

C. Gerhardt Kompendium

STICKSTOFFANALYSE

DIE METHODE VON JOHAN KJELDAHL

Historische Entwicklung

Historisch betrachtet sind die amtlichen Analysenmethoden zur Stickstoffbestimmung bereits "alt". Johan Kjeldahl (Abb.1) veröffentlichte seine "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffes in organischen Körpern" im Jahre 1883 und revolutionierte damit die Stickstoffanalytik [1]. Die Vielseitigkeit der Methode und die einfache Durchführung der Analyse bei hoher Genauigkeit haben die Methode zur Referenz im Lebens- und Futtermittelsektor werden lassen. Auch in der Boden- und Wasseranalytik und überall dort, wo gebundener Stickstoff zu bestimmen ist, hat die Methode nach wie vor eine große Bedeutung.

Während Johan Kjeldahl im Labor der dänischen Carlsberg Brauerei dezidiert nach dem Proteingehalt in Bierwürze suchte, interessierte sich Jean Dumas in Paris für die Verbrennungsanalyse von Naturstoffen auf Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt. Beide Forscher gingen dabei von einer gemeinsamen Grundidee aus: Eine Probe muss vollkommen aufgeschlossen werden, damit der Stickstoff als Messgröße aus den Proben extrahiert und determinierbar wird. Diesen Aufschluss bewerkstelligte Kjeldahl mit hochkonzentrierter Schwefelsäure, während Jean Dumas die Probe mit reinem Sauerstoff verbrannte. Obwohl beide Grundideen zunächst einfach und logisch konsequent erscheinen, beinhaltete die Umsetzung in die Laborpraxis viele kritische Phasen und viel Aufmerksamkeit von geschultem Laborpersonal.

Analysenschritte der Kjeldahl-Methode

Die Analyse besteht im wesentlichen aus folgenden Arbeitsschritten:

- Aufschluss der Proben mit Schwefelsäure
- Destillation der Aufschlusslösung mit Wasserdampf
- Titration des Destillates und Ergebnisberechnung



Abb. 1: Johan Kjeldahl

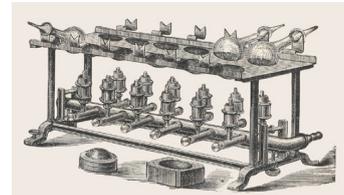


Abb. 2: Klassische Aufschlussapparatur nach J. Kjeldahl mit Gasbrennern und schrägliegenden Kjeldahl-Weithalsrundkolben [2]

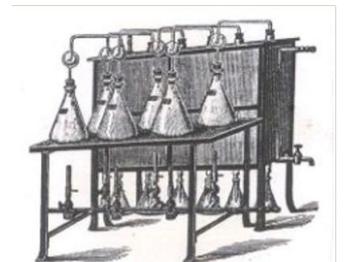
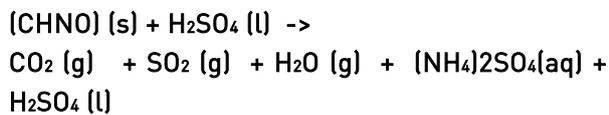


Abb. 3: Gasbrennerapparatur zur Destillation von Aufschlusslösungen



Der Säureaufschluss

Dem Aufschluss nach Kjeldahl liegt das Prinzip zugrunde, dass die Probe mit konzentrierter, siedender Schwefelsäure oxydativ zerstört wird. Der gebundene Stickstoff wird verlustfrei aus seiner Bindungsmatrix herausgelöst und vollständig in anorganischen Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) überführt. Nach Ende der Aufschlussreaktion soll der gesamte Probenstickstoff als Ammoniumstickstoff vorliegen.



Technisch durchführbar ist dies nur in entsprechend großen Rundkolben und mit leistungsfähigen Gasheizern. Abbildung 2 zeigt eine klassische, bereits 6stellige Aufschlussapparatur mit Gasbrennern - ein erster Versuch zur Serienabarbeitung des Säureaufschlusses. Ein derartiger Aufschluss in siedender Schwefelsäure dauerte ca. 3 - 5 Stunden und war für Probenmengen von bis zu 10 g geeignet - also ein sehr universell einsetzbares Verfahren.

