

REAL DECRETO 1110/1991, DE 12 DE JULIO, POR EL QUE SE APRUEBAN LOS METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE PRODUCTOS ORGANICOS FERTILIZANTES.

EL REAL DECRETO 72/1988, DE 5 DE FEBRERO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DEL 6), SOBRE FERTILIZANTES Y AFINES, EN LA REDACCION QUE AL MISMO HA DADO EL REAL DECRETO 877/1991, DE 31 DE MAYO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 12 DE JUNIO), QUE LO MODIFICA, DEFINE LO QUE SE ENTIENDE POR FERTILIZANTES O ABONOS ORGANICOS Y OTRAS CATEGORIAS AFINES DESTINADAS DIRECTA O INDIRECTAMENTE A SER UTILIZADAS EN LA AGRICULTURA Y QUE POR SU CONTENIDO EN ALIMENTOS NUTRITIVOS O POR SU ACCION ESPECIFICA TIENDEN A FACILITAR, DIRECTA O INDIRECTAMENTE, EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS CULTIVADAS, ASI COMO LA PRODUCCION DE OTROS EFECTOS QUE EN AQUEL PRECEPTO SE DETALLAN.

EL PARRAFO SEGUNDO DEL ARTICULO 5. DE ESTE REAL DECRETO ESTABLECE QUE LOS METODOS DE TOMAS DE MUESTRAS Y DE ANALISIS SERAN LOS OFICIALES. LAS ORDENES DE 17 DE SEPTIEMBRE DE 1981 (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 14 DE OCTUBRE) Y DE 1 DE DICIEMBRE DE 1981 (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 20 DE ENERO DE 1982), ESTABLECIERON DIVERSOS METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE PRODUCTOS ORGANICOS FERTILIZANTES, SIENDO NECESARIO COMPLEMENTARLOS CON OTROS NUEVOS QUE ATIENDAN AL CONTROL DE DIVERSOS PARAMETROS CONTEMPLADOS EN EL REAL DECRETO 72/1988, ANTERIORMENTE ALUDIDO, EN SU VIRTUD, A PROPUESTA DE LOS MINISTROS DE ECONOMIA Y HACIENDA; DE INDUSTRIA, COMERCIO Y TURISMO; DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION, Y DE SANIDAD Y CONSUMO, OIDOS LOS SECTORES AFECTADOS, PREVIO INFORME PRECEPTIVO DE LA COMISION INTERMINISTERIAL PARA LA ORDENACION ALIMENTARIA, DE ACUERDO CON EL CONSEJO DE ESTADO Y PREVIA DELIBERACION DEL CONSEJO DE MINISTROS, EN SU REUNION DEL DIA 12 DE JULIO DE 1991, DISPONGO:

ARTICULO 1. SE APRUEBAN E INCORPORAN COMO OFICIALES LOS METODOS DE ANALISIS DE PRODUCTOS ORGANICOS FERTILIZANTES QUE SE DETALLAN EN EL ANEXO. TALES METODOS SE UTILIZARAN PARA EL ANALISIS DE TODOS LOS PRODUCTOS FERTILIZANTES Y AFINES DE NATURALEZA TOTAL O PARCIALMENTE ORGANICA.

ART. 2. CUANDO NO EXISTAN METODOS OFICIALES PARA DETERMINADOS ANALISIS, Y HASTA QUE NO FUERAN APROBADOS POR EL ORGANO COMPETENTE Y PREVIAMENTE INFORMADOS POR LA COMISION INTERMINISTERIAL PARA LA ORDENACION ALIMENTARIA, PODRAN SER UTILIZADOS LOS APROBADOS POR LOS ORGANISMOS NACIONALES O INTERNACIONALES DE RECONOCIDA SOLVENCIA. DADO EN MADRID A 12 DE JULIO DE 1991.

JUAN CARLOS R.

EL MINISTRO DE RELACIONES CON LAS CORTES
Y DE LA SECRETARIA DEL GOBIERNO,
VIRGILIO ZAPATERO GOMEZ

ANEXO

METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE PRODUCTOS ORGANICOS FERTILIZANTES
INDICE

4. EXTRACTO HUMICO TOTAL Y ACIDOS HUMICOS.

7. GRADO DE FINURA.

8. NITROGENO TOTAL.

9. NITROGENO AMIDICO (UREICO).

10. NITROGENO NITRICO (METODO DE ROBERTSON).

12. NITROGENO ORGANICO.

14. FOSFORO SOLUBLE EN AGUA Y EN CITRATO AMONICO (ASIMILABLE).

15. NITROGENO INSOLUBLE EN AGUA.

17. POTASIO TOTAL.

18. AMINOACIDOS LIBRES Y TOTALES.

4. EXTRACTO HUMICO TOTAL Y ACIDOS HUMICOS

4.1 PRINCIPIO

EN ESTE METODO, LAS MUESTRAS SE SOMETEN A UNA EXTRACCION ALCALINA PARA OBTENER EL EXTRACTO HUMICO TOTAL Y POSTERIORMENTE SE PRECIPITAN EN ESTE EXTRACTO LOS ACIDOS HUMICOS A PH: 1.

TANTO EN EL EXTRACTO HUMICO, COMO EN EL PRECIPITADO, SE DETERMINA EL CONTENIDO DE CARBONO ORGANICO.

4.2 MATERIAL Y APARATOS

4.2.1 TUBOS DE CENTRIFUGA DE 200 ML.

4.2.2 BAÑO DE AGUA.

4.2.3 PH-METRO.

4.2.4 AGITADOR DE VAIVEN. 4.2.5 CENTRIFUGA.

4.2.6 ESTUFA DE AIRE FORZADO O NORMAL.

4.3 REACTIVOS

4.3.1 DICROMATO POTASICO 1N.

4.3.2 ACIDO FOSFORICO 85 POR 100.

4.3.3 ORTOFENANTROLINA (0,5 G. SE DISUELVEN EN 20 CC. DE H₂O Y SE AÑADEN 100 CC. DE SO₄H₂

4.3.4 SAL DE MOHR 0,5N.

4.3.5 SOLUCION EXTRACTANTE DE PIROFOSFATO 0,1M -SOSA 0,1N, RECIENTEMENTE PREPARADA.

MEZCLAR 44,5 G. DE P₂O₇NA₄ 10H₂O Y 4 G. DE NAOH, ENRASANDO A UN LITRO CON AGUA.

4.3.6 ACIDO SULFURICO (1:1).

4.3.7 HIDROXIDO SODICO 0,5N.

4.3.8 ACIDO SULFURICO 0,001N.

4.4 PROCEDIMIENTO

4.4.1 EXTRACCION:

DESECAR LA MUESTRA A 50-60 C DURANTE CUARENTA Y OCHO HORAS DE ESTUFA DE AIRE FORZADO O A 100 C DURANTE VEINTICUATRO HORAS EN ESTUFA NORMAL, PULVERIZANDO A CONTINUACION HASTA OBTENER UNA MUESTRA FINA Y HOMOGENEA.

