

to-libranza.—La mitad de la tarifa anterior, es decir, un derecho fijo de dieciséis pesetas, más otro proporcional del cuatro por ciento de la cantidad girada», debe decir: «Giros-depósito-libranza.—La mitad de la tarifa anterior, es decir, un derecho fijo de dieciséis pesetas, más otro proporcional del cuatro por ciento de la cantidad girada».

Página 19381, artículo vigésimo cuatro, apartado Uno. Dos. Uno, en la fórmula de la quinta línea, dice:

$$C = p (P + n_i + K_i + B_i),$$

debe decir:

$$C = p (P + \sum n_i K_i B_i).$$

21118

ORDEN de 31 de julio de 1979 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados, fertilizantes, productos fitosanitarios, productos lácteos, piensos, aguas y productos derivados de la uva.

Excelentísimos señores:

Por Ordenes de 30 de noviembre de 1976 («Boletín Oficial del Estado» de 4 de enero de 1977) y de 31 de enero de 1977 («Boletín Oficial del Estado» de 14 de julio) se establecieron diversos métodos oficiales de análisis, contemplando en el apartado segundo la posibilidad de su ampliación a medida que los correspondientes grupos de trabajo avancen en el estudio de nuevos métodos. Por otra parte, el continuo progreso de las técnicas de análisis aconsejan la revisión periódica de estos métodos modificándolos, completándolos o sustituyéndolos.

En consecuencia, a propuesta de los Ministros de Defensa, de Hacienda, de Administración Territorial, de Sanidad y Seguridad Social, de Industria y Energía, de Comercio y Turismo y de Agricultura, esta Presidencia del Gobierno dispone:

Primero.—Se aprueban como oficiales los métodos de análisis de aceites y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados, fertilizantes, productos fitosanitarios, productos lácteos, piensos, aguas y productos derivados de la uva, que se citan respectivamente en los anejos del I al IX.

Segundo.—Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis y hasta que sean estudiados por el grupo de trabajo correspondiente, podrán ser utilizados los adoptados por Organismos nacionales o internacionales de reconocida solvencia.

Tercero.—Quedan derogadas las disposiciones de igual o inferior rango que se opongan a la presente Orden.

Cuarto.—La presente disposición entrará en vigor a los treinta días de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Lo que comunico a VV. EE.  
Madrid, 31 de julio de 1979.

PEREZ-LLORCA Y RODRIGO

Excmos. Sres. Ministros de Defensa, de Industria y Energía, de Hacienda, de Comercio y Turismo, de Administración Territorial, de Sanidad y Seguridad Social y de Agricultura.

## ANEJO I

### MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ACEITES Y GRASAS 10(b). ÍNDICE DE ACIDEZ

(Método potenciométrico)

#### 10(b).1. Principio.

La determinación de la acidez libre se efectuará por volumetría, utilizando indicador potenciométrico, siendo éste el método aplicable cuando la valoración intensa de la solución o su turbidez dificultan la apreciación del viraje del indicador coloreado.

#### 10(b).2. Material y aparatos.

10(b).2.1. Equipo de valoración potenciométrica equipado con electrodos de vidrio/calomelano o de wolframio/calomelano.

- 10(b).2.2. Agitador magnético.
- 10(b).2.3. Bureta de 25 ml, dividida en décimas de ml.
- 10(b).2.4. Matraz aforado de 1.000 ml.
- 10(b).2.5. Probeta graduada de 50 ml.
- 10(b).2.6. Vasos de precipitado de 150 ml, forma alta.

#### 10(b).3. Reactivos.

- 10(b).3.1. Isobutil-metil-cetona  $d_{40}^{20} = 0,8$ ; p. e. = 114-117°C.
- 10(b).3.2. Isopropanol.
- 10(b).3.3. Hidróxido potásico.

- 10(b).3.4. Ácido benzoico.
- 10(b).3.5. Disolución 0,1 N de hidróxido potásico en isopropanol.

Pesar 7 g de hidróxido potásico, en lentejas, e introducirlos en un matraz aforado de un litro. Adicionar alcohol isopropílico, agitar con agitador magnético hasta conseguir una disolución completa y enrasar. Esta disolución se valora con ácido benzoico.

