

Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung

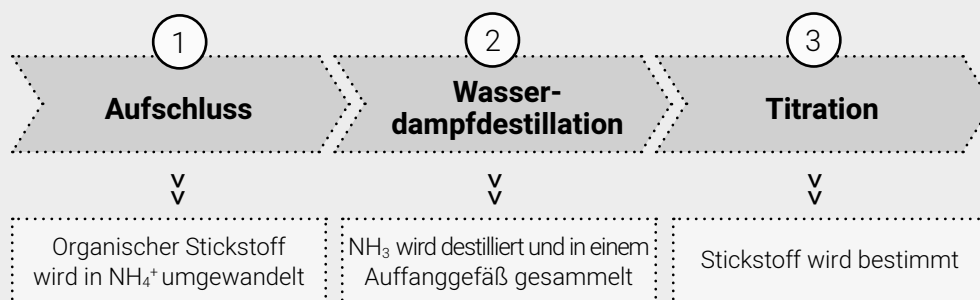


Mit der Kjeldahl-Methode wird der Stickstoffgehalt in organischen und anorganischen Proben bestimmt.

Seit mehr als 100 Jahren wird die Kjeldahl-Methode zur Stickstoffbestimmung in einer Vielzahl von Proben angewendet. Die Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung erfolgt in Lebensmitteln und Getränken, Fleisch, Getreide und Futtermitteln zur Berechnung des Proteingehalts. Die Kjeldahl-Methode wird auch zur Stickstoffbestimmung in Abwässern, Böden und anderen Proben eingesetzt.

Es ist ein offizielles Verfahren und wird in verschiedenen Normen wie **AOAC, USEPA, ISO, DIN, Pharmakopöen und verschiedenen europäischen Richtlinien beschrieben.***

Die Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung umfasst drei Hauptschritte:



Was sind die Grenzen der Kjeldahl-Methode? Mit dieser Methode wird nur der an organische Komponenten (Proteine, Aminosäuren, Nukleinsäuren) gebundene Stickstoff und Ammonium in der Probe gemessen.

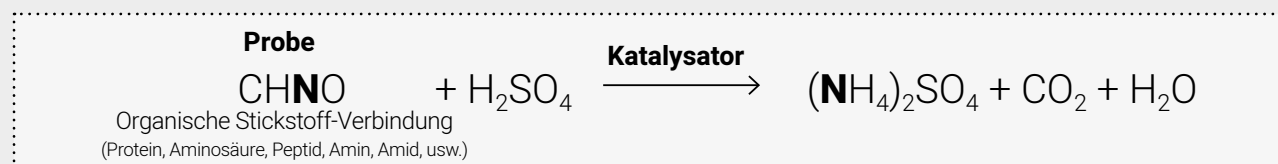
Diese Methode ist nicht geeignet für Verbindungen, die Stickstoff in Azo- und Nitrogruppen oder in Ringen enthalten (Chinolin, Pyridin, Nitrat, Nitrit usw.).

1. Aufschluss

Das Ziel des Aufschlussverfahrens ist es, alle Stickstoffbindungen in der Probe aufzubrechen und den gesamten organisch gebundenen Stickstoff in **Ammoniumionen (NH₄⁺)** umzuwandeln.

Organischer Kohlenstoff und Wasserstoff werden als Kohlendioxid und Wasser freigesetzt. In diesem Prozess verkohlt das organische Material der Probe durch die Schwefelsäure unter Bildung eines schwarzen Schaumes. Die Zersetzung der Probe ist komplett, wenn das schwarze Medium klar und farblos geworden ist. Zu diesem Zweck wird die Probe bei Temperaturen zwischen **350 und 380 °C** mit **Schwefelsäure** vermischt. Je höher die verwendete Temperatur, desto schneller kann der Aufschluss erfolgen. Die Geschwindigkeit des Aufschlusses kann durch die Zugabe von Sulfatsalz und Katalysatoren stark verbessert werden. **Kaliumsulfat** wird zugegeben, um den Siedepunkt der Schwefelsäure zu erhöhen und **Katalysatoren** werden zugegeben, um die Geschwindigkeit und Effizienz des Aufschlussverfahrens zu erhöhen.

Oxidationsmittel können hinzugefügt werden, um die Geschwindigkeit weiter zu verbessern.



Nach Beendigung des Aufschlusses wird die Probe auf Raumtemperatur heruntergekühlt, dann mit Wasser verdünnt und in die Destillationseinheit überführt.

