

DECRETO 17 giugno 2002

Metodi ufficiali di analisi per i fertilizzanti. (GU n. 220 del 19-9-2002)

L'ISPETTORE GENERALE REPRESSIONI FRODI

Visti gli articoli 8 e 9 della legge 19 ottobre 1984, n. 748, concernente: "Nuove norme per la disciplina dei fertilizzanti", i quali prescrivono che i concimi e gli ammendanti e correttivi vengano controllati con i metodi di campionamento e di analisi adottati con decreto del Ministro dell'agricoltura e delle foreste, sentito il parere della Commissione di cui agli articoli 110, 111, 112 del decreto del Presidente della Repubblica 12 febbraio 1965, n. 162;

Visto altresì l'art. 115 del citato decreto del Presidente della Repubblica 12 febbraio 1965, n. 162;

Vista la legge 7 agosto 1986, n. 462, con la quale è stato, tra l'altro, istituito l'Ispettorato centrale per la repressione frodi per l'esercizio delle funzioni inerenti alla prevenzione e alla repressione delle infrazioni nella preparazione e commercio dei prodotti agro-alimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale;

Visto l'art. 3 della legge 9 marzo 2001, n. 49, riguardante "Ulteriori interventi per fronteggiare l'emergenza derivante dall'encefalopatia spongiforme bovina", secondo il quale, nell'ambito delle disposizioni in materia di controlli e di personale, l'Ispettorato centrale repressione frodi, posto alle dirette dipendenze del Ministro delle politiche agricole e forestali, opera con organico proprio ed autonomia organizzativa ed amministrativa e costituisce un autonomo centro di responsabilità di spesa;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 18 gennaio 1988 che, tra le funzioni attribuite alle Divisioni dell'Ispettorato centrale repressione frodi, prevede l'elaborazione e l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agro-alimentari e le sostanze di uso agrario e forestale;

Visti i decreti ministeriali 24 marzo 1986, 19 luglio 1989, 23 gennaio 1991, 10 marzo 1993, 28 settembre 1993, 5 dicembre 1995 e 21 dicembre 2000, relativi all'approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i fertilizzanti", pubblicati rispettivamente nei supplementi ordinari alla Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 180 del 5 agosto 1986, n. 196 del 23 agosto 1989, n. 29 del 4 febbraio 1991, nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 73 del 29 marzo 1993, nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 238 del 9 ottobre 1993, nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 18 del 23 gennaio 1996 e nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 21 del 26 gennaio 2001;

Sentito il parere della sopracitata Commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi, sottocommissione fertilizzanti, rinnovata col decreto ministeriale 20 settembre 2000, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 236 del 9 ottobre 2000, modificata da ultimo, per quanto attiene la sottocommissione fertilizzanti, col decreto ministeriale 28 settembre 2000, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana

n. 249 del 24 ottobre 2000;

Visto il decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165, concernente norme generali sull'ordinamento del lavoro alle dipendenze delle amministrazioni pubbliche;

Ritenuto necessario aggiornare i metodi di analisi approvati con i succitati decreti ministeriali;

Vista la direttiva 98/34/CE, concernente le procedure d'informazione nel settore delle norme e regolamentazioni tecniche, e successive modificazioni, attuata con decreto legislativo 23 novembre 2000, n. 427;

Decreta:

Art. 1.

1. Sono approvati i "Metodi ufficiali di analisi per i fertilizzanti - supplemento n. 7" descritti nell'allegato al presente decreto.

2. I metodi di analisi riportati in allegato al presente decreto si applicano ai concimi nazionali.

Art. 2.

Il presente decreto sarà inviato al competente organo di controllo per la registrazione ed entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 17 giugno 2002

L'Ispettore generale capo: Lo Piparo

Allegato

(di cui all'art. 1)

ESTRAZIONE DEI FOSFATI SOLUBILI IN ACQUA E CITRATO AMMONICO NEUTRO

1. Oggetto

Il presente documento fissa le modalità esecutive e le condizioni per la estrazione in sequenza dei fosfati solubili in acqua e in citrato ammonico neutro operando sulla stessa pesata del campione in esame.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica a tutti i concimi organo-minerali per i quali in etichetta venga dichiarata l'anidride fosforica solubile in acqua e citrato ammonico neutro, nonché le singole solubilità, qualora vengano dichiarate.

3. Principio

I fosfati solubili in acqua vengono estratti mediante percolazioni successive. I fosfati solubili in citrato ammonico neutro vengono estratti a caldo dal residuo dell'estrazione con acqua, mediante la soluzione citrico ammoniacale.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi impiegare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Soluzione neutra di citrato ammonico preparata come descritto al punto 4.1. del Metodo 3.1.4. riportato nella Parte I della raccolta dei metodi ufficiali di analisi (metodi di analisi

comunitari).

4.2. Acido nitrico diluito 1 + 1.

5. Apparecchiatura

5.1. Imbuti di vetro Ø 7,5 cm con insenature interne per filtrazioni rapide, angolo 60.

5.2. pHmetro.

5.3. Matracci tarati da 500 ml.

5.4. Bagno termostatico capace di mantenere la temperatura di 65 °C, munito di un adatto agitatore (vedere ad es. fig. 8 citata nel metodo 3.1.4).

5.5. Filtri rapidi tipo Supervelox o equivalenti. In caso di particellato molto fine ricorrere a filtri tipo Schleicher & Schüll 5892 Ø cm 9 o equivalenti.

6. Procedimento

Pesare 1 g (con l'approssimazione di 0,001 g) di campione preparato secondo quanto previsto dal Metodo 1 riportato nella Parte I della raccolta dei metodi ufficiali d'analisi.

6.1. Estrazione dei fosfati solubili in acqua.

Trasferire il campione sul filtro tarato da 9 cm di diametro (5.5.), convenientemente preparato sull'imbuto (5.1.), e lavare per gravita' con acqua mediante piccole aliquote successive fino a circa 400 ml di filtrato; raccogliere il filtrato in un matraccio da 500 mL (5.3.) contenente 5 mL di HNO in base 3 (4.2.).

Lasciare che ciascuna frazione di liquido passi completamente attraverso il filtro prima di effettuare la nuova aggiunta. Terminato l'ultimo lavaggio, rimuovere il filtro contenente il residuo insolubile in acqua; lavare l'imbuto con acqua, portare a volume e agitare. L'operazione descritta deve avvenire entro 1 ora.

6.2. Estrazione dei fosfati solubili in citrato.

6.2.1. Preparazione dell'estratto citro-ammoniacale.

Dopo il trattamento con acqua, entro 1 ora trasferire il filtro e il residuo, ottenuti a seguito dell'estrazione 6.1. in una beuta da mL 200 o 250 contenente mL 100 della soluzione di citrato ammonico (4.1.) previamente scaldata a 65 °C. Chiudere ermeticamente la beuta con un tappo di gomma tenera, agitare vigorosamente, poi togliere per un momento il tappo per equilibrare la pressione. Immergere la beuta nel bagnomaria (5.4.) e fissarla all'agitatore. Durante l'agitazione il livello della sospensione nella beuta dovrà costantemente essere al di sotto del livello dell'acqua del bagnomaria. L'agitazione meccanica sarà tale da mantenere sempre in sospensione il materiale (N.B.: in mancanza di un agitatore meccanico, si può agitare a mano ogni 5 minuti).

Esattamente 1 ora dopo l'aggiunta del filtro e del residuo, togliere la beuta dal bagnomaria e filtrare immediatamente su un filtro tarato da 9 cm di diametro (5.5.) convenientemente preparato su imbuto in vetro (5.1.), in un matraccio tarato da 500 mL (5.3.). Al fine di un recupero quantitativo, lavare il filtro ed il residuo rimasti ancora nella beuta di estrazione con piccole aliquote di acqua a 65 °C, fino a 400 ml di filtrato, trasferendo ogni volta sul filtro di raccolta, assicurandosi che il filtro rimasto nella beuta sia completamente schiarito al termine dei lavaggi da tutte le

sostanze coloranti eventualmente provenienti dal concime organo-minerale. Al termine dell'ultimo lavaggio, lasciare raffreddare e poi portare a volume con acqua e agitare. Un eventuale intorbidamento che dovesse verificarsi durante o dopo i lavaggi con acqua, dovuto a fenomeni di idrolisi, non ha importanza ai fini dell'esattezza dell'analisi e vi si potrà ovviare aggiungendo al filtrato, prima di portare a volume, 1-2 mL di acido nitrico diluito (4.2.).