Heute werden dazu Block- bzw. Infrarotaufschlussysteme verwendet, die zeitgemäßen Sicherheitsansprüchen im Labor genügen. Die Wärmeübertragung erfolgt nicht mehr direkt über die offene Flamme des Gasbrenners, sondern durch Gussheizkörper bzw. berührungsfreie Infrarotstrahlung. Die siedende Schwefelsäure sollte hierbei unabhängig von der Hitzequelle an den Glaswänden nahezu vollständig kondensieren und in die Aufschlusslösung zurücklaufen. Abbildung 4 zeigt die idealisierte Situation mit Aufschlusslösung (grün), kondensierenden Säuredämpfen und einer aufgesetzten Absaugkassette für die korrosiven Aufschlussgase.

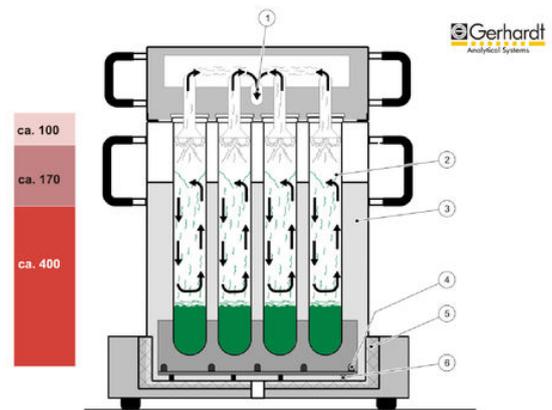


Abb. 4: Moderne Aufschlussapparatur nach Kjeldahl mit Gussheizkörpern in Blockanordnung am Beispiel des Modells KJELDATHERM von C. Gerhardt.

Links in Rot: der Temperaturverlauf im Aufschlussglas
1-Absaugung, 2-Rückflusslinie und Kondensationszone,
3-Einsatzgestell, 4-Rohrheizkörper, 5+6 Isolation

Um den Austritt korrosiver Gase in die Laborluft zu vermeiden, wird die Aufschlussapparatur in der Regel mit einem leistungsfähigen Gaswäscher verbunden. Dieser kondensiert die austretenden Säuregase und neutralisiert in der zweiten Stufe die noch vorhandenen Säuregase mit Natronlauge.

Abbildung 5 zeigt einen derartigen Gaswäscher mit je einer Waschflasche für Kondensation und Neutralisation der Säuredämpfe sowie einer leistungsfähigen Kreiselpumpe zur Erzeugung eines einstellbaren, leichten Unterdrucks.

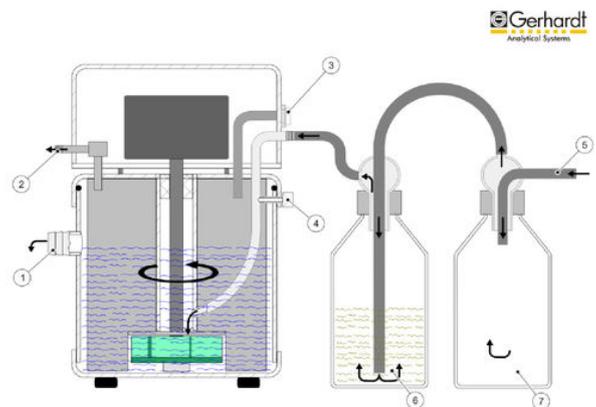


Abb. 5: C. Gerhardt Gaswäscher TURBOSOG zur Absaugung und Neutralisation der Säuredämpfe.