* Einige Beispiele für diese amtlichen Verfahren sind:

- Analyse von Milch: Bestimmung des Stickstoffgehalts: EN ISO 8968, AOAC 991.20, Total Nitrogen in Milk; AOAC 991.22 und 991.23, Protein Nitrogen Content of Milk; European Commission Regulation (EC) No 273/2008, Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products.
- Analyse von Wasser: USEPA-Methode 351.2, Bestimmung von Gesamt-Kjeldahl-Stickstoff in Wasser.
- Analyse von Futtermitteln: Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Europäischen Kommission, Probenahme- und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle von Futtermitteln - Bestimmung des Gehalts an Rohprotein.
- Analyse von pharmazeutischen Produkten: Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur.), Methode 2.5.9, Pharmakopöe der Vereinigten Staaten (USP), Methode <461>. Stickstoff-Bestimmung.

Kjeldahl-Katalysatoren

Die Katalysatoren bestehen zu mehr als 97% aus einem Salz, das die Siedetemperatur der Schwefelsäure erhöht sowie aus 1 bis 3% eines Katalysatortyps oder einer Mischung von Katalysatoren, um die Geschwindigkeit und Effizienz des Aufschlussverfahrens zu erhöhen. Typische Katalysatoren sind Selen oder Metallsalze von Kupfer oder Titan.

Die Auswahl eines bestimmten Katalysators hängt von ökologischen und toxischen Aspekten oder praktischen Gründen wie der Reaktionszeit oder dem Schäumen und Sputtern ab. So reagiert ein selenhaltiger Katalysator am schnellsten, ist jedoch toxisch. Ein kupferhaltiger Katalysator ist **sowohl für Menschen als auch für die Umwelt viel sicherer**, hat aber einen langsameren Aufschlussprozess zur Folge. Ein idealer Kompromiss ist der Mischkatalysator aus Kupfer und Titansulfat.

Produkt-nummer	Produktname	Peso-tabletten	Packungs-größe	Zusammensetzung					Empfehlung
				Na ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Se	TiO ₂	
173350.0413	Katalysator Kjeldahl (Cu) (0,3% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletten	3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletten		3,489 g	0,010 g			Missouri Katalysator. Umweltverträglichkeit aufgrund des geringen Kupfergehalts, aber der Aufschluss dauert länger.
173350.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletten		4,985 g	0,015 g			
174428.1211	Katalysator Kjeldahl (Cu) (6,25% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletten	1 g	1000 g / 1000 tabletten		0,938 g	0,0625 g			
174428.0446		4 g	4 kg / 1000 tabletten		3,75 g	0,25 g			
175639.0414	Katalysator Kjeldahl (Cu) (9% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletten	5 g	5 kg / 1000 tabletten		4,55 g	0,45 g			Universal-Tablette. Für Mikro-Kjeldahl-Anwendungen werden ca. 1,5 g Tabletten empfohlen. Gute Leistung und geringe Umweltbelastung.
177040.0446	Katalysator Kjeldahl (Cu) (10,26% CuSO ₄ ·5H ₂ O) tabletten	4 g	4 kg / 1000 tabletten		3,589 g	0,410 g			
172926.1211	Katalysator Kjeldahl (Cu-Se) (1,5% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 2% Se) tabletten	1 g	1000 g / 1000 tabletten		0,965 g	0,015 g	0,02 g		Wiener Katalysator
172926.0413		3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletten		3,377 g	0,052 g	0,07 g		
172926.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletten		4,825 g	0,075 g	0,1 g		
175570.0446	Katalysator Kjeldahl (Cu-Se) (9% CuSO ₄ ·5H ₂ O + 0,9% Se) tabletten	4 g	4 kg / 1000 tabletten		3,60 g	0,36 g	0,036 g		
173349.0496	Katalysator Kjeldahl (Cu-TiO ₂) tabletten	3,71 g	3,71 kg / 1000 tabletten	1,75 g	1,75 g	0,104 g		0,104 g	Perfektes Gleichgewicht zwischen schneller Verdauung und Umweltverträglichkeit.
173349.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletten	2,358 g	2,358 g	0,1415 g		0,1415 g	
173348.0413	Katalysator Kjeldahl (Se) tabletten	3,5 g	3,5 kg / 1000 tabletten		3,49 g		0,003 g		Schneller Aufschluss aber nicht optimal für die Umwelt.
173348.0414		5 g	5 kg / 1000 tabletten		4,99 g		0,005 g		
177768.0414	Katalysator Kjeldahl (Se) tabletten	5 g	5 kg / 1000 tabletten		4,95 g		0,05 g		Schneller Aufschluss aber nicht optimal für die Umwelt.
177010.0431	Katalysator Kjeldahl tabletten (Cu) (0,3% CuSO ₄ ·5H ₂ O)	6 g	3 kg / 500 tabletten		6 g	0,025 g			Umweltfreundlicher Katalysator