6.3. Dosaggio.

Prelevare con pipetta di precisione uguali aliquote di estratto acquoso (6.1.) e di estratto in citrato (6.2.) in modo che, in totale, la quantità di P in base 2 O in base 5 presente sia circa pari a 0,010 g e poi procedere alla determinazione dei fosfati secondo il Metodo n. 3.2 riportato nella Parte I della raccolta dei metodi ufficiali di analisi.

6.4. In tabella 1 vengono riportate le aliquote da prelevare in funzione dei titoli dichiarati in P in base 2 O in base 5 solubile in acqua e citrato ammonico neutro dei concimi organominerali.

Tabella 1

		Diluizione in mL		Prelievi degli			
				estratti in mL			
% P in base 2	Pesata	-----		-----		Totale	
O in base 5	in g			in		mL	
dichiarato		acqua	citrato	acquoso	citrato		
			neutro				
-----		-----	-----	-----	-----	-----	
5-10....	1	500	500	50	50	100	
10-25....	1	500	500	25	25	50	
> 25....	1	500	500	10	10	20	

DETERMINAZIONE DI CADMIO, CROMO, RAME, NICHEL E ZINCO TOTALI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione di cadmio, cromo, rame, nichel e zinco estraibili mediante trattamento con acqua regia.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai concimi nazionali, agli ammendanti ed ai correttivi.

3. Principio

La solubilizzazione dei metalli viene effettuata con soluzione nitrico-cloridrica a caldo.

La determinazione dei metalli estratti viene effettuata mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma.

Gli elementi normalmente presenti nei fertilizzanti non creano significative interferenze in questa determinazione.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi impiegare acqua distillata o

demineralizzata di purezza equivalente e reattivi di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Acido cloridrico concentrato HCl al 37% ($\rho = 1,186$)

4.2. Acido cloridrico, soluzione 1:1

Diluire 500 mL di acido cloridrico (4.1) con 500 mL di acqua.

4.3. Acido cloridrico, soluzione 10 mL/L.

Diluire 10 mL di acido cloridrico (4.1.) in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua fino a volume.

4.4. Acido nitrico concentrato, HNO₃ in base 3, al 65% ($\rho = 1,40$)

4.5. Acido nitrico, soluzione 1:1

Diluire 500 mL di acido nitrico (4.4.) con 500 mL di acqua.

4.6. Acido nitrico, soluzione 10 mL/L:

Diluire 10 mL di acido nitrico (4.4.) in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua fino a volume.

4.7. Soluzione di lantanio (10 g/L).

Utilizzare tale reattivo per il dosaggio dello zinco. Porre, in un matraccio tarato da 1 L, 11,73 g di lantanio ossido (La in base 2 O in base 3), unitamente a 150 mL di acqua. Aggiungere quindi con cautela 100 mL di acido cloridrico al 37 % (4.1.), mescolare e portare a volume di 1 L con acqua.

4.8. Cadmio, soluzione di riferimento a 1000 mg/L di Cd.

Pesare 1,000 g di cadmio metallico purissimo in un bicchiere da 250 mL. Aggiungere lentamente 50 mL di acido cloridrico 1:1 (4.2.), far reagire a temperatura ambiente per 30 min. e quindi completare la dissoluzione ponendo il bicchiere su piastra calda. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acido cloridrico 10 mL/L (4.3.). Tappare ed omogeneizzare.

4.9. Cromo, soluzione di riferimento a 1000 mg/L di Cr.

Pesare 3,735 g di potassio cromato, (K in base 2 CrO in base 4), previamente essiccato a 130 °C per due ore, in un matraccio tarato da 1000 mL, solubilizzare e portare a volume con acqua. Tappare ed omogeneizzare.

4.10. Rame, soluzione di riferimento a 1000 mg/L di Cu.

Pesare 1,000 g di rame metallico purissimo in un bicchiere da 250 mL, aggiungere lentamente 50 mL di acido nitrico 1:1 (4.5.), far reagire a temperatura ambiente per 30 min. e quindi completare la dissoluzione ponendo il bicchiere su piastra calda. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acido nitrico 10 mL/L (4.6.). Tappare ed omogeneizzare.

4.11. Nichel, soluzione di riferimento a 1000 mg/L di Ni.

Pesare 1,000 g di nichel metallico purissimo in un bicchiere da 250 mL, aggiungere lentamente 50 mL di acido nitrico 1:1 (4.5.), far reagire a temperatura ambiente per 30 min. e quindi completare la dissoluzione ponendo il bicchiere su piastra calda. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acido nitrico 10 mL/L (4.6.). Tappare ed omogeneizzare.

4.12. Zinco, soluzione di riferimento a 1000 mg/L di Zn.

Pesare 1,000 g di zinco metallico purissimo in un bicchiere da 250 mL, aggiungere lentamente 50 mL di acido cloridrico 1:1 (4.2.), far reagire a temperatura ambiente per 30 min. e quindi completare la

dissoluzione ponendo il bicchiere su piastra calda. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acido cloridrico 10 mL/L (4.3.). Tappare ed omogeneizzare.

Nota: E' possibile utilizzare, in alternativa, soluzioni standard in commercio a titolo garantito (1000 mg/L) di cadmio, cromo, rame, nichel e zinco.

4.13. Soluzioni di riferimento intermedie.

Prelevare, con buretta di precisione, dalle soluzioni di riferimento, le aliquote indicate nella seconda colonna della tabella 1 ponendole in un solo matraccio da 500 mL. Portare a volume con acqua, tappare ed omogeneizzare. La soluzione così ottenuta ha le concentrazioni indicate nella terza colonna della tabella 1.

Tabella 1
SOLUZIONE DI RIFERIMENTO INTERMEDIA

Soluzione di riferimento	Aliquota da prelevare (mL)	Concentrazione raggiunta
4.8.	12,5	25 mg/L Cd
4.9.	25,0	50 mg/L Cr
4.10.	25,0	50 mg/L Cu
4.11.	25,0	50 mg/L Ni
4.12.	12,5	25 mg/L Zn

4.14 Soluzioni di riferimento finali.

Prelevare, con buretta di precisione, dalle soluzioni riportate in 4.13., le tre aliquote indicate in tabella 2, ponendole in altrettanti matracci tarati da 500 mL.

Aggiungere a ciascun matraccio 1 mL di acido nitrico concentrato (4.4.).

Nel caso della soluzione 4.12., aggiungere 10 mL di soluzione di lantanio 10 g/L (4.8.).

Portare quindi a volume di 500 mL con acqua. Tappare ed omogeneizzare.

Le soluzioni ottenute sono stabili per circa un mese ed hanno le concentrazioni indicate nella tabella 2.

Tabella 2
SOLUZIONI DI RIFERIMENTO FINALI

Metallo	Concentrazione raggiunta, mg/L		
	Aliquota da prelevare		
	10 mL	20 mL	40 mL

	----- ----- ----- -----
Cd....	0,5 1,0 2,0
Cr....	1,0 2,0 4,0
Cu....	1,0 2,0 4,0
Ni....	1,0 2,0 4,0
Zn....	0,5 1,0 2,0

5. Apparecchiatura

Tutta la vetreria graduata utilizzata per l'esecuzione di questa analisi deve avere una precisione certificata almeno equivalente alla classe "B", meglio se di classe "A".

5.1. Piastra riscaldante.

5.2. Refrigerante di Liebig.

5.3. Spettrofotometro per assorbimento atomico, dotato di correttore del fondo.

5.4. Lampade e catodo cavo per gli elementi da determinare.

5.5. Gas per l'alimentazione della fiamma (aria o protossido di azoto e acetilene).

6. Procedimento

6.1. Dissoluzione del campione

Pesare 5 g di campione, preparato secondo quanto previsto dal Metodo A riportato nella Parte II della raccolta dei metodi ufficiali di analisi, in beuta di Erlenmeyer da 250 mL con collo smerigliato, umettare il campione con pochi mL di acqua, aggiungere 21 mL di HCl (4.1.) e 7 mL di HNO in base 3 (4.4.).