1-Wasserablauf, 2-Gasaustritt, 3-Wassereingang, 4-Regulierung Saugwirkung, 5-Eingang Aufschlussgase, 6-Neutralisationsflasche mit Kalilauge, 7-Kondensationsflasche



Säuremenge für den Aufschluss

Die Schwefelsäuremenge wird von drei Faktoren bestimmt:

- Verbrauch zur Oxidation der organischen Probenmatrix
- Verdampfungsverluste während des Kochprozesses
- Umsetzung von Kaliumsulfat zu Kaliumhydrogensulfat

Während die beiden letzten Faktoren bei gleichen Aufschlussbedingungen konstant sind, ist die Schwefelsäuremenge, die zur Oxidation benötigt wird, von der Einwaage und von der Zusammensetzung der Probe abhängig. Zur Oxidation von Fett und Eiweiß wird beispielsweise zwei- bis dreimal so viel Schwefelsäure verbraucht wie für Kohlenhydrate. Tabelle 1 zeigt berechnete Schwefelsäuremengen pro Gramm Probe bei verschiedenen Substraten.

Probenmaterial	Schwefelsäureverbrauch [g] pro 1 g Probe
Rohrzucker	8,36
Getreidemehl	6,27
Gelatine	17,64
Ölsäure	19,87

Tab. 1: Säuremengen für den Aufschluss

Der Verlust durch Verdampfung sollte so gering wie möglich gehalten werden. Am Ende des Aufschlusses liegt idealerweise noch ein Überschuss an unverbrauchter Schwefelsäure vor.

In der Laborroutine wählt man zur Vereinfachung eine standardisierte Menge an Schwefelsäure, die bei 1 - 5 g Probeneinwaage ca. 20 ml beträgt.

Aufschlusstemperatur

Für den Aufschluss nach Kjeldahl wird ausschließlich konzentrierte Schwefelsäure verwendet. Diese siedet azeotrop bei 338 °C (98 %ig). Um eine schnellere Umsetzung zu ermöglichen nutzt man

gemäß der Regel von van't Hoff, dass der Zusatz eines Sulfatsalzes den Siedepunkt der Schwefelsäure erhöht.

Die Erhöhung der Reaktionstemperatur beschleunigt die Oxidation und damit die Umsetzung zu Ammoniumsulfat gemäß der sog. Arrhenius-Gleichung für die Geschwindigkeitskonstante k der Aufschlussreaktion. Die Aufschlusstemperatur T nimmt demnach direkten Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante k der Reaktion, da beide Variablen durch eine Exponentialfunktion miteinander verknüpft sind. Eine Temperaturerhöhung um 10 °C erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2, wenn die Aktivierungsenergie $E_A = 60$ kJ/mol beträgt. Eine Beschleunigung um den Faktor 25 würde bei einer Aktivierungsenergie von $E_A = 250$ kJ/mol resultieren. Typische Abhängigkeiten für unterschiedliche organische Probenmatrices sind in Abbildung 6 dargestellt.

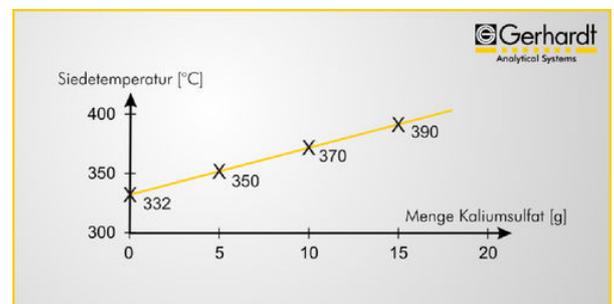


Abb. 6: Abhängigkeiten zwischen Siedetemperatur von 20 ml konzentrierter Schwefelsäure und den Mengen an zugesetztem Sulfatsalz in Gramm.