Säure und Oxidationsmittel für den Aufschluss

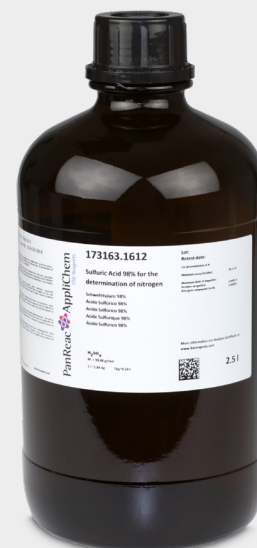
In Analysen von Nahrungs- und Futtermitteln wird 98%ige Schwefelsäure für den Aufschluss verwendet.

Oxidationsmittel können hinzugefügt werden, um die Geschwindigkeit weiter zu verbessern. Wasserstoffperoxid hat die breiteste Verwendung, da es die Zersetzung von organischem Material beschleunigt und eine schaumverhindernde Wirkung während des Aufschlusses hat. Jedoch ist es äußerst reaktiv und das Risiko von Stickstoffverlusten ist hoch. Wenn das Schäumen das einzige Problem ist, ist es besser, 1 bis 3 Tropfen einer eigenen Antischaumemulsion zu verwenden.

Nach dem Aufschluss und vor der Neutralisation der Schwefelsäure durch Zugabe von konzentrierter Natriumhydroxid-Lösung wird die Probe auf Raumtemperatur heruntergekühlt und mit destilliertem Wasser verdünnt. Dies wird durchgeführt, um ein Spritzen des Aufschlusses durch die exotherme Reaktion beim Mischen von konzentrierter Säure und Base zu verhindern. Wenn die Proben unmittelbar nach dem Abkühlen mit 10 bis 20 mL Wasser verdünnt werden, kann eine Kristallisation vermieden werden.

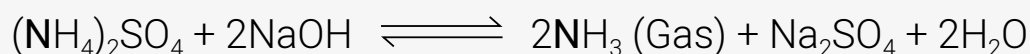
Produktnummer	Produktname	CAS-Nummer	Packungsgröße
173163.1611	Schwefelsäure 98% für die Stickstoffbestimmung	7664-93-9	1 L
173163.1612			2,5 L
173163.0716			25 L
131077.1211	Wasserstoffperoxid 33% (w/v)(110 vol.) (Reag. USP) zur Analyse, ACS, ISO*	7722-84-1	1 L
211628.1210	Silicon-Entschäumer, flüssig (ORG) technisch		500 mL
131074.1211	Wasser zur Analyse, ACS	7732-18-5	1 L
131074.1212			2,5 L
131074.1214			5 L
131074.1315			10 L
131074.0716			25 L

*Die Wasserstoffperoxidkonzentration, ausgedrückt in Volumina, ist das Volumen des Sauerstoffgases, das bei der Zersetzung eines Volumens Wasserstoffperoxid freigesetzt wird (1 mL einer 100-volumigen Lösung erzeugt bei vollständiger Zersetzung 100 mL Sauerstoffgas).



2. Wasserdampfdestillation

Während der Destillation werden die Ammoniumionen (NH_4^+) durch Zugabe einer starken Base (NaOH) in Ammoniak (NH_3) umgewandelt. Der Ammoniak (NH_3) wird mittels Wasserdampfdestillation in das Auffanggefäß überführt.

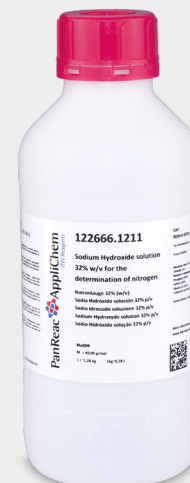


Das Auffanggefäß für das Destillat wird mit einer Absorptionslösung gefüllt, um das gelöste Ammoniakgas einzufangen. Übliche absorbierende Lösungen umfassen wässrige Borsäure $[\text{B}(\text{OH})_3]$ mit einer Konzentration von 2 bis 4%. Der Ammoniak wird quantitativ durch die Borsäurelösung aufgefangen, die solvatisierte Ammoniumionen bildet.