Applicare il refrigerante (5.2.) e lasciare a riposo una notte.

Scaldare per due ore su piastra (5.1.) in modo che la zona di riflusso si collochi a circa 1/3 della lunghezza della canna del refrigerante.

Interrompere il riscaldamento, lasciare a riposo fino a cessata ebollizione e lavare la canna del refrigerante con 10 mL di acido nitrico soluzione (4.6). Travasare quantitativamente la sospensione in matraccio tarato da 100 mL, raffreddare e portare a volume con acqua.

Omogeneizzare accuratamente, lasciare decantare e sottoporre ad analisi la fase liquida.

Preparare contemporaneamente una prova in bianco con i soli reagenti.

6.2. Curva di taratura

Preparare la curva di calibrazione utilizzando le seguenti lunghezze d'onda:

Cadmio.. 228,8 nm

Cromo... 357,9 nm

Rame.... 324,8 nm

Nichel.. 232,0 nm

Zinco... 213,9 nm

Predisporre sullo strumento la lampada specifica per l'elemento da dosare selezionando la lunghezza d'onda sopra riportata.

Azzerare lo spettrofotometro con una soluzione preparata diluendo 1 mL di acido nitrico concentrato (4.4.) a 500 mL con acqua.

Rilevare di seguito le assorbanze delle soluzioni di riferimento

e costruire la curva di taratura riportando su carta millimetrata in ordinata le assorbanze ed in ascissa le relative concentrazioni.

Avvertenze: Per l'analisi del cromo utilizzare una fiamma protossido di azotoacetilene, Per gli altri elementi la fiamma aria-acetilene.

Definire per lo strumento in dotazione condizioni tali da rispettare la proporzionalità tra l'assorbanza e la concentrazione delle soluzioni di cui al punto 4.14.

6.3. Dosaggio

Rilevare di seguito le assorbanze delle soluzioni in esame dopo avere effettuato, se necessario, le eventuali diluizioni.

Riportare i valori di assorbanza sulla curva di calibrazione e leggere i corrispondenti valori di concentrazione.

7. Espressione dei risultati

La quantità di metalli estratti, presente nel campione in esame ed espressa come milligrammi di singolo metallo (C) per chilogrammo, viene calcolata applicando la seguente espressione:

$$C = \frac{A \cdot V \cdot D \cdot 1000}{P}$$

dove:

C = concentrazione del metallo nel campione, espressa in mg/kg;

A = concentrazione del metallo, espressa in mg/L, ricavata dalla curva di calibrazione;

V = volume, espresso in litri, della soluzione in esame (= 0,1);

D = fattore di diluizione;

P = massa del campione sottoposto ad analisi, espressa in grammi.

Nota:

Riportare il dato analitico con una cifra decimale se la concentrazione è compresa tra 1 e 20 mg/kg.

Riportare il dato analitico senza cifra decimale se la concentrazione è superiore a 20 mg/kg.

8. Limiti di rilevabilità

Nelle condizioni di riferimento riportate nel presente metodo, i limiti di rilevabilità sono i seguenti:

Cadmio.. 1 mg/kg

Cromo... 8 mg/kg

Rame.... 2 mg/kg

Nichel.. 8 mg/kg

Zinco... 1 mg/kg

DETERMINAZIONE DEL PIOMBO TOTALE NEI FERTILIZZANTI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del piombo totale, considerando come tale il piombo estraibile con acqua regia.

2. Campo di applicazione

Il metodo e' applicabile ai concimi nazionali, agli ammendanti ed ai correttivi.

3. Principio

La solubilizzazione del metallo viene effettuata con soluzione nitrico-cloridrica a caldo.

La determinazione del metallo estratto viene effettuata mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualita' analitica riconosciuta.

4.1. Acido cloridrico, HCl, al 37% ($\rho = 1,186$).

4.2. Acido nitrico, HNO in base 3, al 65% ($\rho = 1,40$).

4.3. Acido nitrico, HNO in base 3, soluzione 1:1.

Diluire 500 mL di HNO in base 3 (4.2.) con 500 mL di acqua.

4.4. Acido nitrico, HNO in base 3, soluzione 10 mL/L

Diluire 10 mL di HNO in base 3, (4.2.) in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua sino a volume.

4.5. Piombo, soluzione standard a 1000 mg/L di Pb.

Pesare g 1 di piombo metallico purissimo con la precisione di 1 mg e porlo in un becher da 250 mL. Aggiungere lentamente 50 mL di HNO in base 3 (4.3.), far reagire a temperatura ambiente per 30 minuti e quindi completare la dissoluzione ponendo il becher su piastra calda. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con HNO in base 3 (4.4.). Tappare e omogeneizzare.

Nota: E' possibile utilizzare, in alternativa, una soluzione standard di piombo in commercio a titolo garantito (1000 mg/L).

4.6. Soluzione di riferimento intermedia

Dalla soluzione (4.5.) prelevare con una buretta da 50 mL (div. 1/10), 50 mL da trasferire in un matraccio da 500 mL. Portare a volume con HNO in base 3 (4.4.) ed omogeneizzare. La soluzione contiene 100 mg/L di Pb.

4.6.1. Soluzioni di riferimento finali

Dalla soluzione 4.6. prelevare con una buretta da 50 mL 10-20-30 mL da trasferire in altrettanti matracci da 250 mL. Aggiungere a ciascun matraccio 5 mL di HNO in base 3 (4.2.) e portare a volume con acqua. Tappare ed omogeneizzare. Le soluzioni ottenute contengono rispettivamente 4-8-12 mg/L di Pb. Se conservate in bottiglie di polietilene, le soluzioni sono stabili un mese.

5. Apparecchiatura

5.1. Piastra riscaldante.

5.2. Refrigerante di Liebig.

5.3. Spettrofotometro ad assorbimento atomico dotato di sistema di correzione del fondo.

5.4. Lampada a catodo cavo per piombo.

5.5. Gas per l'alimentazione della fiamma (protossido di azoto - acetilene).

6. Procedimento

6.1. Preparazione del campione per l'analisi.

Preparare il campione secondo quanto previsto dal Metodo A

riportato nella Parte II della raccolta dei metodi ufficiali di analisi.

6.2. Dissoluzione del campione

Pesare 5 g di campione in beuta da 250 mL con collo smerigliato, umettare il campione con pochi mL di acqua, aggiungere 21 mL di HCl (4.1.) e 7 mL di HNO in base 3 (4.2.). Applicare il refrigerante e lasciare a riposo una notte. Scaldare per 2 ore su piastra (5.1.) in modo che la zona di riflusso si collochi a circa 1/3 della lunghezza della canna del refrigerante. Interrompere il riscaldamento, lasciare a riposo fino a cessata ebollizione e lavare la canna del refrigerante con 10 mL di HNO in base 3 (4.4.). Travasare quantitativamente la sospensione in un matraccio da 100 mL, raffreddare e portare a volume con acqua.

Omogeneizzare accuratamente, filtrare su filtro a basso contenuto di ceneri scartando le prime frazioni filtrate e quindi sottoporre ad analisi la fase limpida.

Preparare contemporaneamente un bianco con i soli reattivi.

6.3. Curva di taratura.

Predisporre sullo strumento la lampada specifica del piombo selezionando la lunghezza d'onda di 217 nm ed attivare il sistema di correzione del fondo. Azzerare lo strumento con la soluzione in bianco.

Rilevare le assorbanze delle soluzioni di riferimento (4.6.1.) e costruire la curva di taratura riportando su carta millimetrata, in ordinata le assorbanze ed in ascissa le relative concentrazioni.

6.4. Dosaggio.

Rilevare di seguito le assorbanze delle soluzioni in esame dopo avere effettuato, se necessario, le eventuali diluizioni.

Riportare i valori di assorbanza sulla curva di taratura e leggere i corrispondenti valori di concentrazione.