Bei Zusatz von 5 g Kaliumsulfat ergibt sich eine Siedepunkterhöhung von ca. 20 °C bei 20 ml konzentrierter Schwefelsäure. Üblich ist der Zusatz von 10 g Sulfatsalzen bei dieser Menge an Schwefelsäure, was eine höhere Aufschlusstemperatur ohne größere Abdampfverluste ermöglicht. Standardbedingungen sind 400 °C Einstelltemperatur für den simultanen Aufschluss von bis zu 20 Proben in einem 250 ml Aufschlussgefäß. Die früher dazu verwendeten Schwermetallsulfate werden heute aus ökologischen Gesichtspunkten nicht mehr verwendet, vielmehr hat man eine etwas längere Aufschlusszeit durch die ungefährlicheren



Katalysatoren akzeptiert [3]. Als praktisch hat sich die Verwendung von konditionierten Katalysatorgemischen in Tablettenform herausgestellt. Diese werden in den gebräuchlichsten Zusammensetzungen kommerziell angeboten und der konzentrierten Schwefelsäure im Mengenverhältnis 2 Tabletten auf 20 ml Säure zugesetzt.

Artikelnr.	Zusammensetzung
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

Stellt man im Aufschlusssystem 400 °C Solltemperatur ein, so siedet die konzentrierte Schwefelsäure und erzeugt eine Rückflusslinie/ Kondensationslinie an der Wand des Aufschlussglases. Diese bewirkt, dass eventuell aufgekochte Proben- teile wieder zurückgewaschen werden und nach ca. 1 - 2 Stunden Reaktionszeit der Aufschluss beendet ist, erkennbar an der grünen Aufschluslösung aufgrund der Kupfersalze (Abbildung 7).

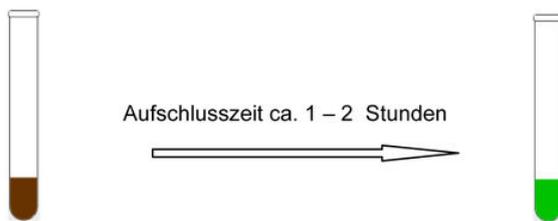
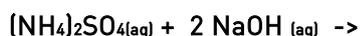


Abb. 7: Farbwechsel der Aufschluslösung von braun nach grün bei Verwendung von Kupfersalzen beim Säureaufschluss nach Kjeldahl

Die Destillation der Aufschluslösung

Zur weiteren Bestimmung des Stickstoffs wird aus der schwefelsauren Aufschluslösung durch Zusatz von konzentrierter Lauge (33 %ige NaOH) zunächst quantitativ Ammoniak freigesetzt und aus dieser Lösung abdestilliert.



Klassisch wurden derartige Destillationen mit Gasbrennerapparaturen bewerkstelligt (Abb. 3).



Der Gasbrenner erhitzt das Erlenmeyer-Gefäß und über die Claisen-Brücke wird das Destillat in das Auffanggefäß (tieferstehend, hinter dem Kühler) überführt. Vor der Destillation musste man die schwefelsaure Aufschluslösung sehr vorsichtig mit konzentrierter Natronlauge unterschichten und noch Wasser zur Verdünnung zusetzen. Dann erst konnte das Aufheizen für die Destillation gestartet werden, wodurch sich die drei Flüssigkeiten Schwefelsäure, Lauge und Wasser in einer stark exothermen Reaktion zum Teil eindrucksvoll vermischen. Das Destillat wird in einen mit ca. 70 ml Borsäure gefüllten Erlenmeyer-Kolben auf der Rückseite der Apparatur aufgefangen und später mit Säure als Maßlösung titriert.