PESAR, CON PRECISION DE 0,1 MG., LA CANTIDAD DE MUESTRA NECESARIA (VER 4.6.1) E INTRODUCIRLA EN UN TUBO DE CENTRIFUGA DE 200 ML. DE CAPACIDAD. AÑADIR 100 ML. DE SOLUCION EXTRACTANTE 4.3.5 RECIENTEMENTE PREPARADA. AGITAR DURANTE UNA HORA, EN AGITADOR DE VAIVEN, A LA MAXIMA VELOCIDAD POSIBLE Y CENTRIFUGAR A 4.500 R.P.M. DURANTE VEINTICINCO MINUTOS COMO MAXIMO. REPETIR ESTA OPERACION HASTA QUE EL LIQUIDO DE EXTRACCION SEA INCOLORO O LIGERAMENTE COLORADO (EL NUMERO DE REPETICIONES NO DEBE PASAR DE CINCO. VER 4.6.2.)

REUNIR TODOS LOS LIQUIDOS DE LAS CENTRIFUGACIONES EN UN MATRAZ DE UN LITRO, ENRASANDO CON AGUA DESTILADA. A ESTA SOLUCION SE LE DENOMINA <EXTRACTO HUMICO TOTAL>.

4.4.2 VALORACION DEL CARBONO ORGANICO DEL EXTRACTO HUMICO:

TOMAR 50 ML. DEL EXTRACTO Y LLEVAR A UN VASO O MATRAZ DE 500 ML., EVAPORANDO EL BAÑO DE AGUA HASTA SEQUEDAD. AÑADIR 10 ML. DE SOLUCION NORMAL DE CR₂O₇K₂ (4.3.1) Y A CONTINUACION 20 ML. DE ACIDO SULFURICO CONCENTRADO, AGITANDO SUAVEMENTE DURANTE UN MINUTO. DEJAR REPOSAR DURANTE TREINTA MINUTOS (TIEMPO DE OXIDACION).

TRANSCURRIDO ESTE TIEMPO, AÑADIR 200 ML. DE AGUA DESTILADA Y 10 ML. DE PO₄H₃ (4.3.2), DEJANDO ENFRIAR. A CONTINUACION, AÑADIR UN ML. DE DIFENILAMINA (4.3.3) Y VALORAR CON SAL DE MOHR (4.3.4), COMPARANDO CON UNA PRUEBA EN BLANCO.

PORCENTAJE DE C = $(V-V') \cdot N \cdot F \cdot 0,39 / P$

PORCENTAJE DE EXTRACTO HUMICO TOTAL = PORCENTAJE DE C X 1,724,

SIENDO:

V = VOLUMEN, EN ML., DE SAL DE MOHR GASTADOS EN LA PRUEBA EN BLANCO.

V' = VOLUMEN, EN ML., DE SAL DE MOHR GASTADOS EN EL PROBLEMA.

N = NORMALIDAD DE LA SAL DE MOHR.

F = FACTOR DE LA SAL DE MOHR.

P = PESO, EN GRAMOS, DE LA MUESTRA EN LA ALICUOTA.

0,39 = FACTOR QUE RESULTA DE CONSIDERAR QUE POR ESTE METODO SOLO SE OXIDA EL 77 POR 100 DEL CARBONO EXISTENTE EN LA MUESTRA (3).

4.4.3 PRECIPITACION DE ACIDOS HUMICOS:

TOMAR 200 ML. DE LA SOLUCION EXTRACTO HUMICO TOTAL Y AÑADIR ACIDO SULFURICO 1:1 (4.3.6) AGITANDO LENTAMENTE Y SIN TURBULENCIAS HASTA PH = 1. DEJAR REPOSAR DURANTE UNAS OCHO HORAS. TRANSCURRIDO ESTE TIEMPO, CENTRIFUGAR A 4.500 R.P.M. DURANTE VEINTICINCO MINUTOS COMO MAXIMO, PARA SEPARAR EL PRECIPITADO DE ACIDOS HUMICOS. LAVAR EL PRECIPITADO UNA VEZ LAVADO CON SOSA 0,5N (4.3.7), LLEVANDOLO A UN MATRAZ AFORADO DE 50 ML. Y ENRASANDO CON AGUA DESTILADA.

A ESTA SOLUCION SE LA DENOMINA <SOLUCION DE ACIDOS HUMICOS>.

4.4.4 VALORACION DE ACIDOS HUMICOS:

TOMAR UNA PARTE ALICUOTA DE ESTA SOLUCION DE ACIDOS HUMICOS, EVAPORAR A SEQUEDAD (25 ML.) EN UN VASO O MATRAZ DE 500 ML., VALORAR SIGUIENDO LA MARCHA EXPRESADA EN 4.4.2 Y EXPRESAR EL RESULTADO COMO PORCENTAJE DE ACIDOS HUMICOS.

4.5 CALCULOS

TODOS LOS RESULTADOS SE EXPRESARAN EN TANTO POR 100 SOBRE EL PRODUCTO SECO INICIAL.

4.6 OBSERVACIONES

4.6.1 LOS VALORES ORIENTATIVOS PARA LA PESADA SON:

TIPO DE MUESTRA/MATERIA ORGANICA (MATERIA SECA)-PORCENTAJE/G. DE PESADA (MATERIA SECA)-GRAMOS

ABONO ORGANICO/35/0,7-1,5

FERTILIZANTE ORGANO-MINERAL/15/1,2-1,5

COMPOST/25/0,7-1,2

TURBA /60/0,5-0,7

ENMIENDAS ORGANICAS 15 1,2-1,5 *21,6

4.6.2 SI UNA VEZ REALIZADA LA QUINTA REPETICION SIGUE APARECIENDO COLOR OSCURO, REPETIR MODIFICANDO LA PESADA.

4.6.3 EN EL CASO DE UTILIZAR BURETA AUTOMATICA, NO ES NECESARIO EL EMPLEO DEL ACIDO FOSFORICO NI DIFENILAMINA.

4.7 BIBLIOGRAFIA

1.

DETERMINACIONES ANALITICAS DE SUELOS, NORMALIZACION DE METODOS.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGRABIOLOGIA . XXXII, 1153 (1973).

