



Validación del método Kjeldahl en la determinación del Nitrógeno Mineral, mediante el uso de Cloruro Potasio

Validation of the Kjeldahl method in the determination of mineral nitrogen, through the use of potassium chloride

Marlene Mamani, Roberto Miranda, Miguel Angel López, Elizabeth Yujra, Marco López y Alejandro Chuquimia

RESUMEN:

La Norma Boliviana NB-ISO.IEC 17025:2018 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración) permite demostrar la certeza de los resultados obtenidos por un determinado método, por tanto, sea capaz de generar resultados reproducibles, exactos, confiables y adecuados para la finalidad que se requiere. El objetivo del presente trabajo de investigación fue validar el método analítico Kjeldahl para la cuantificación de nitrógeno mineral en suelos, en base a la Norma Boliviana NB-ISO.IEC 17025. La metodología incluye la evaluación de la Linealidad, Limite de Detección, Limite de Cuantificación, Exactitud y Precisión. Fueron utilizados suelos procedentes de diferentes regiones del departamento de La Paz con diferente pH y textura. De acuerdo con los resultados, el porcentaje de recuperación del equipo Kjeldahl tiene un 96 a 99% de recuperación y la linealidad del sistema presentó un coeficiente de correlación de 0.9984 criterio de aceptación establecido por la norma boliviana. La Exactitud y Precisión aplicados al método en estudio, presentaron valores inferiores al 10%, lo que confirma la exactitud y precisión de la metodología empleada por el laboratorio de suelos de la facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés.

PALABRAS

Nitrógeno mineral, validación, exactitud, Kjeldahl, Laboratorio de suelos, LAFASA.

CLAVE:

ABSTRACT:

The Bolivian Standard NB-ISO.IEC 17025: 2018 (General requirements for the competence of testing and calibration laboratories) allows to demonstrate the certainty of the results obtained by a certain method, therefore, it is capable of generating reproducible, accurate, reliable and adequate results for the purpose required. The objective of this research work was to validate the Kjeldahl analytical method for the quantification of mineral nitrogen in soils, based on NB-ISO.IEC 17025. The work was carried out in the Soil Laboratory of the Faculty of Agronomy (LAFASA) of the "Universidad Mayor de San Andrés". The methodology includes the evaluation of Linearity, Detection Limit, Quantification Limit, Accuracy and Precision. Soils from different regions of the department of La Paz with different pH and texture were used. According to the results, the recovery percentage of the kjendahl equipment has a 96 to 99% recovery and the linearity of the system presented a correlation coefficient of 0.9984 acceptance criteria established by the Bolivian standard. The Accuracy and Precision applied to the method under study, presented values less than 10%, which confirms the accuracy and precision of the methodology used by the soil laboratory of the Faculty of Agronomy of the "UMSA".

KEYWORDS:

Mineral nitrogen, validation, accuracy, Kjeldahl, Soils laboratory, LAFASA.

AUTORES:

Marlene Mamani: Carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. UMSA. mamanijimenezm5@gmail.com

Roberto Miranda: Docente Facultad de Agronomía. UMSA. rmiranda@umsa.bo

Miguel Ángel López: Técnico del IIDEPROQ- UMSA. nik_mi@hotmail.com

Elizabeth Yujra: Analista de laboratorio (LAFASA). Facultad de Agronomía. UMSA. elizabethyujra123@gmail.com

Marco López: Carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. UMSA. Antonilp123sam@gmail.com

Alejandro Chuquimia: Carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. UMSA. alex david_cg@hotmail.com

Recibido: 11/05/2020. **Aprobado:** 26/06/2020.



INTRODUCCION

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad respecto al método analítico empleado, la validación de un método se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que es la confirmación por examen y da la provisión de

evidencias objetivas de que los requisitos particulares para uso específico provisto son cumplidos.

El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento usado para la validación y declaración acerca de si el método se ajusta para el uso previsto, es decir,

la validación de métodos significa comprobar que el método que se está utilizando cumple con una serie de parámetros que serán establecidos, según la categoría del método (Montufar, 2009).