7. Espressione dei risultati

Il contenuto di Pb si esprime in mg/kg, con arrotondamento all'unità e viene calcolato utilizzando la seguente espressione:

$$Pb = \frac{A \cdot V \cdot D \cdot 1000}{P}$$

dove:

A = concentrazione del metallo, espressa in mg/L, ricavata dalla curva di taratura;

V = volume, espresso in litri, della soluzione in esame;

D = fattore di diluizione;

P = massa del campione sottoposto ad analisi, espressa in grammi.

8. Limiti di rilevabilità

Nelle condizioni standard sopra riportate, il limite di rilevabilità del Pb è pari a 8 mg/kg. Alla concentrazione di 30 mg/kg, i valori di analisi replicate devono essere compresi

nell'intervallo 30 ± 3 mg/kg. Nel caso di variabilità più elevata, occorre ripetere l'analisi ripartendo dalla pesata.

RICONOSCIMENTO DI TORBE, LEONARDITI E LIGNITI NEI FERTILIZZANTI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per il riconoscimento di torbe, leonarditi e ligniti nei fertilizzanti.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli ammendanti organici naturali.

3. Principio

Il riconoscimento si basa sulle differenze del profilo elettroforetico ottenuto per isoelettrofocalizzazione della sostanza organica estratta in sodio idrossido + sodio pirofosfato.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Sodio idrossido, NaOH, > 99%.

4.2. Sodio pirofosfato decaidrato, Na in base 4 P in base 2 O in base 7 · 10 H in base 2 O, > 99%.

4.3. Soluzione di NaOH 0,1 M e Na in base 4 P in base 2 O in base 7 · 10 H in base 2 O 0,1 M.

Pesare 4 g di NaOH (4.1.) e 44,6 g di Na in base 4 P in base 2 O in base 7 (4.2.) con una precisione di 0,01 g e porli in un matraccio tarato da 1000 mL, aggiungere circa 600 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. Questa soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.4. Acrilammide, CH in base 2 CHCONH in base 2, > 99,9%.

4.5. N,N'-metilene bisacrilammide (Bis), CH in base 2 CHCONHCH in base 2 NHCOCHCH in base 2, > 99,9%.

4.6. Soluzione di acrilammide: Bis 37,5:1 (30%T, 2,6%C).

Pesare 29,22 g di acrilammide (4.4.) e 0,78 g di Bis (4.5.) con una precisione di 0,001 g e porli in un matraccio tarato da 100 mL, aggiungere circa 70 mL di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione, portare a volume, omogeneizzare perfettamente e filtrare su carta. Conservare in un contenitore in polietilene a + 4 °C al massimo per 30 giorni.

4.7. Ampholine(r) a pH 3,5-5,0 Pharmacia LKB (80-1125-89), 0,4 g/mL.

4.8. Ampholine(r) pH 4,0-6,0 Pharmacia LKB (80-1125-90), 0,4 g/mL.

4.9. Ampholine(r) pH 6,0-8,0 Pharmacia LKB (60-1125-93), 0,4 g/mL.

4.10. N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina (TEMED), (CH in base 3) in base 2 NCH in base 2 CH in base 2 N(CH in base 3) in base 2.

4.11. Soluzione di TEMED al 3% v/v

Diluire 6 mL di TEMED (4.10.) in un matraccio tarato da 50 mL con acqua. Conservare al buio a +4 °C al massimo per 2 mesi.

4.12. Ammonio persolfato, (NH in base 4) in base 2 S in base 2 O in base 8, 98%.

4.13. Soluzione di ammonio persolfato 1,5% p/v

Pesare 0,15 g di ammonio persolfato (4.12.) con una precisione di 0,001 g, porli in un matraccio tarato da 10 mL, portare a volume con acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Questa soluzione deve essere preparata fresca ogni volta.

4.14. Soluzione di sodio idrossido 0,2 M (catodo)

Pesare 0,8 g di sodio idrossido (4.1.) con una precisione di 0,001 g e metterlo in un matraccio tarato da 100 mL, portare a volume con acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione. Filtrare su carta e conservare in un contenitore di polietilene a + 4 °C al massimo per 2 mesi.

4.15. Acido o-fosforico, H in base 3 PO in base 4, 85% (rho =1,71).

4.16. Soluzione di acido o-fosforico 0,2 M (anodo)

Diluire 1,35 mL di acido o-fosforico (4.15.) in un matraccio tarato da 100 mL con acqua. Filtrare su carta e conservare in un contenitore di polietilene a +4 °C al massimo per 2 mesi.

4.17. Repel-Silane(r) ES, dimetildiclorosilano al 2% (p/v) in ottometil ciclo-ottosilano, Pharmacia (17-1332-01).

4.18. Etanolo, C in base 2 H in base 5 OH, 95 %.

4.19. Acido acetico glaciale, CH in base 3 COOH, 100%.

4.20. Blu brillante R-250 Coomassie, C in base 45 H in base 44 N in base 3 NaOH, S in base 2.

4.21. Rame (II) solfato pentaidrato, CuSO in base 4.5 H in base 2 O, > 99,5%.

4.22. Soluzione colorante: Blue R-250 0,025%, CuSO in base 4 1%, etanolo 15%, acido acetico 15%

Pesare 10 g di CuSO in base 4 (4.21.) con una precisione di 0,01 g, porli in un matraccio tarato da 1.000 mL, aggiungere 400 mL di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Pesare 0,25 g di Blue R-250 (4.20.) con una precisione di 0,001 g e aggiungerlo al matraccio contenente la soluzione di CuSO in base 4, aggiungere 150 mL di etanolo (4.18.), 150 mL di acido acetico (4.19.), agitare con un agitatore magnetico rotante fino alla completa dissoluzione del colorante, portare a volume con acqua e omogeneizzare. Filtrare su carta e conservare in un contenitore in vetro con chiusura ermetica. Se correttamente conservata questa soluzione ha una durata di 2 mesi, ovvero deve essere comunque sostituita dopo la colorazione di 5 piastre.

4.23. Soluzione fissante: Blue R-250 0,0025%, CuSO in base 4 1%, etanolo 15%, acido acetico 15%.

Pesare 10 g di CuSO in base 4 (4.21.) con una precisione di 0,01 g, mettere in un matraccio tarato da 1.000 mL, aggiungere 400 mL di acqua, agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione del sale. Pesare 0,025 g di Blue R-250 (4.20.) con una precisione di 0,001 g e aggiungerlo al matraccio contenente la soluzione di CuSO in base 4, aggiungere 150 mL di etanolo (4.18.) e 150 mL di acido acetico (4.19.), agitare con un agitatore magnetico rotante fino alla completa dissoluzione del colorante, portare a volume con acqua. Filtrare su carta e conservare in un contenitore in vetro con chiusura ermetica. Se correttamente conservata questa soluzione ha

una durata di 2 mesi, ovvero deve essere comunque sostituita dopo la colorazione di 5 piastre.

4.24. Soluzione decolorante: etanolo 10%, acido acetico 10%.

Diluire 100 mL di etanolo (4.18.) e 100 mL di acido acetico (4.19.) in un matraccio tarato da 1.000 mL con acqua, agitare dolcemente fino alla completa omogeneizzazione. Conservare in un contenitore di polietilene con chiusura ermetica al massimo per 2 mesi.

4.25. Acido cloridrico, HCl, 35% (p/p).

4.26. Soluzione di acido cloridrico 3 M.

Diluire 250 mL di acido cloridrico (4.25.) in un matraccio tarato da 1.000 mL con acqua, agitare dolcemente fino alla completa omogeneizzazione. Conservare in un contenitore di polietilene con chiusura ermetica al massimo per 2 mesi.

5. Apparecchiatura

5.1. Tubi da dialisi in cellulosa rigenerata con pori di dimensioni molecolari nominali di 1.000 daltons.

5.2. Liofilizzatore.

5.3. Lastre in vetro 125x260x3 mm.

5.4. Lastre in vetro 125x260x3 mm con guarnizione a U dello spessore di 0,5 mm.

5.5. Pinze (n. 4) con guarnizioni in gomma per lastre dello spessore 0,5 mm.

5.6. GelBond(r) PAG film, 124x258 mm, con una superficie idrofila ed una idrofoba, Pharmacia (80-1129-36).

5.7. Cella elettroforetica orizzontale con piatto refrigerabile in ceramica 210x270 mm ed elettrodi al platino.

5.8. Criostato a circolazione di acqua del tipo con capacita' refrigerante 200 W a 5 oC, capacita' pompa: pressione 0,3 bar, flusso = 12 L/min, intervallo di lavoro: -10 ÷ + 90 oC.