2. ANNE. ANN. AGRON. , 15, 161-172 (1945).

3. WALKLEY, A.; BLACK, A. I. 81934). SOIL SCIENCE , 37, 29.

4. KONONOVA, SOIL ORGANIC MATTER, PERGAMON PRESS , 1966.

7. GRADO DE FINURA

7.1 PRINCIPIO

DESHACER LOS AGREGADOS POR SIMPLE COMPRESION MECANICA, TAMIZAR Y CALCULAR EL PORCENTAJE QUE CORRESPONDA A CADA TAMAÑO, CON EL FIN DE COMPROBAR SI SE AJUSTA A LAS DISPOSICIONES VIGENTES EN LA MATERIA. ESTE METODO ES APLICABLE PARA TODAS AQUELLAS MATERIAS AGRUPADAS COMO PRODUCTOS ORGANICOS FERTILIZANTES.

7.2 MATERIAL Y APARATOS

7.2.1 JUEGO DE TAMICES CIRCULARES CON UN DIAMETRO DE 20 CM Y DE ALTURA 5 CM.

7.2.2 RODILLO DE CAUCHO DURO, TACO DE MADERA O MATERIAL SIMILAR.

7.2.3 TAMIZADOR MECANICO.

7.3 PROCEDIMIENTO

PESAR, CON LA PRECISION DE 0,01 G, 500 G DE LA MUESTRA SECADA AL AIRE Y MEZCLAR, EMPLEANDO EL METODO DEL CUARTEO O UN DIVISOR MECANICO, GUARDANDOLA EN UN RECIPIENTE SECO Y HERMETICO.

EL METODO OPERATORIO PUEDE SER MANUAL O MECANICO SI SE DISPONE DE UN TAMIZADOR MECANICO.

TANTO SI SE EFECTUA LA OPERACION A MANO COMO MECANICAMENTE, DEBEN SITUARSE LOS TAMICES DE MAYOR A MENOR LUZ DE MALLA.

TOMAR UNA PARTE REPRESENTATIVA DE LA MUESTRA 50 A 100 G OBTENIDA PREVIAMENTE EMPLEANDO EL METODO DEL CUARTEO Y COLOCARLA EN LA PARTE SUPERIOR DE LA COLUMNA DE TAMICES, ES DECIR, EN EL TAMIZ SUPERIOR.

SI SE EMPLEA EL TAMIZADOR MECANICO, EL TIEMPO APROXIMADO PARA EFECTUAR LA OPERACION SON DIEZ MINUTOS, DEBIENDOSE COMPROBAR QUE HAYAN PASADO TODAS LAS PARTICULAS EN LOS SUCESIVOS TAMICES:

DE NO TENER SUFICIENTE GARANTIA, REPETIR LA OPERACION A INTERVALOS DE UN MINUTO, HASTA QUE HUBIERAN PASADO TODAS LAS PARTICULAS.

LA OPERACION CITADA TAMBIEN PUEDE REALIZARSE A MANO, EFECTUANDO UN MOVIMIENTO CIRCULAR EN LA COLUMNA DE TAMICES PARA CONSEGUIR QUE LAS PARTICULAS VAYAN CRUZANDO LOS SUCESIVOS TAMICES.

EL TAMIZADO NO DEBE SER PROLONGADO MAS TIEMPO QUE EL NECESARIO, TRATANDO DE EVITAR QUE LAS PARTICULAS SE DISGREGUEN POR FROTACION SOBRE LOS TAMICES.

7.4 CALCULOS

$GRADO\ DE\ FINURA = P1/P.100$

SIENDO:

P = PESO DE LA MUESTRA INICIAL.

P 1 = PESO DE LA MUESTRA RETENIDA EN EL TAMIZ DE LUZ = I.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

PARTICULAS COMPRENDIDAS ENTRE:

LUZ DE MALLA > 25: M %.

LUZ DE MALLA ENTRE 25 Y 10 MM: N %.

LUZ DE MALLA ENTRE 10 Y 5 MM: U %.

LUZ DE MALLA ENTRE 5 Y 4 MM: X %.

LUZ DE MALLA ENTRE 4 Y 1 MM: Y %.

LUZ DE MALLA < 1 MM: Z %.

PERDIDAS POR TAMIZADO O ERROR DE CIERRE = $100 \text{ SUMA DISTINTOS PORCENTAJES } (M + N + U + X + Y + Z) .$

7.5 BIBLIOGRAFIA

1. METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE FERTILIZANTES . MINISTERIO DE AGRICULTURA. MADRID, 1974.

2.

MINISTERE D L'AGRICULTURE BELGE, METHODES DE CONVENTION PORU L'ANALYSE DES ENGRAIS ET DES EMEDEMENTS DU SOL, PARTIE II, AMADENDEMENTS DU SOL (1971).

8.

NITROGENO TOTAL

8.1 PRINCIPIO

TRANSFORMAR EL NITROGENO ORGANICO EN SULFATO DE AMONIO POR EBULLICION CON ACIDO SULFURICO CONCENTRADO, PREVIA REDUCCION DEL NITROGENO NITRICO A AMONIACAL Y DESTILAR EN MEDIO ALCALINO TODO EL N

AMONIACAL ASI FORMADO, QUE SE VALORA CON UN ACIDO DE TITULACION CONOCIDA.

8.2 MATERIAL Y APARATOS

8.2.1 MATRACES KJELDAHL DE 500 A 800 ML.

8.2.2 APARATO DE DESTILACION.

8.3 REACTIVOS

8.3.1 ACIDO SUFLFURICO CONCENTRADO.

8.3.2 ACIDO SALICILICO-ACIDO SULFURICO: DISOLVER 25 G DE ACIDO SALICILICO EN UN LITRO DE ACIDO SULFURICO CONCENTRADO.

8.3.3 TIOSULFATO DE SODIO SOLIDO.

8.3.4 MEZCLA CATALITICA: MEZCLAR INTIMAMENTE 80 G DE SULFATO POTASICO, 20 G DE SULFATO DE COBRE Y 2 G DE SELENIO.

8.3.5 SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO AL 30 POR 100.

8.3.6 SOLUCION DE FENOLFTALEINA AL 1 POR 100 EN ETANOL.

8.3.7 SOLUCION ACUOSA DE ACIDO BORICO AL 2 POR 100.

8.3.8 INDICADOR. DISOLVER 0,125 G DE ROJO DE METILO Y 0,080 G DE AZUL DE METILENO EN 100 ML. DE ETANOL.

8.3.9 ACIDO SULFURICO O CLORHIDRICO 0,1 N.

8.4 PROCEDIMIENTO

PESAR DE 0,2 A 2 G DE LA MUESTRA (QUE CONTENGA UNA CANTIDAD IGUAL O MENOR DE 60 MG DE N-NITRICO), PONERLOS EN MATRAZ KJELDAHL Y AÑADIR 10 ML DE REACTIVO SALICILICO-SULFURICO, AGITAR PARA QUE SE MOJE TODA LA MUESTRA Y DEJAR EN REPOSO TREINTA MINUTOS; AÑADIR 1 G DE TIOSULFATO SODICO SOLIDO Y AGITAR; ESPERAR QUINCE MINUTOS Y AÑADIR ENTRE 10 Y 15 ML DE ACIDO SULFURICO CONCENTRADO Y ALREDEDOR DE 5 G DE MEZCLA CATALITICA.