#### 10(b).4. Procedimiento.

##### 10(b).4.1. Preparación de la muestra.

La muestra deberá estar seca y libre de materias extrañas en suspensión. En caso contrario, antes de proceder a la pesada, deberá decantarse el agua si hubiese lugar a ello; y, en todo caso, filtrar con papel de filtro, efectuándose esta operación a una temperatura ligeramente superior a la del punto de fusión de la grasa.

Las grasas que contengan ácidos grasos volátiles no podrán calentarse, debido al riesgo de volatilización de ácidos libres. En estos casos, se procederá a la determinación de la acidez directamente, refiriéndose a muestra seca y exenta de impurezas insolubles, basándose en las determinaciones realizadas sobre muestras independientes.

##### 10(b).4.2. Determinación.

Pesar de 5 a 10 g de materia grasa en un vaso de 150 ml y agregar 50 ml del reactivo 10(b).3.1. A continuación introducir los electrodos y proceder a la valoración con la disolución de hidróxido potásico.

##### 10(b).5. Cálculos.

Calcular el índice de acidez aplicando la siguiente fórmula:

$$I_A = \frac{V \cdot 56,11 \cdot N}{P}$$

A = volumen, en ml, consumidos en la valoración.  
N = normalidad de la disolución de hidróxido potásico.  
P = peso, en g, de la muestra.

##### 10(b).6. Observaciones.

Cuando se utilicen electrodos simples la unión entre la disolución saturada de cloruro potásico y la disolución de medida es conveniente hacerla a través de una espiga de porcelana porosa de unos 3 cm de longitud o por cualquier otro sistema que impida una difusión apreciable entre ambas disoluciones durante el tiempo que dura la valoración.

##### 10(b).7. Referencias.

1. Instituto Nacional de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española 55.063.

## 11(b). ÍNDICE DE SAPONIFICACION (Método potenciométrico)

#### 11(b).1. Principio.

Se denomina índice de saponificación el peso en mg de hidróxido potásico necesario para saponificar 1 g de materia grasa.

La determinación se realiza saponificando la muestra con una disolución previamente valorada de hidróxido potásico, determinando por volumetría el exceso de hidróxido potásico, utilizando indicador potenciométrico. Este método debe aplicarse cuando la coloración intensa de la solución o turbidez dificulten la apreciación del viraje del indicador coloreado.

#### 11(b).2. Material y aparatos.

11(b).2.1. Equipo de valoración potenciométrica equipado con electrodos de vidrio/calomelano o wolframio/calomelano.

- 11(b).2.2. Agitador magnético.
- 11(b).2.3. Bureta de 25 ml, dividida en décimas de ml.
- 11(b).2.4. Pipeta aforada de 25 ml.
- 11(b).2.5. Matraz aforado de 1.000 ml.
- 11(b).2.6. Probeta graduada de 50 ml.
- 11(b).2.7. Matraces redondos de 100 ml provistos de tubo de reflujo, de un metro de longitud, con ajuste normalizado 14/23.
- 11(b).2.8. Vasos de precipitado de 150 ml, forma alta.

#### 11(b).3. Reactivos.

- 11(b).3.1. Isopropanol.
- 11(b).3.2. Etilenglicol. Índice de refracción a 20°C: 1,4274-1,4292.
- 11(b).3.3. Ácido clorhídrico  $d = 1,18$ .
- 11(b).3.4. Hidróxido potásico.
- 11(b).3.5. Tris-(hidroxi-metil)-aminometano (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>ONH<sub>4</sub> de calidad utilizada para la preparación de soluciones patrón, peso equivalente 121,14.

11(b).3.6. Disolución 0,5 N de hidróxido potásico en isopropanol. Pesar 35 g de hidróxido potásico, en lentejas, e introducir en un matraz aforado de 1 litro. Adicionar alcohol isopropílico, agitar con agitador magnético hasta conseguir la disolución completa y enrasar.

