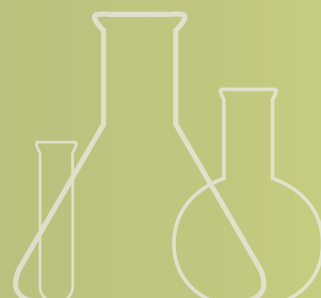


# 4090UY

Determinación de nitrógeno total Kjeldahl  
en aguas y efluentes

Flow Injection Analysis (FIA)



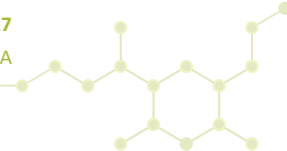
**Elaborado** - C. Grau

**Modificado** - C. Grau

**Revisado** - S. Azambuya, Jefe Sección Fisicoquímico

**Aprobado** - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





## 1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica es adecuada para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales y tratadas, así como en aguas residuales domésticas e industriales.

El rango de trabajo es de (0,84 –1750) mg N/L y el rango lineal (0,84 – 35) mg N/L. El límite de detección es de 0,28 mg N/L.

## 2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA.
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso del equipo de análisis por inyección en flujo (INE 111)
- 2.6. Instructivo de uso del digestor BD 40 (INE 112)
- 2.7. Instructivo de uso de balanzas (INE 06, INE 16A e INE 16B)
- 2.8. Ruta de análisis (RFQ 34 y RFQ 35)
- 2.9. Planillas de cálculo electrónicas
- 2.10. Instructivos de uso del destilador y desionizador de agua (INE 28, INE 36, INE 82 e INE 109)

## 3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. El método colorimétrico se basa en reacciones que son específicas para el ion de amonio. La digestión convierte las formas orgánicas de nitrógeno en la forma de amonio, la cual se mide a 660 nm.

Las muestras se digieren en presencia de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), y sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ). El residuo se enfría, se diluye con agua y se analiza como amoníaco.

Nitrógeno Total Kjeldahl es la suma de los compuestos libres de amoníaco y de nitrógeno orgánico que se convierten en sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ ), bajo las condiciones de la digestión descripta.

La muestra es inyectada en la placa donde su pH se controla elevando a un pH básico conocido con un tampón concentrado. Esta neutralización en línea convierte el catión de amonio en amoníaco, y también evita la influencia indebida de la matriz de ácido sulfúrico en la reacción de color sensible al pH que sigue.

El amoníaco producido se calienta luego con salicilato e hipoclorito para producir un color azul, que es proporcional a la concentración de amoníaco. El color se intensifica mediante la adición de nitroprusiato de sodio.

## 4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Se requiere túnica, guantes y anteojos de protección.
- 4.2. Cada reactivo debe ser considerado como un peligro potencial para la salud, la exposición a los mismos debe ser minimizada.
- 4.3. Prestar especial cuidado con posibles proyecciones en el momento del agregado de agua desionizada luego de digerida la muestra.

## 5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Durante la digestión de Nitrógeno Total Kjeldahl, si la muestra tiene un contenido de  $NO_3$  superior a 10 mg N/L, éste puede oxidar una porción del amoníaco liberado del  $N_{org}$  digerido, produciendo  $N_2O$  y dando como resultado una interferencia negativa.
- 5.2. Cuando hay suficiente materia orgánica en un bajo estado de oxidación, el  $NO_3$  puede reducirse a amoníaco, dando como resultado una interferencia positiva.

Las condiciones en las que se producen las interferencias significativas no están bien definidas, por lo tanto, no existe una manera comprobada de eliminar dichas interferencias para esta metodología. En cada caso particular, se deben contrastar los resultados obtenidos de amonio, NTK y nitratos para verificar la coherencia del balance de compuestos nitrogenados.

## 6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

6.1. Recolectar una cantidad de muestra que sea representativa (cantidad de muestra típica, 250 mL) en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente) y refrigerar 2 °C – 5 °C. Realizar el análisis lo antes posible, luego de realizado el muestreo.

De no ser posible, preservar la muestra a pH < 2 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado o congelar a -20 °C y analizarla antes de los 28 días.