Basen zur Neutralisation und Freisetzung von Ammoniak

Produktnummer	Produktname	CAS-Nummer	Packungsgröße
131687.1210	Natriumhydroxid - Plätzchen	1310-73-2	500 g
131687.1211			1 kg
131687.1214			5 kg
131687.0416			25 kg
141571.1214	Natronlauge 50% (w/v) reinst	1310-73-2	5 L
171220.1214	Natronlauge 40% für die Stickstoffbestimmung	1310-73-2	5 L
171220.1315			10 L
171220.0715			10 L
171220.0716			25 L
122666.1211	Natronlauge 32% (w/v) für die Stickstoffbestimmung	1310-73-2	1 L
122666.1214			5 L
176682.1214	Natronlauge 32% (w/w) für die Stickstoffbestimmung	1310-73-2	5 L
176682.0715			10 L
176682.0716			25 L



Lösungen zum Auffangen des Ammoniaks



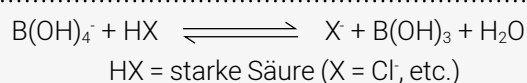
Produktnummer	Produktname	CAS-Nummer	Packungsgröße
283334.1214	Ammoniak 1% - Fixierlösung (Borsäure 1%*)	10043-35-3	5 L
287096.1214	Borsäure - Lösung 2%	10043-35-3	5 L
287096.0716			25 L
282222.1211	Borsäure - Lösung 4%	10043-35-3	1 L
282222.1214			5 L
181023.1211	Salzsäure 0,1 mol/L	7647-01-0	1 L
181023.1212			2,5 L
181023.1214			5 L
181023.0715			10 L
181023.1315	Salzsäure 0,5 mol/L	7647-01-0	10 L
181022.1211			1 L
181022.1214			5 L
181022.1315	Schwefelsäure 0,05 mol/L (0,1N)	7664-93-9	10 L
181061.1211			1 L
181061.1315			25 L
181061.0716	Schwefelsäure 0,1 mol/L (0,2N)	7664-93-9	1 L
182011.1211			10 L
181060.1315	Schwefelsäure 0,25 mol/L (0,5N)	7664-93-9	1 L
181059.1211			10 L
181059.1315			1 L

* Enthält 0,00075% Methylrot und 0,001% Bromkresolgrün als Indikatoren. Für die automatische Analyse.

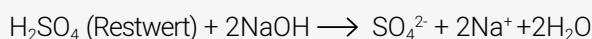
3. Titration

Die Konzentration der aufgefundenen Ammoniumionen kann durch zwei Arten von Titrationen bestimmt werden:

- Wenn Borsäurelösung als Absorptionslösung verwendet wird, wird eine Säure-Base-Titration unter Verwendung von Schwefelsäure- oder Salzsäure-Maßlösung und Indikatormischung durchgeführt. Abhängig von der Menge der vorhandenen Ammoniumionen werden Maßlösungen mit Konzentrationen im Bereich von 0,01 N bis 0,5 N verwendet. Alternativ kann der Endpunkt mit einer **pH-Elektrode** potentiometrisch bestimmt werden. Diese Titration wird als **direkte Titration** bezeichnet.



- Bei Verwendung von Schwefelsäure-Maßlösung als Absorptionslösung wird die Restschwefelsäure (der Überschuss, der nicht mit NH_3 reagiert hat) mit Natriumhydroxid-Maßlösung titriert und über die Differenz die Menge an Ammoniak berechnet. Diese Titration wird als **Rücktitration** bezeichnet.



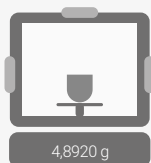
Produktnummer	Produktname	Konzentration	Packungsgröße
Direkte Titration			
181023.1211	Salzsäure	0,1 mol/L	1 L
181023.1212			2.5 L
181023.1214			5 L
181023.0715			10 L
181023.1315			10 L
181061.1211	Schwefelsäure	0,05 mol/L	1 L
181061.1315			10 L
181061.0716			25 L
283303.1609	Mischindikator 4,8 (Methylrot-Bromcresolgrün) Farbwechsel: von Pinkviolett zu Smaragdgrün (pH 4,8-5,5)		250 mL
282430.1609	Mischindikator pH 4,4 (Methylrot-Methylenblau) (Tashiro-Indikator) Farbwechsel: von Rotviolett zu Grün (pH 4,4-5,8)		250 mL
Rücktitration			
181693.1211	Natronlauge	0,1 mol/L	1 L
181693.1214			5 L
181693.1315			10 L
281618.1208	Methylrot - Lösung 0,1% Farbwechsel: von Rot nach Gelb (pH 4,2-6,2)		100 mL



Sie finden eine Vielzahl an Maßlösungen auf unserer Website www.itwreagents.com

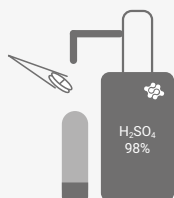
Als **Beispiel** zeigen wir in den folgenden Abbildungen den Ablauf des Aufschlusses, der Destillation und der Titration einer **Milchprobe**.