5.9. Alimentatore, intervallo di tensione: 35-3500 V, corrente massima: 400 mA, potenza massima 200 W.

5.10. IEF electrode strip, Pharmacia (18-1013-73).

5.11. pHmetro dotato di elettrodo per misure di superficie.

5.12. Densitometro laser ($\lambda = 633$ nm).

5.13. Fogli di cellophane 210x320 mm, Pharmacia (80-1129-38).

6. Procedimento

6.1 Preparazione del campione per l'analisi.

Preparare il campione secondo quanto previsto dal Metodo A riportato nella Parte II della raccolta dei metodi ufficiali di analisi.

6.2 Estrazione della sostanza organica.

Estrarre la sostanza organica secondo quanto previsto dal decreto ministeriale 21 dicembre 2000 "Metodi ufficiali di analisi dei fertilizzanti. Supplemento n. 6" Gazzetta Ufficiale n. 21 del 26 gennaio 2001.

6.3 Purificazione della sostanza organica estratta.

Neutralizzare 20 mL di estratto (6.2.) con HCl (4.26.), quindi porre la soluzione in un tubo da dialisi (5.1.) lungo circa 30 cm e immergere un'estremita' all'interno di una vasca contenente acqua. Cambiare l'acqua della vasca ogni 12 ore per almeno 3 giorni.

Controllare il termine della dialisi verificando con una cartina al tornasole che il pH dell'estratto contenuto nel tubo e quello della acqua nella vasca siano uguali. Terminata la dialisi, liofilizzare (5.2.) la sostanza organica estratta e purificata. Pesare 5 mg di liofilizzato, porli in una microprovetta tipo Eppendorf da 1,5 mL e aggiungere 1 mL di acqua, agitare dolcemente fino alla dissoluzione del liofilizzato, conservare a -16 °C. I campioni possono essere conservati fino a 2 mesi.

6.4 Preparazione della piastra.

Fare aderire alla lastra in vetro (5.3.) la faccia idrofoba del supporto per gel tipo GelBond (5.5.) con alcune gocce d'acqua. Montare la piastra unendo la faccia trattata con il Repel silane (4.18.) della lastra dalla guarnizione a U (5.4.) con la faccia della lastra di vetro (5.3.) dove è stato fatto aderire il GelBond bloccando la piastra con le apposite pinze (5.5.).

6.5. Preparazione del gel di poliacrilammide (5%T, 2,6%C).

In una beuta da 150 mL mettere nell'ordine: 4,15 mL di soluzione di acrilammide-Bis (4.7.), 0,72 mL di Ampholine 3,5-5,0 (4.8.), 0,24 mL di Ampholine 4,0-6,0 (4.9.), 0,24 mL di Ampholine 6,0-8,0 (4.10.), 0,35 mL di soluzione di TEMED (4.12.), 18,4 mL di acqua e 0,9 mL di soluzione di ammonio persolfato (4.14.); mescolare bene per circa un minuto senza provocare la formazione di bolle d'aria all'interno della soluzione, eventualmente insufflare azoto per un minuto. Versare molto lentamente la soluzione nella fessura della piastra con una pipetta o una siringa evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciare gelificare al buio, a temperatura ambiente per 1 ora. Conservare al buio a +4 °C al massimo per 48 ore.

6.6. Isoelettrofocalizzazione.

Reidratare il gel (6.5.) versando alcune gocce d'acqua nella fessura della piastra.

Disporre il gel nella cella elettroforetica (5.7.) mantenendola a +2 °C con il criostato (5.8.), disporre sul gel due strisce di strip (5.10.) ai due bordi lunghi del gel, una (catodo) imbibita con la soluzione di sodio idrossido (4.15.) e l'altra (anodo) con la soluzione di acido fosforico (4.17.), collegare gli elettrodi della cella con gli strip e chiudere il circuito. Accendere l'alimentatore (5.9.) della cella e impostare le seguenti condizioni di precorsa:

- tensione (massima): 1.200 V;
- intensità: 0,9 mA/cm;
- potenza: 0,6 W/cm;
- tempo: 3 ore.

Trascorse le 3 ore di precorsa, interrompere l'alimentazione, disporre sul gel, a circa 0,5 cm dallo strip contenente la soluzione di sodio idrossido (catodo), dei rettangoli di strip lunghi circa 1 cm e distanti l'uno dall'altro circa 0,5 cm, deporre 20-50 µL di campione (6.3.), portare a completa imbibizione i rettangoli di strip con acqua, rimontare la cella, riaccendere l'alimentare e impostare le seguenti condizioni di corsa:

- tensione (massima): 1.200V;
- intensità: 0,9 mA/cm;
- potenza: 0,6 W/cm;

- tempo: 2 ore.

Trascorse le 2 ore interrompere l'alimentazione, togliere il gel dalla cella e misurare, con il piaccametro (5.11.), il pH della superficie del gel facendo letture ad intervalli di 0,5 cm dall'anodo verso il catodo, registrare i valori delle letture e la distanza dall'anodo.

6.7. Colorazione del gel

Riempire una vaschetta con la soluzione colorante (4.23.) e immergervi il gel, agitare dolcemente per 1 ora, sostituire la soluzione colorante con quella fissante (4.24.) agitare dolcemente per 12 ore, togliere la soluzione fissante ed eliminare il colorante in eccesso con ripetuti lavaggi con la soluzione decolorante (4.24.).

6.8. Scansione del gel

Misurare l'intensita' delle bande colorate con un densitometro laser (5.12.) ($\lambda = 633 \text{ nm}$) e registrare il profilo dall'anodo al catodo.

6.9. Conservazione del gel

Avvolgere il gel nella apposita busta di cellophane (5.13.) facendo attenzione a formare il minor numero possibile di bolle d'aria, seccarlo all'aria mantenendolo sotto tensione per alcuni giorni e conservare il gel seccato in ambiente pulito e secco. Se correttamente seccato e conservato il gel mantiene le bande colorate per 1 anno.

7. Espressione dei risultati

Il riconoscimento di torbe, leonarditi e ligniti si basa sul confronto dei rispettivi profili di elettrofocalizzazione a 633 nm.

Le torbe (Fig. 1) sono caratterizzate da una banda molto intensa a pH 3,5, seguita da una poco intensa a pH 3,8 (regione A) e da un gruppo di bande (almeno 5 ben distinte) a pH compreso tra 4,0 e 4,4 (regione B); non sono presenti bande intense e ben focalizzate a $\text{pH} > 4,4$ (regione C). Le regioni A e B sono quelle che hanno la maggiore area relativa del profilo elettroforetico (Tab. 1).

Le leonarditi (Fig. 1) presentano una banda molto intensa a pH 3,5, seguita da una poco intensa a pH 3,8 (regione A); nell'intervallo di pH compreso tra pH 3,8 e 4,4 (regione B) sono presenti un gruppo di bande ben focalizzate (almeno 5), fra le quali quella a pH maggiore e' sempre la piu' intensa del gruppo; nell'intervallo di pH compreso fra 4,4 e 6,0 (regione C) e' sempre presente un gruppo di bande molto intense (almeno 5). La regione C ha un'area relativa del profilo elettroforetico del 67% (Tab. 1), mentre le regioni A e B hanno un'area relativa del 14 e 19%, rispettivamente (Tab. 1).

Le ligniti (Fig. 1) hanno un picco a pH 3,5 meno intenso rispetto alle torbe e alle leonarditi; nell'intervallo tra pH 3,8 e 4,4 (regione B) presentano bande poco intense e poco focalizzate, mentre nella regione a $\text{pH} > 4,4$ (regione C) presentano un gruppo di bande focalizzate abbastanza intense (sono riconoscibili almeno 4 bande). La regione C ha un'area relativa del 81% (Tab. 1), mentre le regioni A e B hanno un'area relativa del 8 e 11% rispettivamente (Tab. 1).

