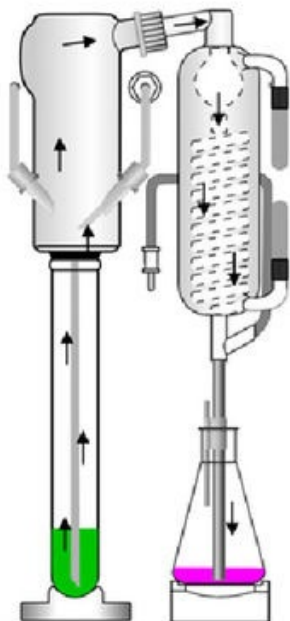
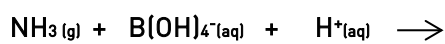


Fig. 8: Destilación por arrastre de vapor con VAPODEST de C. Gerhardt.

El paso de destilación puede acortarse a menos de cuatro minutos usando vapor de agua como elemento de arrastre (fig. 8). Tras añadir solución alcalina, el vapor de agua extrae el componente volátil amoniacado de la solución de digestión (verde) y transporta el amoniacado a través del cabezal de distribución y del condensador de tubo en espiral hasta la solución colectora con ácido bórico (rosa). El amoniacado y el ácido bórico reaccionan aquí de forma estequiométrica al borato de amonio, lo que evita que se escape el amoniacado. Al final se valora el ácido bórico sobrante con solución alcalina y pueden sacarse conclusiones cuantitativas del contenido de nitrógeno en la muestra inicial.

Captura de amoniacado en ácido bórico:



Cálculo del contenido de nitrógeno



Del consumo de disolución valorante (H^+) durante la valoración del ácido bórico sobrante resulta con un cálculo sencillo el contenido porcentual de nitrógeno de la muestra inicial.

Aquí se aplica la siguiente ecuación:

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

donde:

C_{eq} Concentración equivalente de la disolución valorante [mol/l]

V Consumo disolución valorante muestra [l]

V_{BL} Consumo disolución valorante con valor del blanco [l]

M Peso molar nitrógeno [g/mol]

E Peso de la muestra [g]

La siguiente figura muestra un resumen de un sistema completo para el análisis de nitrógeno según el método Kjeldahl:



Fig. 9: Sistema completo para el análisis de nitrógeno según el método Kjeldahl compuesto por sistema de digestión KT-L20 de 20 posiciones (centro) con lavador de gases TURBOSOG (derecha) y unidad de destilación por arrastre de vapor VAPODEST 500 con valoración implementada (izquierda).

Resumen

El análisis de nitrógeno/proteínas según el método Kjeldahl se presenta como un método de análisis complejo de varias etapas. Este sirve para la determinación de proteínas en alimentos y piensos y es de aplicación universal gracias a que acepta pesos elevados de las muestras. A lo largo de los años se ha ido implantando como método de referencia en el análisis de alimentos. A pesar de los numerosos métodos alternativos existentes hoy en día como, p. ej., el ya mencionado análisis de combustión de Dumas, el análisis

Kjeldahl sigue ocupando una posición dominante. Esto no solo se debe a su gran flexibilidad y aplicación universal con material de muestra con baja homogeneidad, sino también a su elevada precisión y fiabilidad.

[1] Zeitschrift für Analytische Chemie, revista editada por el Dr. C. Remigius Fresenius. año 22 , C.W. Kreidels Verlag 1883. Pág. 366-382 J. Kjeldahl "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern".

[2] Foto del catálogo de C. Gerhardt del año 1914.

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

C. Gerhardt GmbH & Co KG

Cäsariusstraße 97
53639 Königswinter
ALEMANIA

+49 2223 2999 – 0

info@gerhardt.de

www.gerhardt.de