COLOCAR EL MATRAZ EN EL DISPOSITIVO DE CALENTAMIENTO QUE CUMPLA 6 (A).6.1 EN CINCO MINUTOS. CALENTAR DURANTE CINCO MINUTOS HASTA QUE DESAPAREZCAN LOS HUMOS BLANCOS. AGITAR SUAVEMENTE POR ROTACION Y PROSEGUIR LA DIGESTION HASTA QUE LA SOLUCION SE VUELVA CLARA (LO QUE SUELE OCURRIR EN SESENTA MINUTOS).

ENFRIAR, AÑADIR CON PRECAUCION 200 ML DE AGUA; VOLVER A ENFRIAR, AÑADIR TRES-CINCO GOTAS DE FENOLFTALEINA Y SOLUCION DE NAOH AL 30 POR 100 HASTA COLOR ROJO.

INMEDIATAMENTE CONECTAR EL MATRAZ AL APARATO DE DESTILACION TENIENDO SUMERGIDO EL EXTREMO DE LA ALARGADERA EN UN MATRAZ ERLLENMEYER O VASO CONTENIENDO 20 ML DE ACIDO BORICO Y TRES-CUATRO GOTAS DE INDICADOR.

DESTILAR TODO EL AMONIACO (LO QUE SUELE OCURRIR CON 150 ML DE DESTILADO). VALORAR EL CONTENIDO DEL ERLLENMEYER CON ACIDO 0,1 N. EL VIRAJE ES DE VERDE A ROJO BURDEOS.

8.5 CALCULO

PORCENTAJE N = $V \cdot 0,14 / P$

SIENDO:

V = VOLUMEN, EN ML, DE ACIDO 0,1 N CONSUMIDOS.

P = PESO, EN GRAMOS, DE LA MUESTRA.

8.6 OBSERVACIONES

PUEDEN UTILIZARSE EQUIPOS DE DIGESTION CON TERMORREGULACION Y DE DESTILACION CON ARRASTRE POR AIRE O POR VAPOR DE AGUA CON ADICION SEMIAUTOMATICA DE REACTIVOS.

8.7 REFERENCIAS

METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE FERTILIZANTES DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA. AÑO 1977.

9. NITROGENO AMIDICO (UREICO)

9.1 PRINCIPIO

ESTE METODO SE BASA EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA UREA A CARBONATO DE AMONIO Y SU VALORACION, PREVIA ELIMINACION DE CALCIO Y FOSFATOS.

9.2 MATERIAL Y APARATOS

9.2.1 PAPEL ALBET NUMERO 242 O SIMILAR.

9.2.2 PH-METRO.

9.3 REACTIVOS

9.3.1 SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N.

9.3.2 SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0,1 N.

9.3.3 SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 2 N.

9.3.4 SOLUCION DE CARBONATO DE SODIO AL 10 POR 100.

9.3.5 SOLUCION SATURADA DE HIDROXIDO DE BARIO.

9.3.6 UREASA LIOFILIZADA. MERCK REF.

8.489 O EQUIVALENTE. COMPROBAR SU ACTIVIDAD ENZIMATICA PERIODICAMENTE Y GUARDAR A TEMPERATURA INFERIOR A 4 C. UTILIZARLA EN SUSPENSION RECIEN PREPARADA.

9.3.7 DISOLUCION NEUTRA DE UREASA. PREPARAR UNA SUSPENSION DE UREASA EN AGUA DESTILADA AL 0,25 POR 100 Y NEUTRALIZAR A PH = 4,4.

9.4 PROCEDIMIENTO

TOMAR 10 G DE MUESTRA, PESADOS CON PRECISION DE 1 MG E INTRODUCIRLOS EN UN MATRAZ AFORADO DE 250 ML, LLEVAR A VOLUMEN CON AGUA DESTILADA, AGITAR QUINCE MINUTOS Y FILTRAR SOBRE PAPEL ALBET 242 O SIMILAR. TOMAR CON PIPETA 50 ML DE LA SOLUCION FILTRADA Y PASARLOS A UN MATRAZ AFORADO DE 500 ML

AÑADIR SUFICIENTE SOLUCION SATURADA DE HIDROXIDO DE BARIO PARA PRECIPITAR LOS FOSFATOS, DEJAR SEDIMENTAR Y COMPROBAR SI LA PRECIPITACION FUE COMPLETA.

AÑADIR SOLUCION DE CARBONATO DE SODIO PARA PRECIPITAR EL EXCESO DE BARIO Y CUALQUIER SAL DE CALCIO SOLUBLE. DEJAR SEDIMENTAR Y COMPROBAR DE NUEVO SI LA PRECIPITACION FUE COMPLETA.

MEZCLAR Y LLEVAR A VOLUMEN. FILTRAR SOBRE PAPEL SECO ALBET 242 O SIMILAR Y TRASVASAR 50 ML DE FILTRADO A UN MATRAZ ERLLENMEYER DE 250 ML, NEUTRALIZAR CON SOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO 2 N Y AÑADIR DOS O TRES GOTAS EN EXCESO.

NEUTRALIZAR LA DISOLUCION CON HIDROXIDO DE SODIO 0,1 N HASTA PH = 4,4.

AÑADIR A CADA MUESTRA 20 ML DE SUSPENSION DE UREASA, TAPAR CON TAPON DE GOMA Y DEJAR EN REPOSO DURANTE UNA HORA A 20-25 C. ENFRIAR A 0 C Y VALORAR CON ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N AÑADIENDO UN EXCESO DE ESTE REACTIVO Y VALORAR POR RETROCESO CON HIDROXIDO DE SODIO 0,1 N HASTA PH = 4,4. ANOTAR EL VOLUMEN TOTAL, EN ML AÑADIDO DE ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N(A) Y DE HIDROXIDO DE SODIO 0,1 N(B).

9.5 CALCULOS

PORCENTAJE N UREICO = $(A-B) \cdot 0,1 \cdot 14,008 \cdot 100 / 1.000$ G. MUESTRA VALORADA

9.6 REFERENCIAS

METODOS DE ANALISIS AOAC, 13. EDICION, 1980, NUMEROS 2.080 Y 2.081.

10. NITROGENO NITRICO

(METODO DE ROBERTSON)

10.1 PRINCIPIO

DETERMINAR EL N TOTAL Y EL N INSOLUBLE EN AGUA. LA DIFERENCIA ENTRE AMBOS ES EL N SOLUBLE.