11(b).3.7. Disolución 0,5 N de ácido clorhídrico en isopropanol. Medir con probeta 42 ml de ácido clorhídrico y verterlos en un matraz aforado de 1.000 ml, completando el volumen hasta el enrase con isopropanol. Para valorar esta disolución pesar, en vidrio de reloj y con precisión de 0,2 mg, aproximadamente, 1,2 g de tris-(hidroxi-metil)-aminometano, pasándolo a un vaso de 150 ml, forma alta. Disolver en 20 ml de isopropanol, adicionándose 20 ml de etanodiol, efectuándose seguidamente la valoración con la disolución clorhídrica, según se describe en 11(b).4.2. La valoración también se puede realizar utilizando indicador coloreado, adicionándose para ello 2 gotas de disolución azul de timol al 1 por 100 en isopropanol, acusándose el punto de equivalencia por un viraje brusco del amarillo al rosa. Sean P los gramos de THMAM pesados y V los mililitros de ácido clorhídrico consumidos en la valoración:

$$N = \frac{P}{0,12114 \cdot V}$$

#### 11(b).4. Procedimiento.

##### 11(b).4.1. Preparación de la muestra.

La muestra deberá estar seca y libre de materias extrañas en suspensión. En caso contrario, antes de proceder a la pesada, deberá decantarse el agua, si hubiere lugar a ello, y, en todo caso, filtrar por papel de filtro, efectuándose esta operación a una temperatura ligeramente superior a la del punto de fusión de la grasa.

Las grasas que contengan ácidos grasos volátiles no podrán calentarse, debido al riesgo de volatilización de ácidos libres. En estos casos, se procederá a la determinación de la acidez directamente, refiriéndose a muestra seca y exenta de impurezas insolubles, basándose en las determinaciones realizadas sobre muestras independientes.

##### 11(b).4.2. Determinación.

Pesar en un matraz redondo de 100 ml, aproximadamente, 2 g de la muestra. Adicionar seguidamente con pipeta 25 ml de la disolución 0,5 N de 11(b).3.6. Ajustar el tubo de reflujo y calentar hasta ebullición, manteniéndola durante media hora o más si fuera necesario hasta conseguir la saponificación completa. Retirar el matraz y dejar enfriar. Antes de que se enfríe completamente transvasar el contenido a un vaso de precipitado de 150 ml, lavando el matraz con 30 ml de etilenglicol adicionado en porciones sucesivas. Completar el lavado con 5 ml de isopropanol. Paralelamente se realiza una prueba en blanco con 25 ml de la disolución de hidróxido potásico 0,5 N. Al terminar el período de ebullición enfriar y transvasar a un vaso de 150 ml como anteriormente. A continuación introducir los electrodos y proceder a la valoración con la disolución de ácido clorhídrico. Ver 11(b).6.

##### 11(b).5. Cálculos.

Calcular el índice de saponificación aplicando la siguiente fórmula:

$$I_s = \frac{(V_0 - V) \cdot N \cdot 56,1}{P}$$

Siendo:

$V_0$  = volumen, en ml, consumidos en la valoración en blanco.  
 $V$  = volumen, en ml, consumidos en el ensayo con la muestra de materia grasa.  
 $N$  = normalidad de la disolución de ácido clorhídrico.  
 $P$  = peso, en g, de la muestra.

##### 11(b).6. Observaciones.

Cuando se utilicen electrodos simples la unión entre la disolución saturada de cloruro potásico y la disolución de medida se hará a través de una espiga de porcelana porosa de unos 3 cm de longitud o por cualquier otro sistema que impida una difusión apreciable entre ambas disoluciones durante el tiempo que dure la valoración.

##### 11(b).7. Referencias.

1. Instituto de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española 55.064.

#### 41. DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA GASEOSA

##### 41.1. Principio.

El método está basado en la separación y determinación por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Es aplicable a aceites y grasas tanto vegetales como animales, que circulan normalmente en el comercio, conteniendo

ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono. En el caso de la mantequilla y de otras grasas que contengan ácidos grasos inferiores, deberá utilizarse un método adecuado para la preparación de los ésteres metílicos o aislamiento de los ácidos libres de pequeña longitud de cadena, siendo necesario para la separación y determinación de estos últimos, efectuar la cromatografía en condiciones distintas de las que se describen en esta norma.

Las condiciones que se especifican no son adecuadas para la determinación de ácidos grasos oxidados y epoxiácidos, por lo que la presencia de estos ácidos dificulta la operación, pudiendo llegar a falsear completamente los resultados.

#### 41.2. Preparación de los ésteres metílicos.

##### 41.2.1. Material necesario.

41.2.1.1. Matraz redondo, fondo plano, de unos 50 ml de capacidad, con boca esmerilada.

41.2.1.2. Refrigerante de agua adaptable al matraz anterior, para su utilización como refrigerante de reflujo.

41.2.1.3. Ampolla de decantación de unos 500 ml de capacidad.

41.2.1.4. Matraz redondo, fondo plano, de unos 100 ml de capacidad.

41.2.1.5. Matraz, fondo plano, de unos 50 ml de capacidad, boca esmerilada, cuello de 40 a 50 mm de longitud y 10 milímetros diámetro exterior.