El procedimiento empleado se utiliza para obtener una indicación de la disponibilidad de Nitrógeno Mineral. El método consiste en la extracción del amonio por equilibrio, de la muestra de suelo con KCl 2N y la determinación de este ion por destilación por arrastre de vapor en presencia de MgO, el mismo es satisfactorio para la determinación de iones nitratos, en este caso de agrega aleación de Devarda, lo que permite tener una indicación de nitrógeno inorgánico (Álvarez & Marín, 2011).

Las principales formas de nitrógeno en el suelo son: a) orgánica (generalmente más abundante en la parte superior del perfil) formada por residuos vegetales (incluyendo microorganismos) y animales en diversos estados de descomposición, desde residuos frescos a humus, entendiéndose por este último el material orgánico estabilizado por acción de la flora microbiana; y b) la inorgánica, que incluye principalmente a nitratos, nitritos, amonio intercambiable y amonio fijado. (Roper & Ophel-Keller, 1998).

Entre los parámetros de evaluación se tiene el % Recuperación, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y la precisión.

Según Montufar (2009), el porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medido y el contenido de la muestra. En el caso de idealidad se obtiene el 100%. En mediciones puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analitos en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores.

Por otro lado, de acuerdo con Montoya (2012), la linealidad es la capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro de un rango

determinado de concentraciones ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien conocida. Según Montufar (2009) el intervalo de trabajo o linealidad de un método analítico es el intervalo entre los niveles más bajo y alto de concentraciones que ha sido demostrado que puede ser determinados con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz.

Con respecto al límite de detección, Montufar (2009) menciona que este parámetro es necesario solamente cuando deben tomarse decisiones cualitativas, es decir si el analito está presente o no. Este mismo autor, menciona que el Límite de detección (LD) es la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación. Cuando se realizan mediciones a niveles bajos de analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. La importancia de determinar este parámetro y los problemas implícitos, surgen del hecho de que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza un umbral. Los problemas han sido investigados estadísticamente con detalle y se ha propuesto una gama de criterios de decisión. La ISO (International Organization for Standardization) utiliza como un término general el “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” el cual en química se traduce como la “concentración neta detectable”. La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) es cautelosa en el uso de “límite de detección” prefiriendo “Valor (verdadero) Mínimo Detectable.

Con respecto a la Exactitud, Montufar (2009) menciona que para evaluar este parámetro se realiza el análisis de un material de referencia certificado (MRC), preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra. Sólo en el caso de no existir un material

adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación. Es recomendable de ser posible, realizar un mínimo de 10 repeticiones del ensayo tres días consecutivos. Se compara el promedio de los valores obtenidos con el valor de referencia certificado, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a ese material. Según Montoya, (2012) la exactitud es la proximidad entre el valor medio obtenido de un conjunto de resultados y el valor de referencia aceptado.

Según la Guía Eurachem (2005), la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetitividad” y la “reproducibilidad”.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue Validar el Método Analítico Kjeldahl para la determinación de nitrógeno mineral en diferentes tipos de suelos de La Paz (Bolivia).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Suelos y Aguas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés. Para el desarrollo de este estudio se utilizaron muestras que proceden de los municipios de Viacha, Achocalla, Nueva Esperanza, Puerto Rico, Inquisivi, Caquiaviri, Santiago de Huata, Batallas, Sapahaqui, Reyes, Licoma, Murillo, Coroico, Mecapaca, Yucumo y Taraco. Los equipos utilizados fueron: agitador magnético, agitador de mesa, destilador de agua, hidrómetro, balanza analítica OHAUS, pH-metro OAKTON, destilador Kjeldahl BUCCHI Unit K-350, micropipeta de: 1 ml; 5 ml; 10 ml, bureta automática. Los reactivos utilizados fueron: Ácido Bórico (H_3BO_3); solución extractante de cloruro de potasio (KCl); mezcla de indicadores (bromocresol y rojo metilo); óxido de magnesio (MgO); solución patrón de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$ y KNO_3); hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1N, hexametáfosfato de Sodio; aleación de Devarda, Carbonato de Sodio, Ácido sulfúrico (H_2SO_4)

0,005N. Todos los reactivos utilizados fueron reactivos analíticos (PA).