## 7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

7.1. Balanza con resolución de 0,001 g, para toma de muestra y estándares.

7.2. Balanza con resolución de 0,01 g, para preparación de reactivos.

7.3. Pipetas automáticas de volumen variable de rango de (1,00 – 10,00) mL y (100 – 1000) µL.

7.4. Matraces Erlenmeyer de 150 mL ó 250 mL.

7.5. Sistema de análisis por inyección en flujo provisto de Manifold para la determinación de NTK (LACHAT QuickChem 8500 series 2 o similar)

7.6. Block de digestión

7.7. Equipo para la generación de agua desionizada

## 8. REACTIVOS

8.1. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente)

8.2. **Reactivos:**

Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Nro. CAS 7664-93-9)

Sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Nro. CAS 7778-80-5)

Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O Nro. CAS 7758-99-8)

Tartrato de sodio y potasio (D, L-NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O Nro. CAS 6381-59-5)

Hidróxido de sodio (NaOH Nro. CAS 1310-73-2)

Fosfato de sodio (dibásico heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) Nro. CAS 7782-85-6)

Salicilato de sodio (sal sódica del ácido salicílico ([C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)(COO) Na] Nro. CAS 54-21-7)

Nitroprusiato de sodio (dihidrato nitroferricianuro sódico ([Na<sub>2</sub>Fe (CN)<sub>5</sub>NO·2H<sub>2</sub>O] Nro. CAS 13755-38-9)

Hipoclorito de sodio (NaOCl Nro. CAS 7681-52-9)

*Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.*

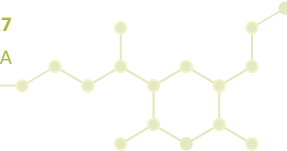
8.3. **Solución de digestión:**

En un matraz aforado de 1 L, con 700mL de agua 8.1, añadir 134,0 g de sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 134 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Añadir 11,4 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Diluir hasta el aforo con agua 8.1 e invertir para mezclar. Mantener bien cerrado cuando no esté en uso para reducir la posibilidad de contaminación por amoníaco del ambiente. Preparar mensualmente.

8.4. **Buffer:**

En un recipiente de 1 L añadir 900 mL de agua 8.1, 50 g de tartrato de sodio y potasio, D, L-NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O), 50 g de hidróxido de sodio (NaOH), y 26,8 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) mezcla hasta disolver. Hervir durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y transferir a un matraz aforado de 1 L. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar. Preparar mensualmente.

*Nota 2: Para reducir la posibilidad de que el tartrato de potasio sea contaminado, se recomienda que el buffer de tartrato se hierva durante 10 minutos. Para verificar que el buffer de tartrato es lo suficientemente puro, comparar la línea de base de reactivo a la línea de base de agua desionizada. La línea de base con todos los reactivos no debe tener una diferencia mayor de 0,15 V con la línea de base de agua desionizada.*



#### 8.5. Nitroprusiato - Salicilato:

##### Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 1 L disolver 150,0 g de salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico,  $C_6H_4(OH)(COO)Na$ ], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidrato nitroferrocianuro sódico,  $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ ] en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta la marca e invertir para mezclar. Guarde en un frasco oscuro y preparar mensualmente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

##### Preparación por Peso:

En un frasco de vidrio ámbar del 1 L agregar 150.0 g salicilato de sodio [sal sódica del ácido salicílico,  $C_6H_4(OH)(COO)Na$ ], y 1,00 g nitroprusiato de sodio [dihidrato nitroferrocianuro sódico,  $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ ] en 908 g de agua 8.1. Agitar hasta disolver. Preparar mensual-mente, o cuando la solución desarrolle un color azul-verdoso.

#### 8.6. Hipoclorito de sodio (100 mL/L):

##### Preparación por Volumen:

En un matraz aforado de 250 mL, diluir 25,0 mL de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl), hasta la marca con agua 8.1. Invertir para mezclar. Preparar diariamente.

##### Preparación por Peso:

En un matraz de 250 mL, agregar 26,7 g de hipoclorito de sodio al 5,25 % (NaOCl) y 225 g de agua 8.1. Agitar para mezclar. Preparar diariamente.

8.7. **Solución estándar de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,9095 g de cloruro de amonio ( $NH_4Cl$ ) que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

8.8. **Solución control de Nitrógeno total Kjeldhal, 500 mg N/L:** En un matraz aforado de 1 L, disolver 1,9095 g de cloruro de amonio ( $NH_4Cl$ ) que es previamente secado durante dos horas a 110 °C en aproximadamente 800 mL de agua 8.1. Diluir hasta el aforo e invertir para mezclar.