##### 41.2.2. Reactivos necesarios.

41.2.2.1. Metanol absoluto (99,8 por 100), calidad reactivo para análisis.

41.2.2.2. Sodio metálico reactivo para análisis.

41.2.2.3. Disolución de metilato sódico. Se disuelven 5 g de sodio metal en 1.000 ml de metanol absoluto (0,2 N aproximadamente).

41.2.2.4. Eter de petróleo (p. e. 40° 60° C) o hexano de calidad adecuada para cromatografía.

41.2.2.5. Disolución en metanol absoluto, de ácido clorhídrico anhidro al 3-4 por 100. Se puede obtener fácilmente el ácido clorhídrico gaseoso haciendo caer lentamente, en aparato adecuado, ácido sulfúrico ( $d = 1,84$ ), sobre una disolución de ácido clorhídrico ( $d = 1,16$ ); se seca el gas haciéndolo pasar por un frasco lavador con ácido sulfúrico y se hace llegar al metanol anhidro, contenido en un Erlenmeyer.

Pesando el Erlenmeyer con el metanol al comienzo de la operación, por pesadas sucesivas, se determina la cantidad disuelta de clorhídrico, prolongando la operación hasta alcanzar una concentración superior a la deseada. Se adiciona la cantidad de metanol para lograr la concentración del 3-4 por 100 (p/p).

41.2.2.6. Cloruro sódico.

41.2.2.7. Sulfato sódico anhidro, calidad reactivo para análisis.

41.2.2.8. Disolución de fenoltaleína al 1 por 100 en metanol.

41.2.2.9. Disolución de rojo de metilo al 0,1 por 100 en metanol al 60 por 100 (v/v).

41.2.2.10. Gas nitrógeno puro, con un contenido mínimo del 99,8 por 100.

##### 41.2.3. Procedimiento operatorio.

41.2.3.1. Preparación de los ésteres metílicos.—Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden ser preparados por interesterificación directa de la grasa, siguiendo el método que se detalla en el párrafo siguiente, el cual tiene un carácter general, aplicable a una grasa, cualquiera que sea su acidez libre y siempre que no tenga un contenido de materia insaponificable superior al 2 por 100, como es el caso de la inmensa mayoría de las materias grasas corrientes.

Pesar 0,3 g de grasa perfectamente homogeneizada en el matraz de 50 ml (ver nota 41.5.1), y se agregan 6 ml de la disolución de metilato sódico. Se coloca el refrigerante al matraz, se hierve hasta obtención de una sola fase y, como mínimo, 5 min. Se interrumpe la calefacción.

Se agregan al matraz 6 ml de la disolución de clorhídrico en metanol y se vuelve a calentar, manteniendo en ebullición durante 5 min. Se enfría y se procede según se indica en el apartado 41.2.3.2 (ver 41.5.3).

41.2.3.1.1. En el caso de materias grasas con una acidez libre no superior al 0,3 por 100, como sucede normalmente en aceites refinados, se puede simplificar el procedimiento omitiendo la metanólisis en medio ácido. Se realiza la metanólisis según se indica en el apartado 41.2.3.1, y, estando todavía caliente el matraz, se agrega, por la parte superior del refrigerante, una gota de disolución indicadora de fenoltaleína y, seguidamente, disolución de clorhídrico en metanol, en una cuantía algo superior a la necesaria para neutralizar el metilato, acusado por el viraje de la fenoltaleína. Se deja enfriar, pasándose la disolución contenida en el matraz a la ampolla de extracción, siguiéndose según se indica en el apartado 41.2.3.2.

41.2.3.1.2. Si se trata de ácidos grasos libres o materias grasas de fuerte acidez (80 por 100 en ácido oleico), se podrá omitir la metanólisis alcalina, reduciendo la operación a la

metanólisis en medio ácido Para ello, se pesa, en el matraz en que se vaya a realizar la operación 0,3 g de muestra, previamente filtrada y seca. Se agregan 6 ml de la disolución de clorhídrico en metano, procediendo como se señala en el apartado 41.2.3.2.