EN LA DISOLUCION DE ND SOLUBLE ELIMINAR EL N NITRICO AL ESTADO DE OXIDO NITRICO POR MEDIO DE SULFATO DE HIERRO (II). UNA VEZ ELIMINADO, DETERMINAR EL N TOTAL EN EL RESIDUO Y LA DIFERENCIA ENTRE EL N SOLUBLE Y ESTE ULTIMO ES EL N NITRICO.

APLICABLE EN PRESENCIA DE CIANAMIDA CALCICA Y UREA.

10.2 MATERIAL Y APARATOS

10.2.1 MATRACES KJELDAHL DE 500 A 800 ML.

10.2.2 APARATOS DE DESTILACION.

10.3 REACTIVOS.

10.3.1 SULFATO DE HIERRO (II) HEPTAHIDRATO ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

10.3.2 OXIDO DE MERCURIO O MERCURIO METALICO, EXENTO DE N.

10.3.3 SULFATO DE POTASIO O DE SODIO ANHIDRO, EXENTO DE N.

10.3.4 ACIDO SULFURICO DE 93 A 98 POR 100, EXENTO DE N.

10.3.5 DISOLUCION DE TIOSULFATO DE SODIO O DE SULFURO DE SODIO: 80 G DE $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ EN 1 LITRO DE AGUA O 40 G DE SULFURO DE SODIO EN 1 LITRO DE AGUA.

10.3.6 HIDROXIDO DE SODIO O EN DISOLUCION:

450 G DE NAOH EN AGUA, ENFRIAR Y ENRASAR A 1 LITRO. DEBE TENER DE DENSIDAD 1,36 O MAS.

10.3.7 REGULADOR DE EBULLICION INERTE.

10.3.8 ROJO DE METILO:

DISOLVER 1 G EN 100 ML DE ETANOL.

10.3.9 DISOLUCION DE ACIDO SULFURICO O CLORHIDRICO 0,1 N.

10.3.10 DISOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO 0,1 N.

10.4 PROCEDIMIENTO

10.4.1 MODALIDAD A: CASO GENERAL EN QUE ES NECESARIO DETERMINAR EL N INSOLUBLE EN AGUA.

DETERMINAR EL N TOTAL POR EL METODO OFICIAL 8.

10.4.2 SEPARAR Y DETERMINAR EL N INSOLUBLE EN AGUA POR EL METODO CORRESPONDIENTE.

10.4.3 EN LA DISOLUCION OBTENIDA EN 10.4.2, ELIMINAR EL N NITRICO Y DETERMINAR EL N RESTANTE.

PARA ELLO, COLOCAR EL FILTRADO PROCEDENTE DEL APARTADO ANTERIOR EN UN MATRAZ KJELDAHL DE 500 ML Y AÑADIR 2 G DE $\text{SO}_2\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Y 20 ML.

10.4.4 PONERLO A LA LLAMA HASTA EVAPORAR EL AGUA Y QUE APAREZCAN HUMOS BLANCOS. CONTINUAR LA DIGESTION POR LO MENOS DIEZ MINUTOS MAS PARA EXPULSAR TODO EL N NITRICO. SI SE PRODUCE UNA FUERTE VAPORIZACION, AÑADIR 10 O 15 PERLAS DE VIDRIO.

10.4.5 AGREGAR 0,65 G DE HG O 0,7 DE HGO Y CONTINUAR LA DIGESTION HASTA QUE TODA LA MATERIA ORGANICA SE HAYA OXIDADO.

DETERMINAR EL N TOTAL POR EL METODO OFICIAL 8.

10.4.6 MODALIDAD B: MODIFICACION DE JONES PARA EL CASO EN QUE NO HACE FALTA DETERMINAR EL N INSOLUBLE EN AGUA POR SER TODO EL SOLUBLE.

DETERMINAR EL N TOTAL POR EL METODO OFICIAL 8.

10.4.7 ELIMINAR EL N NITRICO Y DETERMINAR EL N RESTANTE.

PARA ELLO PESAR 0,5 G DEL PROBLEMA, COLOCARLOS EN UN MATRAZ KJELDAHL DE 500 ML, AÑADIR 50 ML DE AGUA Y AGITAR SUAVEMENTE.

AGREGAR 2 G DE $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Y 20 ML DE SO_4H_2 , CONTINUANDO COMO EN 10.4.4 Y 10.4.5.

10.5 CALCULOS

MODALIDAD A:

$\text{N TOTAL} - \text{N INSOLUBLE} = \text{N SOLUBLE}$.

$\text{N SOLUBLE} - \text{N OBTENIDO EN 10.4.5} = \text{N NITRICO}$.

MODALIDAD B:

$\text{N TOTAL ANTES DE ELIMINAR EL N NITRICO} - \text{N TOTAL DESPUES DE SU ELIMINACION} = \text{N NITRICO}$.

10.6 REFERENCIAS

METODO A.O.A.C. EDICION 1970, NUMEROS 2.061 Y 2.062.

12. NITROGENO ORGANICO

12.1 PRINCIPIO

ESTE METODO ES MUY SEMEJANTE AL DE ROBERTSON, SALVO QUE AL FINAL SE DETERMINAN TAMBIEN EL N AMONIAL Y EL N UREICO PARA DEDUCIRLOS, JUNTO CON EL N NITRICO, DEL N TOTAL.

12.2 MATERIAL Y APARATOS

MATRACES KJELDAHL DE 500 A 800 ML.

12.3 REACTIVOS

COMO EN 8.3, 9.3 Y 10.3 METODOS DE N TOTAL, N AMIDICO Y N NITRICO. 12.4

PROCEDIMIENTO

12.4.1 DETERMINAR EL N TOTAL POR EL METODO OFICIAL NUMERO 8.

12.4.2 SEPARAR Y DETERMINAR EL N INSOLUBLE EN AGUA POR EL METODO CORRESPONDIENTE.

12.4.3 EN SENDAS PORCIONES DEL FILTRADO PROCEDENTE DEL APARTADO ANTERIOR, DETERMINAR EL N NITRICO (POR EL METODO DE ROBERTSON), EL N AMONIAL Y EL N UREICO (POR EL METODO DE LA UREASA).

12.5 CALCULOS

$N_{ORGANICO} = T - (N + A + U)$

SIENDO:

T = N TOTAL.

N = N NITRICO.

A = N AMONIAL.

U = N UREICO.

12.6 REFERENCIAS

METODOS DE LA A.O.A.C. EDICION 1970, NUMEROS 2.051 Y SIGUIENTE.

14.