Determinación de nitrógeno mineral

Se pesó 5 g de suelo en un vaso de precipitación al que se agregó 50 ml de solución cloruro de potasio 2N, posteriormente se agitó por 60 min en el agitador de mesa a 250 rpm y se dejó decantar por aproximadamente por 60 minutos. En un matraz de destilación Kjeldahl se agregó una alícuota de 10 ml junto a 0.2 g de óxido de magnesio calcinado y 0,2 g de aleación de Devarda. Una vez que se preparó las muestras se llevó a destilar durante 2-3 min en un matraz Erlenmeyer que contiene 10ml de ácido bórico. Finalmente se tituló las muestras con ácido sulfúrico. Fueron utilizados dos blancos. Los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$N(ppm) = (M - B) * N * 14 * \left(\frac{V_i}{a}\right) * \left(\frac{1}{p}\right) * 1000 \quad (1)$$

Dónde el N. ppm = nitrógeno mineral en ppm; M=ml de ácido sulfúrico gastados en la muestra; B=ml de ácido sulfúrico gastados en el blanco; N=normalidad del ácido sulfúrico (0.005N); V_i =volumen del extractante en ml; a=alícuota destilada en ml; p=peso de la muestra en gramos.

Validación del método

Porcentaje de Recuperación del equipo de destilación Kjeldahl

Para evaluar el parámetro del % recuperación del equipo de destilación BUCCHI Unit K-350, se llevó a destilar 1ml de la solución patrón con 9 ml de KCl 2N más 0,2g de MgO y 0,2g de aleación de Devarda en un matraz Erlenmeyer que contenía 10 ml de H_3BO_3 . Posteriormente se tituló las muestras con H_2SO_4 al 0,005N. incluyendo los blancos los cuales consistían en poner dos matraces Kjendhal agregando todos los reactivos mencionados anteriormente pero sin la solución patrón (Álvarez & Marín, 2011). Los resultados fueron reemplazados en la siguiente ecuación:

$$N \text{ (ppm)} = (M - B) \times N \times 14 \quad (2)$$

Dónde: Nppm = Recuperación de nitrógeno mineral en ppm; M = volumen gastado en ml de H₂SO₄ en las muestras (ml); B = volumen gastado en ml de H₂SO₄ en los blancos. (ml); N = normalidad del H₂SO₄.

Linealidad del método

Para el estudio de la Linealidad se preparó una curva de calibración de concentraciones 1ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm de la solución patrón, esta solución se preparó a partir de 1,180gr (NH₄)₂SO₄ y 1,805gr de KNO₃ para un volumen de 250ml el cual tiene una concentración de 1000 ppm de nitrógeno mineral.

Límite de detección (LD)

El Límite de Detección (LD) se determinó con el valor de nitrógeno mineral presente en el blanco, se realizó 4 réplicas al análisis, con los valores obtenidos se halló el promedio de nitrógeno mineral del blanco.

$$LD = \bar{x} (B) + 3,29 * S_B \quad (3)$$

Dónde: LD = es el límite de detección; $\bar{x} (B)$ = es el valor promedio de los blancos; S_B = es la desviación estándar del blanco, 3.29 cuando la incertidumbre del valor medio (esperado) del material testigo es insignificante.

Límite de Cuantificación (LQ)

Para evaluar el Límite de Cuantificación (LQ) se determinó el valor de nitrógeno mineral presente en el blanco, se efectuó 4 réplicas al análisis, con los valores obtenidos se halló el promedio de nitrógeno mineral del blanco.

$$LQ = \bar{x} (B) + 10 * S_B \quad (4)$$

Dónde: (LQ)=es el límite de cuantificación; $\bar{x} (B)$ =es el valor promedio de los blancos; S_B=es la desviación estándar del blanco; 10 que es una constante.