AUFSCHLUSS

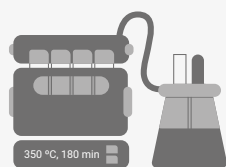


Waage

- Wägen Sie ca. 5 g der homogenen Probe ab.



- Legen Sie die Probe in ein Aufschlussfläschchen.
- Fügen Sie zwei 5 g-Kjeldahl-Tabletten des Missouri-Katalysators hinzu, geben Sie 20 mL 98%ige Schwefelsäure zugeben hinzu und vorsichtig homogenisieren.



Heizblock

Gaswascher

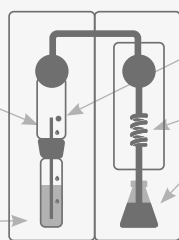
- Stellen Sie das Aufschlussrohr/ Aufschlussfläschchen und die Mischung in die Aufschlusseinheit und in einen Heizblock.
- Erhitzen Sie die Mischung (350 - 380 °C), bis weiße Dämpfe zu sehen sind. Heizen Sie für weitere 180 Minuten.

- Die Wasser- und Schwefelsäuredämpfe werden durch eine Natriumhydroxidlösung (Gaswascher) geleitet, um sie zu neutralisieren.
- Der Aufschluss ist beendet, wenn die Probe vollständig transparent ist und aufgrund des Cu aus dem Katalysator eine leicht blaue Farbe aufweist.
- Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen. Geben Sie vorsichtig ca. 100 mL Wasser hinzu.
- Dann wird der Inhalt des Glasrohrs in die Destillationseinheit überführt.

DESTILLATION

3. Ein Wasserdampfstrom wird in die Probe eingeblasen, um das gebildete NH_3 mitzureißen.

1. Die Probe ist bereits mit 98%iger Schwefelsäure aufgeschlossen.



Destillationseinheit

- 50 mL einer 50%igen Natriumhydroxidlösung werden zu der Probe gegeben, um den pH-Wert zu neutralisieren und NH_4^+ in NH_3 umzuwandeln.
- NH_3 wird kondensiert.
- NH_3 wird in 50 mL Borsäure aufgefangen. Lösung 4% mit Tashiro-Indikator aufgefangen. Die Lösung färbt sich von rotviolett nach grün (pH 4,4-5,8). Etwa 150 mL Kondensat werden aufgefangen. Destillationseinheit in der Borsäurelösung.

TITRATION



- Titrieren Sie mit HCl 0,25 mol/L, bis die Lösung eine leicht violette Farbe hat.
- Mit dem verbrauchten Volumen und der Konzentration der verwendeten HCl kann die Molzahl an Stickstoffatomen in der Probe und daraus der Prozentsatz Protein in der Milchprobe berechnet werden.

Berechnungen

Die Berechnungen für % Stickstoff oder % Protein müssen berücksichtigen, welche Art von Auffanglösung und welche Verdünnungsfaktoren während des Destillationsprozesses verwendet wurden. In den folgenden Gleichungen steht „N“ für Normalität. „mL Blindwert“ bezieht sich auf die Milliliter der Base, die benötigt werden, um einen Reagenzienbindwert zurückzutitrieren, wenn Standardsäure die Auffanglösung ist oder auf die Milliliter der Standardsäure, die benötigt werden, um einen Reagenzienbindwert zu titrieren, wenn Borsäure die Auffanglösung ist.

- Wenn Borsäure als Auffanglösung verwendet wird, lautet die Gleichung:

$$\% \text{ Stickstoff} = \frac{(\text{mL Standardsäure} - \text{mL Blindwert}) \times \text{N Säure} \times 1,4007}{\text{Gewicht der Probe (g)}}$$

- Wenn Standardsäure als Auffanglösung verwendet wird, lautet die Gleichung:

$$\% \text{ Stickstoff} = \frac{[(\text{mL Standardsäure} \times \text{N Säure}) - (\text{mL Blindwert} \times \text{N Base})] - (\text{mL Standardbase} \times \text{N Base}) \times 1,4007}{\text{Gewicht der Probe (g)}}$$

Soll anstelle des Stickstoffs der Eiweißanteil bestimmt werden, so wird der berechnete N-Anteil mit einem Faktor multipliziert, der von der Art des in der Probe enthaltenen Eiweißes abhängt, z. B. bei Eiern oder Fleisch mit dem Faktor 6,25, bei Milchprodukten mit dem Faktor 6,38, bei Weizen mit dem Faktor 5,70, bei Sojabohnen und Derivaten mit dem Faktor 5,71 usw.



A173,DE;202401



**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