

MODIFICACION DE UN METODO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACION DEL NITROGENO TOTAL EN SUELOS Y PASTOS

Horacio J. Volonteri

Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa,
Casilla de Correo 159, (6300) Santa Rosa, La Pampa

INTRODUCCION

La determinación del nitrógeno por el método de Kjeldahl, implica habitualmente la mineralización de la materia orgánica, la separación del amonio formado y la cuantificación del mismo. Existen distintas técnicas para separar y cuantificar el amonio, entre ellas las colorimétricas, que teniendo elevada sensibilidad permiten las determinaciones de nitrógeno hasta el orden del μg (Fleck and Munro, 1965).

La ninhidrina, Hidrato de tricetohidrendeno, un reactivo general para aminoácidos, aminas, amonio y otros (Mc Caldin, 1960) fue propuesta por Jacobs (1959) para determinar cuantitativamente el amonio en digestados de Kjeldahl. La reacción no es afectada por los catalizadores (mercurio, cobre, selenio), o por las sales que habitualmente se utilizan en dicha digestión (Meyer and Riklis, 1953), pero sí es influenciada por la acidez del medio y es dependiente también de la presencia de hidrindantina, producto de la reducción parcial de la ninhidrina. (Mc Fayden, 1944; Sobel, *et al.*, 1945; Mc Caldin, 1960; Matheson *et al.*, 1961).

Se han propuesto distintos reactivos de ninhidrina que permiten adecuar el transcurso de la reacción en las condiciones de máxima sensibilidad para la reacción coloreada (Moore and Stein, 1948; 1954; Rosen, 1957).

Tales reactivos, de uso corriente en la determinación de aminoácidos en cromatógrafos de-intercambio iónico, serían posibles de utilizar en las determinaciones de nitrógeno por el método de Kjeldahl, con la selección previa de aquellos que contengan en su composición, sistemas reguladores apropiados que permitan atenuar sensiblemente en el entorno de pH 4,5 a

5, la extrema acidez de la alícuota del digestado. (Jacobs, 1959; 1960; 1962).

En el método que se propone a continuación se prefirió tomar como variable a modificar, la dilución del digestado y el empleo de pequeños volúmenes con micropipetas de precisión, para poder emplear reactivos de ninhidrina de menor capacidad reguladora, como es el de Moore *et al.* de 1948.

MATERIALES Y METODOS

Método

100 mg de muestra vegetal, ó 250 a 500 mg de suelo y 1,25 g de sales más catalizador (1,20 g de sulfato de potasio anh. y 0,05 g de óxido de mercurio) se colocan en un balan de Kjeldahl de 100 mL, al que se agrega 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se calienta en digestor, hasta completa mineralización. Una vez frío, se pasa cuantitativamente el digesto a un matraz aforado de 100 mL, con sucesivos lavados con agua destilada. Finalmente se lleva a volumen.

Se toma una alícuota que contenga no más de 4 μg de nitrógeno (habitualmente de 20 a 100 μL) que se pasa a un tubo de ensayo (15 x 150 mm) que contiene 2,0 mL del reactivo de ninhidrina. Se enjuaga repetidas veces la micropipeta con el mismo reactivo.

Se coloca el tubo en baño de agua a ebullición por 20 minutos. Cumplido, se enfría y se agregan 5 mL de solución etanol-agua destilada (1:1). Se lee en espectrofotómetro el color desarrollado a 570 nm, que es estable por 60 minutos. Se compara la lectura respecto de digestiones de referencia y ensayo en blanco.

Reactivos

- Reactivo de Ninhidrina:
 - a) 0,80 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de solución reguladora de citratos 0,20 M de pH 5,0.
 - b) 20 g de ninhidrina p.a. en 500 mL de metilcelosolve (libre de peróxidos).
En el momento de utilizar, se mezclan partes iguales de a y b. Los frascos se guardan en heladera.
- Solución reguladora de citratos 0,20 M de pH 5,0. 21,014 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 200 mL de solución normal de NaOH, se llevan a 500 mL con agua destilada. Se ajusta con potenciómetro si es necesario.
- Solución de referencia de 1 mg/mL de nitrógeno. 4,717 g de sulfato de amonio p.a., seco, se llevan a 1.000 mL con agua destilada.