41.2.3.1.3. En el caso de que sea necesario la eliminación previa de la materia insaponificable, se procede según se indica en el método 22(a) «Insaponificable. Método éter de petróleo». La disolución hidroalcohólica de jabón se concentra al vacío, preferiblemente en evaporador rotatorio o bajo corriente de hidrógeno, si no se dispusiese de este aparato, hasta alcanzar unos 50 ml aproximadamente; se pasa el concentrado a una ampolla de extracción, acidificando con ácido clorhídrico 2 N hasta reacción ácida al rojo de metilo. Se extrae con éter de petróleo o hexano, procediéndose de forma análoga a como se indica en el apartado 41.2.3.1.2 para la preparación de los ésteres metílicos.

41.2.3.2. Extracción de los ésteres metílicos.—Para la extracción de los ésteres metílicos se procede según uno de los métodos que se describen a continuación. En los análisis que interesen mucho la rapidez y se opere con aceites y grasas de tipo normal, es preferible el método a). Este método tiene, además, la ventaja de no exigir la evaporación del disolvente y, por tanto, se disminuye el riesgo de pérdida de ácidos grasos de bajo peso molecular, cuando existen en el problema. El método b) es un procedimiento más seguro de recuperación cuantitativa de los ácidos grasos y debe ser utilizado como método de referencia en los límites de aplicación de esta norma. Operando de la forma que se indica en el apartado 41.2.3.2.2, hay riesgo de pérdida de ácidos grasos con longitud de cadena inferior a C<sub>12</sub>.

41.2.3.2.1. Método a).—Se pasa la disolución contenida en el matraz a otro de unos 50 ml de capacidad, con cuello estrecho y largo (41.2.1.5), enjuagando con unos 6-8 ml de hexano o heptano de pureza adecuada para cromatografía gaseosa, que se vierten también al matraz, calentándose suavemente sin llegar a hervir, mientras se agita dando un movimiento de rotación al matraz, durante uno o dos minutos. A continuación se agrega disolución acuosa saturada de cloruro sódico en cantidad suficiente para situar la capa de hexano o heptano en el cuello del matraz. Esta disolución, que contiene los ésteres metílicos, debe estar limpia y transparente, tomándose con una pipeta 2 ó 3 ml, que se pasan a un frasquito o a una ampolla para su conservación, pudiéndose inyectar directamente esta disolución en el cromatógrafo.

Si la metilación se hubiera efectuado en este matraz, no hará falta el transvase, adicionándose directamente 6-8 ml de hexano o heptano y la disolución de cloruro sódico.

41.2.3.2.2. Método b).—Se pasa la disolución contenida en el matraz a una ampolla de extracción de 500 ml, enjuagando con unos 20 ml de éter de petróleo o hexano y añadiendo, a continuación, en la ampolla 100 ml de agua destilada. Se agita enérgicamente y se deja reposar. Se decanta la capa inferior, que se pasa a otra ampolla de extracción y se vuelve a extraer con otros 20 ml de éter o hexano, repitiéndose la operación una vez más. Los tres extractos se reúnen en una ampolla de extracción, y se lavan con porciones sucesivas de 10 ml de agua destilada, hasta eliminación completa del ácido, acusado con la disolución indicadora de rojo de metilo. Se seca la disolución con sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente en el matraz de 100 ml, calentando en un baño de agua bajo corriente de nitrógeno. Esta operación se debe realizar, preferiblemente, en un evaporador rotatorio de vacío.

41.2.3.3. Conservación de la disolución de ésteres metílicos. Los ésteres metílicos obtenidos por uno u otro procedimiento deben ser utilizados en el análisis tan pronto como sea posible. Pueden conservarse durante 24 horas en un frasco bien tapado; desalojando previamente el aire con nitrógeno y guardando a baja temperatura. Para almacenamiento durante periodos de tiempo más largos es necesario conservar en ampolla cerrada a la lámpara, de la cual se ha desalojado previamente, el aire con una corriente de nitrógeno. La eliminación del aire se hace barbotando el nitrógeno en la disolución de hexano.

### 41.3. Procedimiento cromatográfico.

#### 41.3.1. Material necesario.

41.3.1.1. Cromatógrafo.—Un cromatógrafo apto para la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos, que disponga de un horno capaz de ser calentado a temperatura regulada hasta 250-300° C, superior a la temperatura del horno; un sistema de detección sensible, y un aparato registrador continuo.