Exactitud

En el caso de la Exactitud se realizó la evaluación del error relativo y error absoluto. (Montufar, 2009). Se destiló 5 diferentes volúmenes (1, 2, 3, 4, 5 ml) de la solución patrón ya descrita anteriormente con 9 ml de KCl 2N más 0,2 g de MgO y 0,2 g de Aleación de Devarda en un matraz Erlenmeyer que contenía 10 ml de H₃BO₃. Posteriormente se tituló las muestras con H₂SO₄ 0,005N. Se realizó 5 diferentes corridas en diferentes días. Una vez obtenido los datos, se reemplazó en la Ecuación 2.

Tabla 1. Muestras seleccionadas para evaluar el parámetro de Precisión del método Kjeldahl

Característica	Código	Valoración	
pH	LAF - 139	Ácido	4,17
	LAF - 417	Neutro	7,43
	LAF - 119	Básico	8,64
Materia Orgánica	LAF - 139	Bajo	1,10
	LAF - 382	Medio	2,38
	LAF - 392	Alto	5,05
Textura	LAF - 119	Arcilloso	
	LAF - 381	Franco	
	LAF - 139	Franco arenoso	

Precisión

El parámetro de Precisión fue evaluado bajo condiciones de repetibilidad como el coeficiente de variación. (Montoya & Montoya, 2012).

Se seleccionó 9 muestras de suelo según la clasificación del pH como suelo ácido, neutro y básico, de igual manera para el caso de la materia orgánica se escogió de acuerdo con su contenido; bajo (menor al 2%), medio (2 – 4%) y alto (mayor al 4%), para el caso de la textura del suelo no se optaron por muestras con alguna

característica específica, solo se eligió las muestras disponibles. (Tabla 1).

RESULTADOS

Porcentaje de recuperación del equipo

Según los resultados obtenidos en la investigación se obtuvo un porcentaje de recuperación que está dentro del rango de aceptación que va desde un 96%-99% de recuperación (Figura 1).

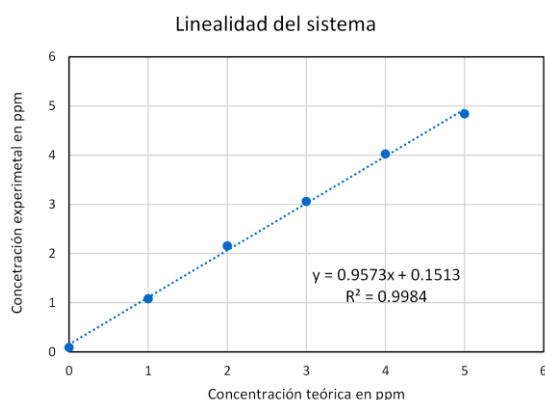
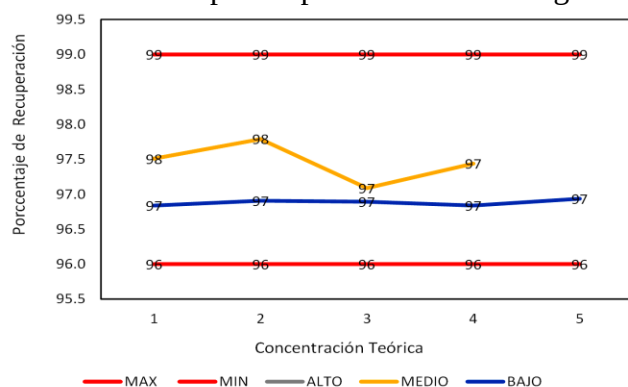


Figura 1. Recuperación del equipo de destilación y Linealidad del sistema

Linealidad del sistema

Se trabajaron con 5 concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 ppm). Se tomó como referencia de aceptación el valor de $R^2=0,9984$, este valor significa que los valores experimentales son cercanos a los valores teóricos (Figura 1).

Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ)

El Límite de Detección (LD) para el método de nitrógeno mineral hallado en la investigación fue de 0,108 ppm lo que indica que esta es la concentración mínima a la que puede ser detectado el nitrógeno mineral. En cambio, el límite de cuantificación (LC) para el método de nitrógeno mineral en la investigación fue de 0,142 ppm lo cual muestra que a esta concentración el nitrógeno mineral podrá ser cuantificado (Figura 2).