Figura 1 - Confronto tra i profili di elettrofocalizzazione di una

torba, una leonardite e una lignite.

Tabella 1
AREA RELATIVA DELLE DIVERSE REGIONI
DEL PROFILO ELETTROFORETICO

	Regione del profilo elettroforetico			
Matrice	N.	-----		
		A (pH 3,5-3,8)	B (pH 3,8-4,4)	C (pH 4,4-6,0)
		-----	-----	-----
Torbe....	31	51,3 ± 9,7 (1)	45,1 ± 6,9	3,6 ± 9,1
Leonarditi.	15	13,9 ± 5,0	19,5 ± 6,9	66,7 ± 10,0
Ligniti....	5	7,6 ± 0,9	11,3 ± 4,1	81,0 ± 4,6

(1) Media ± deviazione standard.

DETERMINAZIONE DEL GRADO DI RACEMIZZAZIONE NEI FERTILIZZANTI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del grado di racemizzazione, considerando come tale, il rapporto percentuale tra la forma D (R) dell'alanina libera rispetto alla somma delle forme L (S) e D (R) dell'alanina libera.

2. Campo di applicazione

Il metodo e' applicabile ai concimi organici azotati fluidi ed agli ammendanti per i quali e' richiesta la dichiarazione del grado di racemizzazione.

3. Principio

La separazione degli enantiomeri viene effettuata per elettroforesi capillare utilizzando la beta-ciclodestrina come selettore chirale.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualita' analitica riconosciuta.

4.1. Tampone Tris(idrossimetil)-amminometano (TRIS) 0,1 M/borato 0,1 M + acido etilendiamminotetracetico (EDTA) 2,5 mM + sodio dodecilsolfato (SDS) 0,1% + urea 7 M, pH 8,6 (Fluka, 82616).

4.2. beta-ciclodestrina, C in base 42 H in base 70 O in base 35, > 99%.

4.3. Tampone per elettroforesi capillare

Disciogliere in 100 mL del tampone (4.1.) 1,135 g di beta-ciclodestrine (4.2.), agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione, conservare a + 4 oC. Se correttamente conservata ha una durata di 2 mesi.

4.4. Acetonitrile (ACN), CH in base 3 CN, > 99,8%.

4.5. Dansil cloruro, 5-dimetilamminonaftalene 1-sufonil cloruro (DNS-Cl), > 99%.

4.6. Dansil cloruro, soluzione 15 mM in acetonitrile

Disciogliere in 5 mL di ACN (4.4.) 20 mg di DNS-Cl (4.5.), questa

soluzione deve essere preparata fresca ogni volta.

4.7. Sodio bicarbonato, NaHCO_3 in base 3, > 99,8%.

4.8. Sodio bicarbonato, NaHCO_3 in base 3 soluzione 0,5 M

Pesare 36 g di sodio bicarbonato (4.7.) con una precisione di 0,01 g e porlo in un pallone tarato da 1 L, aggiungere circa 600 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione del bicarbonato, quindi portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a + 4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.9. L (S) alanina, CH in base 3 $\text{CH}(\text{NH in base 2})\text{CO in base 2 H}$, 99%.

4.10. D (R) alanina, CH in base 3 $\text{CH}(\text{NH in base 2})\text{CO in base 2 H}$, 99%.

4.11. L (S) D (R) alanina, CH in base 3 $\text{CH}(\text{NH in base 2})\text{CO in base 2 H}$, 99%.

4.12. L (S) alanina soluzione 10 mM.

Pesare 0,089 g di L (S) alanina (4.9.) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 mL, aggiungere circa 60 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a -16 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.13. D (R) alanina soluzione 10 mM.

Pesare 0,089 mg di D (R) alanina (4.10.) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 mL, aggiungere circa 60 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a -16 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.14. L (S) D (R) alanina soluzione 10 mM

Pesare 0,089 mg di L (S) D (R) alanina (4.9) con una precisione di 1 mg, porla in un pallone tarato da 100 mL, aggiungere circa 60 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore con chiusura ermetica e mantenuta a -16 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

5. Apparecchiatura

5.1. Stufa o agitatore riscaldante a bagno d'acqua.

5.2. Centrifuga per microprovette.

5.3. Siringhe da 1 mL tipo usa e getta.

5.4. Filtri da siringa da 1 mL con pori del diametro di 0,45 μm in politetrafluoroetilene idrofilo (PTFE).

5.5. Elettroforesi capillare con rilevatore spettrofotometrico dotato di una lampada al deuterio e di un programma d'integrazione e calcolo delle aree dei picchi degli elettroferogrammi.

5.6. Capillare in silice fusa, rivestito esternamente con poliimmide ed internamente con poliacrilammide (BIOCAPTM XL, 148-3081, BIO-RAD) di lunghezza totale (TL) di 50 cm e di lunghezza effettiva al rilevatore (EL) 45,4 cm, con diametro interno (ID) di 50 μm e diametro esterno (OD) di 375 μm .

6. Procedimento

6.1. Preparazione del campione per l'analisi.

Pesare una quantità compresa tra 50-100 mg di campione all'interno di una microprovetta tipo Eppendorf da 1,5 mL con tappo, quindi aggiungere 1 mL di acqua, tappare la microprovetta ed agitare fino alla completa dissoluzione.

6.2. Derivatizzazione del campione.

In una microprovetta con tappo tipo Eppendorf da 0,5 mL aggiungere nell'ordine 10-50 μL di campione (6.1), 50 μL di soluzione di bicarbonato (4.8), 150 μL di soluzione di dansil cloruro (4.6) e acqua in quantità tale da portare il volume totale a 250 μL . Omogeneizzare il tutto agitando dolcemente per alcuni minuti, quindi porre nell'agitatore riscaldante a bagno d'acqua (5.1) a 65 °C per 45 minuti. Trascorso questo tempo togliere i campioni dall'agitatore, lasciarli raffreddare a temperatura ambiente al buio, quindi centrifugarli (5.2) a 5.000. g per 10 minuti a 4 °C. Prelevare il surnatante con una siringa (5.3) e filtrarlo (5.4) recuperando il campione derivatizzato nelle apposite microprovette per elettroforesi capillare.

A parte, derivatizzare insieme al campione, in microprovette separate, 10 μL delle soluzioni di L (S) alanina (4.12), D (R) alanina (4.13) e L (S) D (R) alanina (4.14). Questi tre campioni marcati servono per il preciso riconoscimento dei picchi della L (S) e D (R) alanina del campione.

6.3 Elettroforesi capillare.

Installare nello strumento (5.5) il capillare (5.6) e condizionarlo lavandolo con acqua per 10 minuti e tampone (4.3) per 5 minuti sotto alta pressione (7 bar). Procedere all'analisi dei campioni predisponendo le seguenti condizioni:

campo elettrico (costante) = 300 V . cm elevato a -1;
polarità: da - a +;
intensità (limite): 50 mA;
rilevazione: $\lambda = 240\text{-}260\text{ nm}$;
iniezione campione: 2 psi . s = 30,4 Pa . s = 0,23 mm Hg . s =
3-10 elevato a -4 bar . s;
tempo di corsa: 35 minuti;
temperatura capillare: 25 °C.

Prima di ogni corsa lavare il capillare sotto alta pressione (7 bar) con acqua per 3 minuti e tampone (4.3) per 2 minuti.

Il riconoscimento dei picchi della L (S) alanina e D (R) alanina deve essere fatto confrontando gli elettroferogrammi del campione da solo con quelli del campione marcato. Le aree dei picchi dei due enantiomeri devono essere valutate per mezzo di un idoneo programma di integrazione e calcolo.

7. Espressione dei risultati

Il Grado di racemizzazione si esprime in percentuale ed è calcolato utilizzando la seguente espressione:

Grado di racemizzazione (%)

$$= 2 \cdot \frac{\text{area picco D(R) alanina}}{\text{area picco L(S) alanina}} \cdot 100$$

area picco D(R) alanina + area picco L(S) alanina}

Nota: Il fattore di trasformazione 2 deriva dall'accezione di racemo che, ai fini del presente metodo, viene definito come miscela proveniente da una racemizzazione spinta, a seguito della quale il rapporto dei due enantiomeri D/L e' superiore a 0,5.