FOSFORO SOLUBLE EN AGUA Y EN CITRATO AMONICO (ASIMILABLE)

14.1 PRINCIPIO

DESPUES DE SEPARAR EL FOSFORO SOLUBLE EN AGUA DE LA MUESTRA, SOMETER EL RESIDUO A UNA EXTRACCION CON DISOLUCION NEUTRA (PH = 7,0) DE CITRATO AMONICO. EL FOSFORO ASIMILABLE PUEDE DETERMINARSE EN LA DISOLUCION OBTENIDA AL REUNIR LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y DE CITRATO AMONICO. APLICABLE A AQUELLOS ABONOS EN QUE SE EXIGE EL FOSFORO SOLUBLE EN AGUA Y EN CITRATO CONJUNTAMENTE, TALES COMO LOS ABONOS ORGANOMINERALES.

14.2 MATERIAL Y APARATOS

14.2.1 UN PH-METRO.

14.2.2 EL RESTO COMO EN 13.2.

14.2.3 CRISOL FILTRANTE DE 5-15 U, G4.

14.3 MATERIAL Y APARATOS

14.3.1 CITRATO AMONICO NEUTRO.

DEBE TENER UN PESO ESPECIFICO DE 1,09 A 20 C Y UN PH IGUAL 7,0 DETERMINADO ELECTROMETRICAMENTE.

DISOLVER 370 G DE ACIDO CITRICO CRISTALIZADO EN 1,5 LITROS DE AGUA Y CASI NEUTRALIZAR AÑADIENDO 345 ML DE HIDROXIDO DE AMONIO (DE 28 A 29 POR 100 DE NH_3). SI LA CONCENTRACION DE AMONIAO ES MENOS DEL 28 POR 100, AÑADIR MAYOR VOLUMEN Y DISOLVER EL ACIDO CITRICO

EN UN VOLUMEN MAS PEQUEÑO DE AGUA. ENFRIAR Y COMPROBAR EL PH. AJUSTAR CON HIDROXIDO DE AMONIO (1:7) O CON DISOLUCION DE ACIDO CITRICO A PH = 7,0. SI ES PRECISO, DILUIR LA DISOLUCION PARA QUE EL PESO ESPECIFICO SEA 1,09 A 20 C. EL VOLUMEN SERA APROXIMADAMENTE DE 2 LITROS. CONSERVAR EN FRASCOS HERMETICAMENTE CERRADOS Y COMPROBAR EL PH DE CUANDO EN CUANDO, REAJUSTANDOLO SI DIFIERE DE 7,0.

14.3.2 REACTIVO QUIMOCIAO. COMO EN 13.3.4.

14.4 PROCEDIMIENTO

14.4.1 FOSFORO SOLUBLE EN AGUA: COLOCAR 1 G DE MUESTRA EN UN FILTRO DE 9 CM DE DIAMETRO Y LAVAR CON PEQUEÑAS PORCIONES DE AGUA HASTA QUE EL FILTRADO MIDA ALGO MENOS DE 250 ML.

DEJAR PASAR CADA PORCION A TRAVES DEL FILTRO ANTES DE AÑADIR MAS. SI EL LAVADO NO PUEDE COMPLETARSE AL CABO DE UNA HORA, UTILIZAR SUCCION. EN CASO DE QUE EL FILTRADO ESTE TURBIO, AÑADIR 1 O 2 ML DE NO 3 H CONCENTRADO. ENRASAR A 250 ML CON AGUA Y AGITAR (DISOLUCION I).

14.4.2 PREPARACION DE LAS DISOLUCIONES:

DESPUES DE RETIRAR EL P 2 O 5 SOLUBLE EN AGUA (DISOLUCION I), TRANSFERIR EL FILTRO Y RESIDUO, EN UN TIEMPO NO SUPERIOR A UNA HORA, A UN MATRAZ DE 250 ML QUE CONTENGA 100 ML DE LA DISOLUCION DE CITRATO AMONICO NEUTRO. CERRAR EL MATRAZ HERMETICAMENTE CON TAPON DE GOMA COMPACTO, SACUDIR ENERGICAMENTE HASTA QUE EL PAPEL SE REDUZCA A PULPA Y REDUCIR LA PRESION QUITANDO MOMENTANEAMENTE EL TAPON.

DEJAR EN REPOSO EL MATRAZ DURANTE VEINTICUATRO HORAS.

14.4.3 AÑADIR EL FILTRO Y EL RESIDUO Y FILTRAR EL CONTENIDO POR SUCCION, TAN RAPIDAMENTE COMO SEA POSIBLE, A TRAVES DEL PAPEL WHATMAN NUMERO 5 O EQUIVALENTE UTILIZANDO UN BUCHNER.

LAVAR CON AGUA HASTA EL QUE EL VOLUMEN DEL FILTRADO SEA APROXIMADAMENTE DE 200 ML, DEJANDO TIEMPO PARA QUE EL DRENAJE SEA COMPLETO ANTES DE AÑADIR MAS AGUA. SI EL MATERIAL ES TAL QUE PRODUCE FILTRADO TURBIO, LAVAR CON DISOLUCION DE NITRATO DE AMONIO AL 5 POR 100. ENFRIAR Y ENRASAR (DISOLUCION II).

TOMAR UNA ALICUOTA DE LA DISOLUCION I Y OTRA DE LA DISOLUCION II, PONERLAS EN UN ERLNMEYER DE 400 ML (ENTRE LAS DOS ALICUOTAS NO DEBEN TENER MAS DE 25 MG DE P 2 O 5) Y DILUIR A 50 ML SI ES NECESARIO.

14.4.4 METODO GRAVIMETRICO COMO FOSFOMOLIBDATO DE QUINOLEINA: AÑADIR 50 ML DEL REACTIVO QUIMOCIACO, CUBRIR CON VIDRIO DE RELOJ, COLOCAR EN PLACA CALIENTE CON VITRINA BIEN VENTILADA Y HERVIR DURANTE UN MINUTO, ENFRIAR A TEMPERATURA AMBIENTE, AGITAR CUIDADOSAMENTE FORMANDO REMOLINOS TRES O CUATRO VECES DURANTE EL ENFRIAMIENTO.

FILTRAR CON UN CRISOL (13.2.1) PREVIAMENTE DESECADO A 250 C Y TARADO, LAVAR CINCO VECES CON PORCIONES DE 25 ML DE AGUA.

DESECAR EL CRISOL CON SU CONTENIDO A 250 C DURANTE TREINTA MINUTOS, ENFRIAR EN DESECADOR Y PESAR EL FOSFOMOLIBDATO DE QUINOLEINA (C 9 H 7 N 3) H 3 (PO 4 12MOO 3). EFECTUAR PARALELAMENTE UN ENSAYO EN BLANCO.

14.5 CALCULOS

COMO EN 13.5.

14.6 OBSERVACIONES

COMO EN 13.6.