41.3.1.2. Tubo de nitrógeno.—Un tubo de nitrógeno a presión, utilizable como gas portador, debiendo tener una riqueza mínima del 99,8 por 100.

41.3.1.3. Jeringa.—Una jeringa para la inyección de la muestra, con una capacidad de 5 ó 10 µl.

41.3.1.4. Aire seco y puro.

41.3.1.5. Hidrógeno con una riqueza mínima del 99,9 por 100 y seco.

41.3.1.6. Columna.

41.3.1.6.1. Columna de acero inoxidable, aluminio, o vidrio de 2-4 mm de diámetro interior y 2 m de longitud rellena de

Chromosorb G o W (80-100 mallas), Calite 545 (80-100 mallas) o cualquier otra columna que cumpla las condiciones especificadas en el apartado 41.4.2.

#### 41.3.1.6.2. Preparación de la columna.

41.3.1.6.2.1. Preparación del soporte.—Para los fines propuestos en esta norma, son recomendables como soportes el Chromosorb G o W de 80-100 mallas, aunque sin excluir la posibilidad de que puedan ser utilizados otros productos análogos de eficacia comprobada, que puedan comportarse de forma análoga o, incluso, superior a los recomendados.

El soporte elegido deberá haber sido lavado con ácido y sometido a un tratamiento de silanización.

Para conseguir un comportamiento óptimo de la columna es importante que el relleno tenga la mayor homogeneidad posible, siendo necesario para ello que el granado del soporte sea uniforme. En caso de duda, debe procederse a un tamizado del producto lavado con ácido y silanizado, suministrado por la casa fabricante, recogiendo únicamente la porción que pasa por el tamiz 80 y es retenido por el 100 desechando los gruesos y finos (ver 41.5.3)

41.3.1.6.2.2. Impregnación del soporte.—Se pasa la cantidad de soporte que se desee, introduciéndolo en un matraz de 100 a 200 ml de capacidad, agregando la cantidad necesaria de cloruro de metileno para conseguir una papilla fluida. Se hace el vacío en el matraz hasta que cese el desprendimiento del aire ocluido en el soporte. A continuación se agrega la cantidad de fase fija correspondiente al 2,5 por 100 del peso del soporte utilizado, disuelta en el volumen necesario de cloruro de metileno. Se homogeniza la mezcla, haciendo nuevamente el vacío y manteniéndolo durante 10-15 minutos. Transcurrido este tiempo, se tapa el matraz, dejándolo en reposo durante unas 10-12 horas.

Seguidamente se elimina el disolvente en evaporador rotatorio, con vacío. Una vez seco el relleno, se introduce el matraz en una estufa calentada a unos 150° C, manteniéndolo así durante 4-6 horas.

Terminada esta operación, el relleno queda listo para su introducción en la columna y acondicionamiento, tal como se describe en los apartados siguientes:

41.3.1.6.2.3. Llenado de la columna.—Introducir el soporte impregnado con fase fija en la columna, haciendo vacío por un extremo y vibrándola suavemente por percusión o con un vibrador magnético, hasta su llenado total. Es preciso que el material rellene la columna homogéneamente, evitando un empaquetamiento heterogéneo que le haría perder eficacia. Obturar los extremos con tapón de lana de vidrio y/o cilindros de mallas metálicas de cobre o acero inoxidable.

41.3.1.6.2.4. Antes de emplear una columna nueva en la resolución de problemas analíticos, debe ser acondicionada, montándola en el cromatógrafo desconectada del detector y calentando a unos 10° por encima de la temperatura máxima a que vaya a ser utilizada; haciendo pasar, al mismo tiempo, una corriente de nitrógeno, que se mantiene durante veinticuatro horas como mínimo. La columna es apta para su utilización, si la línea base dibujada por el registrador acusa la estabilidad del sistema.

#### 41.3.2. Condiciones operativas.

41.3.2.1. Se ajusta el flujo del gas portador (nitrógeno), que debe ser el adecuado para permitir la elución del linolenato de metilo en un tiempo mínimo de veinticinco minutos. La presión de entrada y el flujo necesario para conseguirlo varía según la columna y el instrumento utilizado, pero es relativamente constante para un aparato y columna determinada. Es necesario mantener un flujo constante durante todo el análisis. El flujo gaseoso se mide con un medidor de burbuja de jabón y otro dispositivo adecuado.