DETERMINAZIONE DELLE MASSE MOLECOLARI NOMINALI
(NMW) < 10.000 DALTONS NEI FERTILIZZANTI
A BASE DI PROTEINE IDROLIZZATE.

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione delle masse molecolari (NMW) prendendo come riferimento un cut-off a 10.000 daltons.

Nota: Il presente metodo puo' essere applicato anche per la determinazione di masse molecolari (NMW) diverse (per es. 1.000, 5.000, 20.000 daltons).

2. Campo di applicazione

Il metodo e' applicabile ai fertilizzanti organici azotati fluidi per i quali e' richiesta la dichiarazione delle masse molecolari.

3. Principio

La separazione delle NMW viene effettuata per ultrafiltrazione con membrane di esteri di cellulosa (CE), con pori di dimensione molecolare nominale (NMW) diverse, in questo caso di 10.000 daltons (2,5 nm) in condizioni di pH e forza ionica costanti, sotto flusso di gas inerte a +40C.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualita' analitica riconosciuta.

4.1. Potassio cloruro, KCl, > 99,5%.

4.2. Potassio cloruro, KCl soluzione 10 mM

Pesare 0,746 g di potassio cloruro (4.1) con una precisione di 0,001 g e porli in un pallone tarato da 1 L, aggiungere circa 600 mL di acqua, agitare fino alla completa dissoluzione, portare a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di chiusura ermetica e a +40C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.3. o-ftalaldeide (OPA), C in base 8 H in base 6 O in base 2.

4.4. Sodio tetraborato decaidrato, Na in base 2 B in base 4 O in base 7 · 10 H in base 2 O, > 99%.

4.5. Soluzione di sodio tetraborato 0,2 M

Pesare 19,07 g di sodio tetraborato decaidrato (4.4) con una precisione di 0,01 g, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a + 40C. La soluzione, se correttamente conservata, puo' essere utilizzata per 2 mesi.

4.6. Acido borico, H in base 3 BO in base 3, > 99,8%.

4.7. Soluzione di acido borico 0,2 M

Pesare 12,36 g di acido borico (4.6) con una precisione di 0,01 g, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. La

soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a +4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.8. Tampone acido borico-borato, pH 9.

In un matraccio tarato da 200 mL, miscelare 50 mL soluzione di acido borico (4.7) con 59 mL di soluzione di sodio tetraborato (4.5), portare a volume con acqua. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica e mantenuta a + 4 °C. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

4.9. Etanolo, C in base 2 H in base 5 OH, 95% v/v.

4.10. Soluzione di OPA

In una provetta di vetro da 10 mL con chiusura ermetica mettere nell'ordine: 2 mL di etanolo (4.9), una punta di spatola di OPA (4.3) e 5 mL di tampone acido borico-borato (4.8). Tappare e agitare dolcemente fino alla completa dissoluzione dell'OPA. Questa soluzione deve essere conservata al buio a +4 °C ed e' necessario prepararla fresca ogni volta.

4.11. Acido solforico, H in base 2 SO in base 4 al 96% (p = 1,89).

4.12. Soluzione di acido solforico 2 M

Diluire con acqua 110 mL di acido solforico (4.11) in un matraccio tarato da 1000 mL sino a volume. La soluzione deve essere conservata in un contenitore dotato di una chiusura ermetica. Se correttamente conservata la soluzione ha una durata di 2 mesi.

5. Apparecchiatura

5.1. Cella da ultrafiltrazione con una capacita' di 10 mL.

5.2. Filtri da ultrafiltrazione in esteri di cellulosa (CE) con NMW da 10.000 daltons.

5.3. Gas inerte per forzare la filtrazione (elio).

5.4. Camera fredda o criostato a + 4 °C.

6. Procedimento

6.1 Preparazione del campione per l'analisi

Omogeneizzare accuratamente il campione, pesare 10 g di campione con una precisione di 0,01 g all'interno di un matraccio tarato da 100 mL, quindi portare a volume con la soluzione di KCl (4.2) e agitare fino alla completa omogeneizzazione.

6.2 Condizionamento della membrana

Installare la membrana nella cella avendo cura di non danneggiarla, quindi condizionarla facendovi passare attraverso un opportuno volume di soluzione di KCl (4.2), in genere e' sufficiente un volume pari a 5 volte la capacita' della cella. L'ultrafiltrazione deve essere eseguita sotto flusso di un gas inerte (elio) e a temperatura costante (+ 4 °C).

6.3 Ultrafiltrazione

Mettere nella cella (5.1) 2 mL di campione (6.1), pari a 200 mg di campione iniziale ed aggiungere KCl (4.2) fino a riempire la cella. Recuperare l'eluato (< 10.000 daltons) dalla cella in un matraccio tarato da 100 mL contenente 5 mL di soluzione di H in base 2 SO in base 4 (4.12). Man mano che la cella si vuota deve essere nuovamente riempita con la soluzione di KCl (4.2). Il termine del passaggio di materiale organico azotato con massa molecolare < 10.000

daltons viene valutato recuperando alcune gocce dell'eluato dalla cella all'interno di una provetta di vetro dotata di tappo e aggiungendovi 1 mL della soluzione di OPA (4.10). Dopo aver agitato dolcemente la provetta per un minuto, riporla al buio a + 4 °C per 20 minuti, trascorsi i quali controllare il colore della soluzione contro quello della soluzione di OPA (4.10). Se il colore della soluzione contenente le gocce di eluito è più scuro di quella di OPA (4.10) continuare l'ultrafiltrazione, se non è possibile notare a vista alcuna differenza l'ultrafiltrazione può essere considerata conclusa. Quindi terminata l'ultrafiltrazione portare a volume il matraccio contenente la frazione eluita (< 10.000 daltons) e recuperare in modo quantitativo in un matraccio da 100 mL la frazione (> 10.000 daltons) di campione rimasta nella cella, utilizzando sempre la soluzione di KC1 (4.2).

6.4 Determinazione del contenuto in azoto organico e carbonio organico

Sul campione iniziale e su entrambe le frazioni ottenute determinare:

- il contenuto in azoto organico (sottrarre dal valore dell'azoto totale il valore dell'azoto ammoniacale e nitrico) secondo quanto previsto dal Metodo 2 riportato nella Parte Prima (Metodi di analisi CEE) del decreto ministeriale 24 marzo 1986 "Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per i fertilizzanti" supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 180 del 5 agosto 1986;
- il contenuto in carbonio organico secondo quanto previsto dal decreto ministeriale 21 dicembre 2000 "Metodi ufficiali di analisi dei fertilizzanti. Supplemento n. 6" Gazzetta Ufficiale n. 21 del 26 gennaio 2001.

7. Espressione dei risultati

Le masse molecolari si esprimono mediando i valori del contenuto in azoto organico (Norg) e del carbonio organico (Corg) di ogni frazione (>10kDa e <10kDa), espressi in percentuale sui rispettivi contenuti totali:

$$\text{Frazione } <10\text{kDa} = \frac{\frac{\text{Norg } <10\text{kDa}(\%)}{\text{Norg totale}(\%)} + \frac{\text{Corg } <10\text{kDa}(\%)}{\text{Corg totale}(\%)}}{2} \cdot 100$$

$$\text{Frazione } >10\text{kDa} = \frac{\frac{\text{Norg } >10\text{kDa}(\%)}{\text{Norg totale}(\%)} + \frac{\text{Corg } >10\text{kDa}(\%)}{\text{Corg totale}(\%)}}{2} \cdot 100$$

DETERMINAZIONE DEL pH NEI FERTILIZZANTI

ED AMMENDANTI ORGANICI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione del grado di reazione (pH) nei fertilizzanti e negli ammendanti organici.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i fertilizzanti ed ammendanti organici.

3. Principio

Il pH viene determinato per via potenziometrica, dopo taratura del sistema di misura, su sospensioni di:

- fertilizzante-acqua: il valore ottenuto è indicativo del grado di reazione del sistema;
- fertilizzante-CaCl in base 2: il valore ottenuto è virtualmente indipendente dal contenuto iniziale in sali presenti nel campione.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua distillata o demineralizzata di purezza equivalente e reagenti di qualità analitica riconosciuta.