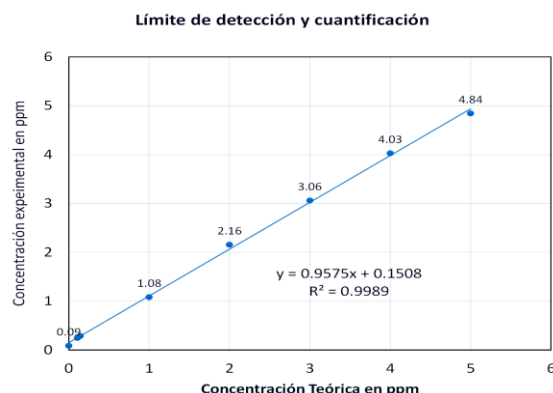


Figura 2. Límite de Detección y Cuantificación.

Exactitud

Los resultados numéricos obtenidos para el parámetro de Exactitud fueron valorados a partir de los datos del error absoluto y error

relativo al que fue sometido la solución patrón, estos datos fueron inferiores al 10% como fue establecido como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetro de Exactitud aplicado al método Kjeldahl.

Corrida	Replica	Valor teórico ppm	Valor exp. ppm	% Error relativo	%Error absoluto	Desviación	Media	CV%
1	1	1	1,087	8,71	0,09	0,002	1,08	0,21
	2	1	1,081	8,08	0,08			
	3	1	1,085	8,50	0,09			
	4	1	1,083	8,29	0,08			
	5	1	1,085	8,50	0,09			
2	1	2	2,161	8,05	0,16	0,019	2,16	0,90
	2	2	2,160	7,98	0,16			
	3	2	2,160	8,01	0,16			
	4	2	2,129	6,47	0,13			
	5	2	2,184	9,20	0,18			
3	1	3	3,059	1,97	0,06	0,008	3,06	0,26
	2	3	3,064	2,13	0,06			
	3	3	3,054	1,80	0,05			
	4	3	3,059	1,97	0,06			
	5	3	3,075	2,50	0,08			
4	1	4	3,972	0,71	0,03	0,032	4,03	0,79
	2	4	4,041	1,03	0,04			
	3	4	4,044	1,10	0,04			
	4	4	4,043	1,06	0,04			
	5	4	4,043	1,06	0,04			
5	1	5	4,842	3,16	0,16	0,002	4,84	0,05
	2	5	4,845	3,09	0,15			
	3	5	4,845	3,11	0,16			
	4	5	4,842	3,16	0,16			
	5	5	4,847	3,06	0,15			

Precisión

La Tabla 3 indica que el valor del coeficiente de variación resultó ser menor al

10% en las muestras seleccionadas de acuerdo con su pH (ácido, básico, neutro).

Tabla 3. Evaluación del parámetro de Precisión aplicado al Método Kjeldahl de acuerdo con el pH del suelo

CODIGO	CORRIDA	mg. N mineral/Kg Suelo	PROMEDIO	DESVIACION	%CV
LAF-139 PH=4,17	1	22,4	23,2	0,8	3,3
		23,1			
		23,1			
		24,5			
		23,1			
LAF-417 PH=7,43	2	8,4	8,5	0,6	6,9
		7,7			
		9,1			
		9,1			
		8,4			
LAF-119 PH=8,64	3	5,6	5,6	0,5	8,8
		5,6			
		4,9			
		5,6			
		6,3			

Los datos reflejados en la Tabla 4 fueron evaluados con muestras de suelo que han fueron seleccionadas según el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo (alto, medio y

bajo). Los datos alcanzados tienen un coeficiente de variación por debajo del 10% lo que significa que la metodología es aplicable en muestras con estas características.

Tabla 4. Evaluación del parámetro de Precisión aplicado al Método Kjeldahl de acuerdo con el contenido de materia orgánica en el suelo.