*Nota 3: El reactivo utilizado para preparar tanto la solución estándar como la solución control deben ser de marcas distintas o por lo menos números de lotes distintos.*

### 9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Las muestras no deben consumir más del 10 % del ácido sulfúrico durante la digestión. Este consumo de ácido se puede detectar cuando se mide la densidad de la muestra digerida y se encuentran diferencias significativas entre las densidades. En caso de que esto ocurra, evaluar la posibilidad de repetir la muestra realizando una dilución mayor o estandarizar la muestra digerida con una solución de hidróxido de sodio, determinando así el excedente de ácido sulfúrico consumido en la digestión. Luego de realizada la estandarización, es necesario reanalizar la muestra con una dilución mayor.
- 9.2. Las digestiones deben estar libres de turbidez. Las piedras de ebullición pueden causar cierta turbidez. Para evitar que esto ocurra, hacer la toma para la medición del sobrenadante.

## 10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. Preparar una serie de estándares de acuerdo al siguiente cuadro utilizando una balanza con resolución de 0,001 g, a partir de un estándar de 50 mg N/L, preparado a partir de material de referencia certificado o de la solución 8.7:

| Masa std (g) | Masa final (g) | Concentración aprox. final (mg N/L) |
|--------------|----------------|-------------------------------------|
| 0,25         | 50             | 0,25                                |
| 0,75         | 50             | 0,75                                |
| 1,5          | 50             | 1,5                                 |
| 5,0          | 50             | 5,0                                 |
| 10,0         | 50             | 10,0                                |
| 17,5         | 50             | 17,5                                |
| 25,0         | 50             | 25,0                                |
| 35,0         | 50             | 35,0                                |

10.2. Preparar una solución control para el chequeo de la curva de calibración a partir de un material de referencia certificado o partir de la solución 8.8, de acuerdo a la siguiente dilución:

| Concentración Std (mg N/L) | Masa solución control (g) | Masa final (g) | Concentración aprox. final (mg N/L) |
|----------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 500                        | 1,0                       | 50             | 10                                  |

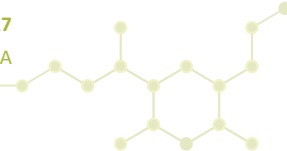
*Nota 4: Se asume una densidad de 1 g/mL.*

*Nota 5: Preservar los estándares de la curva, blancos y control con 2 mL/L de  $H_2SO_4$  concentrado. Los estándares, blancos y control pueden ser almacenados por 28 días.*

## 11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

### 11.1. Digestión de la muestra (muestras, curva de calibración, blancos y controles de calidad):

- 11.1.1. Las muestras, estándares, blancos y controles de calidad deben estar previamente preservados con  $H_2SO_4$  conc (2 mL/L).
- 11.1.2. Para efluentes se realizará una dilución previa a la digestión de 10 veces aproximadamente. Registrar la toma de la muestra y la masa final de la dilución. Las muestras de aguas se analizan sin dilución previa.
- 11.1.3. Colocar piedras de ebullición en el tubo para digestión, tarar la balanza y registrar el peso del tubo en el RFQ 34 o RFQ 35 según corresponda.
- 11.1.4. Sin tarar la balanza realizar una toma de aproximadamente 25 mL y registrar el peso.
- 11.1.5. Agregar en cada tubo 10 mL de solución de digestión con pipeta automática.
- 11.1.6. Colocar todos los tubos en el block de digestión Lachat BD-40, encender el equipo y seleccionar el programa deseado (el programa utilizado es DIG\_NTK 3). Verificar que las condiciones de digestión sean las siguientes: Paso 1 a 150 °C, T rampa 30 minutos, Ta estable 60 minutos, Paso 2 a 250 °C, T rampa 30 minutos, Ta estable 60 minutos, Paso 3 a 390 °C, T rampa 50 minutos, Ta estable 30 minutos.
- 11.1.7. Finalizada la digestión, retirar la gradilla con los tubos del digestor y colocarlos en el soporte para enfriar, antes de pasados 10 minutos, agregar una pequeña cantidad de agua desionizada 8.1 en cada tubo para evitar la formación de material sólido.
- 11.1.8. Cuando el digerido alcance temperatura ambiente, llevar a 25 mL con agua desionizada 8.1 y registrar el peso del tubo. Homogeneizar utilizando un vórtex.
- 11.1.9. Medir la densidad de la curva de calibración, blancos, controles y muestras, pesando 1 mL del digerido con pipeta automática calibrada. Registrar el peso.