4.1. Soluzioni tampone del commercio pronte all'uso (pH = 4, 7 e 10).

4.2. Soluzione di calcio cloruro (0,01 M): sciogliere in H in base 2 O, in un matraccio tarato da 1000 mL, 1,11 g di calcio cloruro (CaCl in base 2) (o 1,47 g di CaCl in base 2 · 2H in base 2 O).

5. Apparecchiatura

Attrezzatura di laboratorio di uso comune. In particolare:

5.1. pH-metro con compensazione della temperatura, elettrodo di vetro con elettrodo di riferimento o elettrodi combinati.

5.2. Agitatore magnetico a velocità regolabile.

5.3. Beaker in vetro da 100 mL.

5.4. Ancorette magnetiche.

5.5. Bilancia tecnica elettronica (unità di formato almeno 0,1 g).

6. Procedimento

6.1. Taratura del pH-metro

Tarare il sistema di misura utilizzando le soluzioni tampone di riferimento aventi pH inferiore e superiore a quello del campione.

6.2. Misurazione del pH (in H in base 2 O e CaCl in base 2)

In un beaker da 100 mL, pesare 3,0 g di campione preventivamente seccato all'aria, accuratamente omogeneizzato, od una quantità equivalente di campione umido. Aggiungere 50 mL di H in base 2 O distillata o 50 mL della soluzione di CaCl in base 2 0,01M. Pone in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Lasciare sedimentare la sospensione per alcuni minuti. Introdurre il sistema elettrodo del pH-metro nel surnatante e rilevare il valore di pH.

7. Espressione dei risultati

Per il pH determinato in acqua, riportare il risultato come "pH in H in base 2 O".

Per il pH determinato in soluzione salina, riportare il risultato come "PH in CaCl in base 2".

8. Note

I valori di pH determinati in CaCl₂ in base 2 sono generalmente inferiori di circa 0,5-0,8 unita' di pH rispetto a quelli rilevati in H in base 2 O.

Nel caso di matrici organiche particolarmente fibrose (come le torbe da sfagno) e' possibile variare il rapporto di estrazione solido:liquido (es. 3 g in 70 mL).

DETERMINAZIONE DELLA SALINITA' NEI FERTILIZZANTI ED AMMENDANTI ORGANICI

1. Oggetto

Il presente documento fissa un metodo per la determinazione della salinita' nei fertilizzanti e negli ammendanti organici.

2. Campo di applicazione

Il metodo e' applicabile a tutti i fertilizzanti ed ammendanti organici.

3. Principio

Il metodo consiste nella determinazione diretta della conducibilita' (o conduttanza) della sospensione in acqua del fertilizzante o dell'ammendante organico. Il contenuto in sali e' infatti correlato alla conducibilita' elettrica della sospensione acquosa.

4. Reattivi

Nel corso dell'analisi utilizzare acqua bidistillata di purezza equivalente e reagenti di qualita' analitica riconosciuta.

4.1. Soluzioni standard di potassio cloruro (0,1 M; 0,02 M; 0,002 M).

Soluzione 0,1 M di KCl: sciogliere in H in base 2 O, in un matraccio tarato da 1000 mL, 7,455 g di potassio cloruro (KCl). Portare a volume con H in base 2 O.

Soluzione 0,02 M di KCl: prelevare, in un matraccio tarato da 1000 mL, 200 mL della soluzione di KCl 0,1 M. Portare a volume con H in base 2 O.

Soluzione 0,002 M di KCl: prelevare, in un matraccio tarato da 1000 mL, 20 mL della soluzione di KCl 0,1 M. Portare a volume con H in base 2 O.

5. Apparecchiatura

Attrezzatura di laboratorio di uso comune. In particolare:

- 5.1. Matraci tarati di classe A da 1000 mL.
- 5.2. Pipette tarate di classe A da 20 mL.
- 5.3. Cilindri tarati di classe A da 100 mL.
- 5.4. Agitatore oscillante a 120-140 cicli/minuto.
- 5.5. Contenitori in plastica da 200 mL con tappo a chiusura ermetica.
- 5.6. Imbuti in plastica.
- 5.7. Filtri di carta Whatman(r) n. 42.
- 5.8. Conduttometro con cella di misura.
- 5.9. Bilancia tecnica elettronica (unita' di formato almeno 0,1 g).

6. Procedimento

6.1. Pesare 10,0 g di campione umido e porli nel contenitore in plastica. Aggiungere 100 mL di H in base 2 O bidistillata ed agitare meccanicamente per 30 minuti. Lasciare decantare la sospensione per

almeno 30 minuti. Se il liquido surnatante risulta sufficientemente limpido, misurarne direttamente la conducibilità. Se il surnatante si presenta torbido, filtrare su filtro di carta Whatman(r) asciutto, avendo cura di scartare la prima porzione di filtrato. Se il filtrato risulta ancora torbido, filtrare nuovamente sullo stesso filtro.

6.2. Misurazione della conducibilità

Utilizzando una apparecchiatura in grado di fornire i valori di conducibilità (conduttività a 25 °C), è sufficiente rilevare il valore accertato, espresso in dSx m elevato a -1. Nel caso in cui l'apparecchiatura fornisca i valori di conduttanza è necessario, mediante l'utilizzo delle soluzioni standard di KC1 preparate, calcolare il fattore di cella (K). Successivamente, è possibile risalire al valore di conducibilità (conduttività a 25 °C), introducendo nel calcolo un opportuno fattore di correzione (F).

6.3. Calcolo della costante di cella (K)

La costante si ricava misurando soluzioni a conduttività nota. Nella Tabella 1 vengono riportate le conducibilità specifiche di soluzioni di KC1 a varie temperature (in dSx m elevato a -1).

Tabella 1. Conduttività di soluzioni di KC1 a diverse concentrazioni ed a differenti temperature. Per valori intermedi di T, i valori di conducibilità specifica si ottengono per interpolazione.

Temperatura (T)	0,1 N	0,02 N	0,002 N
15	10,48	2,243	0,239
20	11,67	2,501	0,266
25	12,88	2,765	0,293
30	14,12	3,031	0,321

Per il calcolo della costante di cella si utilizza la seguente espressione:

$$K = \frac{L}{C}$$

dove:

K = costante di cella

L = conduttività delle soluzioni standard di KC1.

C = conduttanza misurata di una delle soluzioni standard di KC1.

6.4. Correzione della lettura (F)

La conducibilità letta per il campione in esame deve essere corretta per la temperatura. In tabella 2 sono riportati i fattori di conversione (F) in funzione della temperatura.

Tabella 2. Fattori di conversione F.

Temperatura	F	Temperatura	F
5	1,613	20	1,112
10	1,411	25	1,000
15	1,247	30	0,907

7. Espressione dei risultati

Per il calcolo della conducibilità si utilizza la seguente espressione:

$$L_x = C \times F \times K$$

dove:

L_x = conduttività a 25 °C della sospensione in esame
 C = conduttanza misurata (nelle condizioni operative)
 K = costante di cella
 F = fattore di conversione della temperatura

Calcolare la salinità (in meq x 100 g) indirettamente, tenendo conto che una conducibilità di 1 dS x m elevato a -1 corrisponde a circa 12,5 meq x L di sali, mediante la seguente formula:

$$[(V \times 1,25 \times L_x)/P] \times f$$

.sp,

dove:

V = volume del liquido (espresso in millilitri)
 P = la massa del campione umido (espresso in grammi)
 L_x = conduttività a 25 °C della sospensione in esame
 f = fattore analitico per riportare il dato analitico alla sostanza secca { $f=100/100\text{-umidità}\%$ }}

Nel caso specifico, poiché l'estratto acquoso è 10 g/100 mL, la formula diventa:

$$12,5 \times L_x \times f$$

8. Note

I valori di conducibilità vengono spesso espressi in mS x cm elevato a -1. Secondo il nuovo sistema internazionale delle unità di misura (unità SI) è tuttavia necessario riportare tali risultati in dS x m elevato a -1. Non è necessario operare alcuna correzione, dal momento che i valori risultano numericamente uguali (mS x cm elevato a -1 = dS x m elevato a -1).