CODIGO	CORRIDA	mg. N. mineral/Kg S	PROMEDIO	DESVIACION	%CV
LAF-139 MO=1,10 (bajo)	1	22,4	23,3	0,9	3,8
		23,1			
		23,1			
		24,5			
LAF-382 MO=2,38 (medio)	2	5,6	5,9	0,5	9,3
		6,3			
		6,3			
		5,2			
LAF-392 MO=5,05 (alto)	3	13,3	14,0	0,6	4,1
		14,7			
		14,0			
		14,0			

La tabla 5 refleja los resultados del coeficiente de variación son aceptables por tener valores menores al 10%, lo que indica que

existe una variabilidad baja de datos. De acuerdo con estos datos se puede afirmar que la

metodología es aplicable para suelos con el tipo de textura en estudio.

Tabla 5. Evaluación del parámetro de Precisión aplicado al Método Kjeldahl de acuerdo con la textura del suelo.

CODIGO	CORRIDA	mg. N. mineral/Kg Suelo	PROMEDIO	DESVIACION	%CV
LAF-119 Arcilloso	1	5,1	5,7	0,5	8,7
		6,3			
		5,6			
		5,6			
LAF-381 Franco	2	7,0	7,2	0,7	9,3
		6,3			
		7,7			
		7,7			
LAF - 139 Franco arenoso	3	22,4	23,3	0,9	3,8
		23,1			
		23,1			
		24,5			

CONCLUSIONES

Todos los parámetros evaluados para la validación de la metodología mostraron valores satisfactorios lo que significa que se cumplió con el proceso de validación del método.

La linealidad del sistema presentó un coeficiente de correlación $R^2=0,9984$ lo que demuestra que se obtuvieron valores experimentales similares a los valores teóricos siendo este valor aceptable según el criterio de aceptación establecido.

Los ensayos realizados muestran que el Limite de Detección (LD) tuvo un valor de 0,108ppm y el Limite de Cuantificación (LC) fue igual a 0,142ppm.

En cuanto al parámetro de Exactitud y Precisión aplicados al método en estudio, ambos presentaron resultados inferiores al 10%, con estos valores se confirma que el método es exacto y preciso.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de la Facultad de Agronomía (LAFASA) de la facultad de Agronomía de la UMSA por el auspicio del presente trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, E., y Marín, M. A. (s/f). Manual de procedimientos analíticos para suelos y plantas. Laboratorio de suelos universidad del Magdalena. 51p.
- Guía Eurachem. (2005). Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 67p. Recuperado a partir de: http://cmap.upb.edu.co/rid=1SR8GPHG4-27FVCZV-15M/_Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf
- Heredia, O.S. (2005). Métodos de extracción y determinación de nitratos en suelos (Parte I). En Marbán L, Ratto S. Editores, AACS Técnicas en análisis de suelos: alcance a laboratorios agropecuarios.: 123-130. ISBN987-21419-I-6.
- IBNORCA. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- Miranda, R. y Caballero, A. (2015). Métodos y análisis del suelo. La Paz. Bolivia. UDIC. UMSA. 84 p.

- Montoya, D. y Montoya, L, F. (2012). Validación, cálculo de incertidumbre y determinación de la trazabilidad para los ensayos de nitrógeno Kjeldahl y nitrógeno amoniacal en el Laboratorio de química ambiental en la Universidad Tecnológica de Pereira. Tecnológica de Pereira.
- Montufar, N. J. (2009). Validación de cinco métodos analíticos utilizados en el laboratorio de control de calidad, de una planta de envasado de rones añejos. San Carlos de Guatemala.
- Roper, M. M., & Ophel-Kelller, K. M. (1998). Soil microflora as bioindications of soil health. In CE Pnakhurst; BM Doube y VV Gupta (eds). Biological indicators of soil health. 157-178.
- Yujra, E. y Miranda, R. (2019). Evaluación de la metodología Bray-Kurtz y Olsen para la determinación de fósforo disponible en suelos. *Apthapi*: Vol. 5, Núm. 1, Recuperado a partir de: <http://ojs.agro.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/322>