*Nota 4: Los estándares de la curva de calibración tienen una vigencia de 28 días luego de la digestión, por lo que si se va a analizar muestras dentro de ese período, se utiliza esa curva de calibración ya digerida.*

### 11.2. Determinación instrumental:

- 11.2.1 Encender el equipo de inyección en flujo.
- 11.2.2 Colocar todas las líneas de reactivos en un recipiente con agua destilada y hacer circular por todo el sistema unos minutos.
- 11.2.3 Colocar uno a uno y en el orden que aparecen en el Manifold, cada línea de reactivos en el recipiente conteniendo el reactivo correspondiente y dejar estabilizar por unos 10 minutos.
- 11.2.4 Colocar una porción de cada digerido a analizar en los tubos del rack del autosampler seguido de los estándares de la curva (de menor a mayor concentración), controles y blancos.
- 11.2.5 Verificar en el computador, en el ícono de la configuración del instrumento, que esté correctamente seteado el modelo del rack del autosampler que se está utilizando.
- 11.2.6 Ingresar en el programa de control del sistema (PC) la secuencia de análisis a realizar con los estándares de calibración, control y muestras.
- 11.2.7 No ingresar los factores de dilución de aquellas muestras diluidas, los cálculos están considerados en la planilla de cálculo madre.
- 11.2.8 Iniciar la secuencia de análisis; una vez completada, el equipo finaliza automáticamente y eventualmente queda listo para otra secuencia.

## 12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. El programa construye automáticamente la curva de calibración (Área vs Concentración) y calcula la concentración del control y de las muestras.
- 12.2. Verificar que la forma de los picos en el registro del programa sea la adecuada y no haya habido ninguna interferencia en la secuencia.
- 12.3. Generar el reporte de la secuencia en el programa e imprimirlo.
- 12.4. Ingresar los datos correspondientes en la planilla de cálculo de la técnica para ajustar los resultados obtenidos en el reporte de datos en base a las tomas de muestras realizadas, densidades correspondientes y factores de dilución. También verificar los resultados de exactitud, precisión y fortificaciones.

$$\text{Conc NTK (mgN/L)} = \frac{C_o \times m_{\text{muestra dirigida}} \text{ (g)} \times \text{FD}}{\text{densidad} \times m_{\text{muestra inicial}} \text{ (g)}}$$

## 13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** Preparar el control de la curva de calibración de acuerdo a la tabla del punto 10.2. Analizar el control en la secuencia luego de la curva de calibración o al final de toda la corrida. Obtener el resultado del porcentaje de recuperación en la planilla de cálculo y contrastarlo con los límites de aceptación correspondientes, siendo 90-110 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si el resultado obtenido está fuera de control proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.2. **Control de la precisión:** Analizar por duplicado una cada 5 muestras de aguas o efluentes. Mínimo 1 muestra por duplicado por cada batch de muestras. Obtener de la planilla de cálculo el valor de rango normalizado para el duplicado y verificar que el mismo se encuentre bajo control, siendo 10% el máximo aceptado de dispersión hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.
- 13.3. **Porcentaje de recuperación:** Repetir desde el punto 11.1.3 al 11.1.4. Fortificar las aguas con 100 µL y los efluentes con 250 µL con una solución de 500 mg N/L, registrar el peso. Repetir desde el punto 11.1.5 al 11.1.8. Se fortifican todos los efluentes y una de cada 5 muestras de aguas. En el caso de los efluentes que llevan una dilución previa a la digestión, se fortifica la dilución y no la muestra original. Obtener de la planilla de cálculo los porcentajes de recuperación de las muestras fortificadas y verificar que los mismos

se encuentren bajo control, siendo 90-110 % el rango de aceptación hasta obtener datos suficientes para construir un gráfico de control. Si algún resultado se encuentra fuera de control, proceder de acuerdo a lo establecido por el Manual de Control de Calidad Analítico.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. LACHAT, QuikChem® Method 10-107-06-2-P, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY FLOW INJECTION ANALYSIS COLORIMETRY (Cooper catalyst / block digester method).
- 14.2. EPA Method 351.2, DETERMINATION OF TOTAL KJELDAHL NITROGEN BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY, Revision 2.0, August 1993.
- 14.3. American Public Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4500 N<sub>org</sub> A Nitrogen (organic) Introduction y 4500 Norg D Block digestion and flow injection analysis pp. 4-131 a 4-132 y 4-135 a 4-137.