RESULTADOS

Se realizaron digestiones por triplicado de una solución de referencia conteniendo 2,0 mg de nitrógeno según la técnica antes descrita. Se llevaron a 100 mL y se tomaron alícuotas de 100 μL . El color desarrollado, leído a 570 nm, tuvo una densidad óptica de $0,173 \pm 0,006$ respecto del ensayo en blanco. Se usó celda de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico.

Se comparó el presente método respecto de determinaciones por triplicado de suelo y forrajes por el micrométodo estándar de Kjeldahl, no habiéndose notado diferencias significativas entre ambos (Tabla 1).

DISCUSION

Son dos las restricciones a tener en cuenta, para operar con este método. La alícuota no debe contener más de 4 μg de nitrógeno y tampoco debe superar el volumen de 100 μL . La primera de ellas es en el sentido de no sobrepasar el límite de las respuestas proporcionales entre la densidad óptica de la solución y su concentración; y la segunda en términos de lograr que la reacción transcurra en pH cercanos a 5, zona de máxima sensibilidad de la misma. (Con dicho volumen de alícuota la variación del pH es de 0,2 unidades).

CONCLUSIONES

El método propuesto es perfectamente utilizable en las determinaciones de nitrógeno en muestras naturales. Tiene ventajas respecto del tiempo de determinación y su técnica operativa comparándolo con los que habitualmente se utilizan (colorimétricos o destilación y posterior titulación del amonio). Su alta sensibilidad permite determinaciones de pequeñas cantidades de nitrógeno del orden de un microgramo. El costo de la ninhidrina se compensa en parte con el costo del hidróxido de sodio, ácido bórico e indicador que se evitan, cuando se opta ante la destilación.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración prestada por Hugo F. Bergonzi.

TABLA 1: Valores porcentuales de nitrógeno.

Muestra	% Nitrógeno Microdestilación	% Nitrógeno Ninhidrina
Pasto llorón (<i>Eragrostis curvula</i>)	1,02 \pm 0,01	1,03 \pm 0,01
Cebadilla (<i>Bromus sp.</i>)	3,20 \pm 0,01	3,21 \pm 0,01
Pellets girasol	6,28 \pm 0,04	6,30 \pm 0,05
Suelo (horizonte A ₁ Haplustol)	0,17 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01

BIBLIOGRAFIA

- Fleck, A.; Munro, H. N., 1965. The Determination of Organic Nitrogen in Biological Materials. Clin. Chim. Acta 2: 2-12.

- Jacobs, S., 1959. Determination of Nitrogen in Proteins by means of Indanetrione Hydrate. *Nature*. 183: 262.
- Jacobs, 1960. *Analyst*. 85: 257.
- Jacobs, 1962. *Analyst*. 87: 53-57.
- Matheson, A. T.; Tigane, E.; Hanes, C. S., 1961. Quantitative Chromatographic Methods, and Improved Ninhydrin-Hydrindantin Reagent. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 417-425.
- Mc Caidin, D. J., 1960. The Chemistry of Ninhydrin. *Chem. Rev.* 60: 39-51.
- Mc Fayden, D. A., 1944. Determination of Ammonia Evolved from Aminoacids by Ninhydrin. *J. Biol. Chem.* 153: 507-513.
- Meyer, H.; Riklis, E., 1953. *Nature*, 172: 543.
- Moore, S.; Stein, W. H., 1948. Photometric Ninhydrin Method for use in the Chromatography of Aminoacids. *J. Biol. Chem.* 176: 367-388.
- Moore, S.; Stein, W. H., 1954. *J. Biol. Chem.* 211: 907.
- Rosen, H., 1957. A Modified Ninhydrin Colorimetric Analysis for Aminoacids. *Arch. Biochem. Biophysics*. 67: 10-15.
- Sobel, A. E.; Hirschman, A.; Besman, L., 1945. A Convenient Microtitration Method for the Estimation of Aminoacids. *Fed. Proceedings*. 4: 92-103.