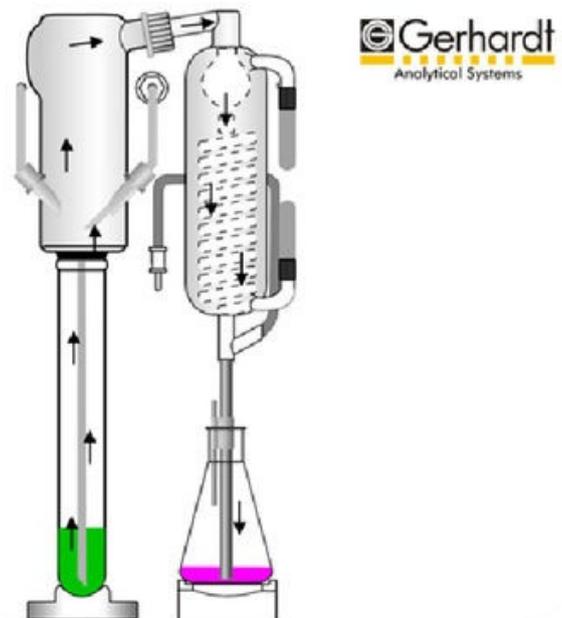


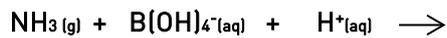
Abb. 8: Wasserdampfdestillation mit VAPODEST von C. Gerhardt.

Der Destillationsschritt kann unter Verwendung von Wasserdampf als Mitnehmer auf unter vier Minuten verkürzt werden (Abb. 8).

Nach Zugabe von Natronlauge extrahiert eingeleiteter Wasserdampf die leichtflüchtige Komponente Ammoniak aus der Aufschluslösung (grün) und transportiert den Ammoniak über Verteilerkopf und Schlangenkühler in die Auffanglösung mit Borsäure (pink). Hier reagieren Ammoniak und Borsäure stöchiometrisch zu Ammoniumborat, was ein Entweichen des Ammoniaks

verhindert. Am Ende titriert man überschüssige Borsäure mit Lauge und kann damit quantitative Rückschlüsse auf den Stickstoffgehalt in der ursprünglichen Probe ziehen.

Auffangen des Ammoniaks in Borsäure:



Berechnung des Stickstoffgehaltes

Aus dem Verbrauch an Maßlösung (H^+) bei der Titration der überschüssigen Borsäure ergibt sich durch einfache Umrechnung der prozentuale Stickstoffgehalt der Ausgangsprobe.

Hierzu findet folgende Gleichung Verwendung:

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

wobei:

c_{eq} Äquivalentkonzentration der Maßlösung [mol/l]

V Verbrauch Maßlösung Probe [l]

V_{BL} Verbrauch Maßlösung bei Blindwert [l]

M Molare Masse Stickstoff [g/mol]

E Einwaage der Probe [g]

Die folgende Abbildung zeigt zusammenfassend ein Komplettsystem für die Stickstoffanalyse nach Kjeldahl:



Abb. 9: Komplettsystem zur Stickstoffanalyse nach Kjeldahl, bestehend aus 20fachem Aufschlusssystem KT-L20 (Mitte) mit Gaswäscher TURBOSOG (rechts) und Wasserdampfdestillations-einheit VAPODEST 500 mit implementierter Titration (links).

Zusammenfassung

Die Stickstoff-/Proteinanalyse nach Kjeldahl stellt sich als eine komplexe, da mehrstufige Analysenmethode dar. Sie dient der Proteinbestimmung in Lebensmitteln und Futtermitteln und ist durch ihre hohe Einwaage universell einsetzbar. Sie hat sich über die Jahre als Referenzmethode in der Lebensmittelanalytik durchgesetzt.

Trotz heute verstärkt aufkommender alternativer Methoden, wie z.B. der auch erwähnten Verbrennungsanalyse nach Dumas, ist die Kjeldahlanalyse bis heute dominierend. Und das nicht nur wegen ihrer großen Flexibilität und universellen Einsetzbarkeit bei inhomogenem Probenmaterial, sondern auch wegen ihrer allseits hohen Präzision und Verlässlichkeit.

[1] Zeitschrift für Analytische Chemie, Herausgeber Dr. C. Remigius Fresenius. 22. Jhrg., C.W. Kreidels Verlag 1883. S.366-382 J. Kjeldahl, "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern".

[2] Abbildung aus dem Katalog von C. Gerhardt aus dem Jahre 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.

C. GERHARDT GMBH & CO. KG

Cäsariusstraße 97
53639 Königswinter
GERMANY

+49 2223 2999 – 0

info@gerhardt.de

www.gerhardt.de