14.7 REFERENCIAS

14.7.1 METODOS OFICIALES A.O.A.C. EDICION 1970, NUMEROS 2.032, 2.025, 2.037 Y 2.038.

15. NITROGENO INSOLUBLE EN AGUA

15.1 PRINCIPIO

SEPARAR EN UN FILTRO LA PARTE DE ABONO QUE NO SE SOLUBILIZA EN AGUA Y DETERMINAR EN ELLA EL N TOTAL.

APLICAR CUANDO SE PIDE SEPARADAMENTE EL N SOLUBLE Y EL INSOLUBLE, COMO EN LOS ABONOS Y ENMIENDAS ORGANICOS.

15.2 MATERIAL Y APARATOS

15.2.1 COMO EN EL 8.2.

15.2.2 FILTRO WHATMAN NUMERO 2 O SIMILAR, DE 12 CM DE DIAMETRO.

15.3 REACTIVOS

15.3.1 ETANOL DEL 95 POR 100.

15.3.2 EL RESTO COMO EN 8.3.

15.4 PROCEDIMIENTO

15.4.1 PESAR 2,5 G DE LA MUESTRA Y COLOCAR EN UN ERLLENMEYER DE 50 ML, HUMEDECIENDOLA CON ETANOL. AÑADIR 20 ML DE AGUA Y ESPERAR QUINCE MINUTOS AGITANDO DE CUANDO EN CUANDO.

FILTRAR AL VACIO DECANTANDO POR EL FILTRO (15.2.2).

LAVAR CUATRO O CINCO VECES CON AGUA A LA TEMPERATURA AMBIENTE (20-25 C) Y DECANTAR.

FINALMENTE PASAR TODO EL RESIDUO AL FILTRO.

15.4.2 RECOGER EL FILTRO CON EL RESIDUO, INTRODUCIRLO EN UN MATRAZ KJELDAHL Y DETERMINAR EN ELLO EL N TOTAL COMO EN EL METODO KJELDAHL PARA MUESTRAS SIN NITRATOS.

15.5 CALCULOS

COMO EN 8.5.

15.6 REFERENCIAS

METODO A.O.A.C. EDICION 1980, NUMERO 2.064.

17. POTASIO TOTAL

17.1 PRINCIPIO

CONSISTE EN SOLUBILIZAR EL POTASIO INSOLUBLE EN AGUA, PERO QUE PUEDE SER UTIL COMO FERTILIZANTE, Y DETERMINAR EL TOTAL A CONTINUACION SEGUN EL METODO NUMERO 16.

17.2 MATERIAL Y APARATOS

17.2.1 CAPSULAS DE PLATINO O PORCELANA.

17.2.2 COMO EN 16.

17.3 REACTIVOS

17.3.1 DISOLUCION DE ACIDO CLORHIDRICO AL 1 POR 100.

17.3.2 ACIDO NITRICO CONCENTRADO.

17.3.3 EL RESTO, COMO EN 16.3.

17.4 PROCEDIMIENTO

PESAR 10 G DEL PROBLEMA Y CALCINAR APROXIMADAMENTE A 500 C EN UNA CAPSULA (17.2.1) LENTAMENTE, REMOVIENDO EL CONTENIDO Y NO PASANDO DE ESA TEMPERATURA. OBTENIDA LA CALCINACION, AGREGAR A LA CAPSULA AGUA CALIENTE, DECANTANDO CUIDADOSAMENTE EL CONTENIDO A UN ERLLENMEYER DE 250 ML.

VOLVER A AGREGAR A LA CAPSULA AGUA ACIDULADA CON CLH (17.3.1), CALENTANDO CON CUIDADO PARA QUE NO HAYA PROYECCIONES, LAVAR CON AGUA CALIENTE Y AGREGAR CINCO GOTAS DE NO 3 H ARRASTRANDO TODO EL CONTENIDO DE LA CAPSULA AL ERLLENMEYER EN EL QUE DEBE HERVIR EL CONTENIDO DURANTE UNOS DIEZ MINUTOS. DEJAR ENFRIAR A LA TEMPERATURA AMBIENTE, PASAR EL CONTENIDO A UN MATRAZ AFORADO DE 250 ML, ENRASAR Y HOMOGENEIZAR.

FILTRAR, Y DEL FILTRADO TOMAR 50 ML, QUE EQUIVALEN A 2 G DE PROBLEMA, Y EVAPORAR EN LA CAPSULA HASTA SEQUEDAD, CALCINANDO LIGERAMENTE. EL RESIDUO SE TRATA POR AGUA CALIENTE Y FILTRA, LAVANDO ESCRUPULOSAMENTE LA CAPSULA Y EL FILTRO.

EN EL FILTRADO, DETERMINAR EL POTASIO SEGUN EL METODO NUMERO 16.

17.5 CALCULO

COMO EN 16.5.

17.6 OBSERVACIONES

COMO EN 16.6.

17.7 REFERENCIAS

METODOS OFICIALES DE ANALISIS DE FERTILIZANTES. MINISTERIO DE AGRICULTURA. AÑO 1981.

18. AMINOACIDOS LIBRES Y TOTALES

18.1 PRINCIPIO

EL METODO ESTA BASADO EN LA SEPARACION Y DETERMINACION DE LOS DISTINTOS AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.

PREVIAMENTE A LA CROMATOGRAFIA LOS AMINOACIDOS REACCIONAN CON EL REACTIVO OPA (ORTOFTALALDEHIDO) Y FNIC - C1 (FLUORENIL METIL CLORO FORMIATO) PARA FORMAR DERIVADOS FLUORESCENTES (DERIVACION PRECOLUMNA).

18.2 MATERIAL Y APARATOS

18.2.1 TUBOS DE VIDRIO DE 30 ML, TIPO SOVIREL, O SIMILAR CON TAPON A ROSCA.

18.2.2 MATRACES DE FONDO REDONDO, DE APROXIMADAMENTE 100 ML, DE BOCA ESMERILADA.

18.2.3 DESECADOR CON DOS BOCAS.

18.2.4 BOMBA DE VACIO.

18.2.5 ESTUFA DE DESECACION CON REGULACION AUTOMATICA DE TEMPERATURA.

18.2.6 EVAPORADOR ROTATORIO.

18.2.7 PAPEL DE FILTRO ALBET NUMERO 240, 242 O SIMILAR.

18.2.8 MATRACES AFORADOS DE 50 ML.

18.2.9 TUBOS DE 10 ML.

18.2.10 VIALES DE 10 ML.

18.2.11 CROMATOGRAFO LIQUIDO DE ALTA PRESION CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

CONDICIONES DE DETECCION CON OPA: LONGITUD DE ONDA DE EXCITACION 340 NM. LONGITUD DE ONDA DE DETECCION:

420 NM.

CONDICIONES DE DETECCION CON FMOC: LONGITUD DE ONDA DE EXCITACION: 250 NM. LONGITUD DE ONDA DE DETECCION: 335 NM.

18.2.12 COLUMNA C 18, DE 5 U DE TAMAÑO DE PARTICULA Y DE 20 CM DE LONGITUD.

18.2.13 FASE MOVIL:

18.3.9 REACTIVO FMOC:

DISOLVER 155 MG DE FMOC EN 40 ML DE ACETONA.

18.3.10 HIDROXIDO SODICO 0,1 N.

18.3.11 NITROGENO (GAS PURO).

18.3.12 PATRON DE AMINOACIDOS PARA CALIBRACION:

PREPARAR UNA DISOLUCION PATRON DE AMINOACIDOS CONTENIENDO LAS SIGUIENTES CANTIDADES DE CADA UNO DE ELLOS, EN ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N. UG/ML

ACIDO ASPARTICO 6

ACIDO GLUTAMICO

SERINA

HISTEDINA 8

GLICINA 4

TREONINA 6

ARGININA 4

ALANINA 4

TIROSINA 8

METIONINA 8

VALINA 6

FENILALANINA 8

ISOLEUCINA 6

PROLINA 6

LEUCINA 6

LISINA 6

18.4 PROCEDIMIENTO

18.4.1 AMINOACIDOS TOTALES: HIDROLISIS CON ACIDO CLORHIDRICO 6 N. PESAR UNA CANTIDAD DE MUESTRA (QUE CONTENGAN APROXIMADAMENTE 1,5 MG DE NITROGENO PROCEDENTE DE AMINOACIDOS) E INTRODUCIRLA EN UN TUBO DE VIDRIO DE 30 ML PROVISTO DE TAPON DE ROSCA (18.2.1).

AGREGAR 15 ML DE LA DISOLUCION DE FENOL EN ACIDO CLORHIDRICO 6 N (18.3.1).

LLEVAR A UN DISPOSITIVO DONDE PUEDA INYECTARSE NITROGENO PARA DISPONER DE UNA ATMOSFERA EXENTA DE OXIGENO (DESECADOR CON DOS BOCAS, POR UNA DE LAS CUALES SE INYECTA NITROGENO Y POR LA OTRA SE EXTRAER CON UNA BOMBA DE VACIO).

ESTA OPERACION SE REALIZA CINCO VECES.

LLEVAR A UNA ESTUFA DE 100-105 C DURANTE VEINTICUATRO HORAS.

EVAPORAR EN ROTOVAPOR A UNA TEMPERATURA DE 40-50 C.

UNA VEZ OBTENIDO EL RESIDUO SE DILUYE CON 25 ML DE AGUA DESTILADA Y SE VUELVE A EVAPORAR (EN CASO DE SEGUIR OLIENDO A ACIDO CLORHIDRICO SE REPITE LA OPERACION).

ARRASTRAR EL RESIDUO CON AGUA DESTILADA, FILTRAR SOBRE PAPEL DE FILTRO SECO Y RECOGER EL FILTRADO EN UN MATRAZ DE 50 ML Y AFORAR.

18.4.2 AMINOACIDOS LIBRES.

PESAR LA CANTIDAD DE MUESTRA NECESARIA (QUE CONTENGA APROXIMADAMENTE 1,5 MG DE NITROGENO PROCEDENTE DE AMINOACIDOS) EN UN MATRAZ DE 50 ML Y DILUIR HASTA VOLUMEN CON ACIDO CLORHIDRICO 0,1 N.

18.4.3 DERIVACION.

MEZCLAR EN UN TUBO 1 ML DE SOLUCION DE LA MUESTRA OBTENIDA SEGUN (18.4.1 Y 18.4.2) CON 0,1 ML DE HIDROXIDO SODICO 0,1 N Y 2,9 ML DE AGUA DESTILADA.

PASAR 100 UL DE ESTA DISOLUCION A UN VIAL, AÑADIR 100 UL DE REACTIVO OPA Y MEZCLAR. ESPERAR UN MINUTO. AÑADIR 100 UL DEL REACTIVO FMOC. ESPERAR CUARENTA SEGUNDOS. AÑADIR 100 UL DE PENTANO Y AGITAR. DEJAR SEPARAR LAS FASES E INYECTAR 10 UL DE LA FASE ACUOSA EN EL CROMATOGRAFO.

18.4.4 CROMATOGRAFIA.

LAS LONGITUDES DE ONDA DE INICIACION DEL DETECTOR SON:

EXC. 340 NM.

CONDICIONES DE DETECCION CON OPA.

EM. 420 NM.

ESTAS CONDICIONES SE MANTIENEN HASTA QUE SE OBTENGA EL PICO CORRESPONDIENTE A LA ISOLEUCINA E INMEDIATAMENTE SE CAMBIAN LAS LONGITUDES DE ONDA A:

EXC. 250 NM.

CONDICIONES DE DETECCION CON FMOC.

EM. 335 NM.

DESPUES DE LA ELUCION DEL PICO CORRESPONDIENTE A LA PROLINA SE VUELVE A CAMBIAR DE NUEVO LAS LONGITUDES DE ONDA A:

EXC. 340 NM.

CONDICIONES DE DETECCION CON OPA.

EM. 420 NM.

18.5 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

LOS RESULTADOS SE EXPRESARAN EN PORCENTAJE (P/P) POR COMPARACION DE LAS AREAS DEL PICO DE CADA AMINOACIDO CON EL CORRESPONDIENTE EN EL CROMATOGRAMA DE LA SOLUCION PATRON.

18.6 OBSERVACIONES

EN CASO DE EFECTUARSE HIDROLISIS LOS RESULTADOS DEL TRIPTOFANO NO SON EXACTOS Y LA SENSIBILIDAD PARA LA CISTINA ES BAJA.

EL TRIPTOFANO SE DETERMINARIA SOMETIENDO LA MUESTRA A UNA HIDROLISIS ALCALINA.

LA CISTINA SOMETIENDO LA MUESTRA A UNA OXIDACION CON ACIDO PERFORMICO PREVIA A LA HIDROLISIS.

18.7 REFERENCIAS

18.7.1 DAVIES, M.G.; THOMAS, A.J. <AN INVESTIGATION OF HIDROLYTIC TECHNIQUES FOR THE AMINOACID ANALYSIS OF FOODS TUFFS>. J. SCI. FD.

AGRIC. 1973, 24, 1541-1550.

18.7.2 PFEIFER, R.; KORPI, J.; BURGOYNE, R.; MC COURT, D. <PRACTICAL APPLICATION OF HPLC TO AMINOACID ANALYSIS>. AMERICAN LABORATORY MARCH, 1983.