Se pone en marcha la calefacción del horno de la cámara de inyección y del detector. El horno se regula a una temperatura aproximada de 160°-170° C; la cámara de inyección, a una temperatura de 50° C superior a la temperatura de la columna, y el detector, a 25° C por encima de la temperatura de la columna.

Las condiciones de trabajo indicadas anteriormente deben considerarse como orientación, ya que la imposibilidad práctica de conseguir el mismo comportamiento en columnas diferentes y las variaciones que presentan en sus características y condiciones operativas los diversos aparatos que se encuentran en el comercio, hace imposible fijar, a priori, unas condiciones invariables de trabajo, aplicables a todos los casos y en todas las circunstancias.

Las condiciones operativas más adecuadas deben ser establecidas por cada operador, a la vista de los resultados obtenidos con mezclas patrones de ésteres metílicos, siguiendo las instrucciones que se dan en el apartado 41.3.3.

Para todos los demás detalles operativos no mencionados en esta norma, se deben seguir las instrucciones dadas por la casa fabricante del aparato.

Se prepara una disolución de los ésteres metílicos con acetona o hexano, cuya pureza haya sido previamente comprobada y, utilizando la jeringa, se inyectan 0,4-0,6 µl, y se retira rápidamente la aguja.

El registro obtenido debe satisfacer las condiciones que se indican a continuación; caso contrario, se repite la inyección hasta obtener un cromatograma satisfactorio.

Los requisitos exigibles son los siguientes:

a) El área total descrita en el cromatograma, referida a la sensibilidad máxima utilizada en el curso de la operación, debe ser de un orden aproximado de 2.000 mm<sup>2</sup>, con una velocidad del papel, en el registrador, de 5mm/min. De esta forma, los componentes presentes, en una cuantía del 0,1 por 100, deben dar un pico, como mínimo, de 2 mm<sup>2</sup>, siendo, por tanto, perfectamente reconocibles.

b) Con el fin de conseguir que todos los picos caigan dentro del papel registrador, se utilizará, en cada caso, la atenuación de sensibilidad que sea necesaria.

Una vez conseguido un registro satisfactorio, y habiendo alcanzado nuevamente la pluma la línea base, se interrumpe el funcionamiento del registrador y se retira el papel con el registro para la identificación de los picos cuantitativos.

#### 41.3.3. Identificación de los picos.

41.3.3.1. Criterio basado en los tiempos de retención.—Refiriéndonos exclusivamente a los ácidos que entran normalmente en la composición de las grasas naturales, sus ésteres aparecen en el cromatograma en orden creciente de sus átomos de carbono y a su insaturación. Esto es, el palmítico (C<sub>16</sub>) aparece delante del esteárico (C<sub>18</sub>), y los ésteres en C<sub>18</sub> aparecen en el orden esteárico, oleato, linolenato. El éster del ácido aráquico (C<sub>20:0</sub>), usualmente, aparece antes del linoléico (C<sub>18:2</sub>) pero, puede ocurrir lo contrario, en algunos casos, dependiendo del tipo de columna y de las condiciones de su utilización; o incluso, superponerse el uno al otro.

Operando en condiciones constantes, los tiempos de retención son reproducibles en cada especie química, siendo el criterio más frecuente empleado para su identificación.

El tiempo de retención viene dado por la distancia, medida en el cromatograma, entre el máximo del pico del aire y la posición del máximo de la banda. Trabajando con detector de llama de hidrógeno, la salida del aire no se detecta, pudiéndose tomar, en este caso, el momento en que se inicia la salida del disolvente, acusada por una fuerte desviación de la pluma del registrador.

41.3.3.2. Criterio basado en los tiempos de retención relativos.—Los tiempos de retención relativos son más reproducibles. Las retenciones relativas vienen determinadas por el cociente de dividir el tiempo de retención de cada pico por el tiempo registrado para el pico del palmitato de metilo, o bien por otro éster que se tome como comprobación, determinados todos ellos según el criterio expuesto en el apartado 41.3.3.1.

41.3.3.3. Como el comportamiento de la columna cambia como consecuencia de factores muy diversos, y durante su utilización continuada experimenta un proceso de envejecimiento que altera su capacidad de retención, es conveniente comprobar, periódicamente, la posición de los distintos ésteres en el cromatograma, utilizando mezclas patrones convenientemente preparadas, o bien ésteres metílicos de una grasa previamente analizada y conocida. Esto constituye una de las operaciones de comprobación a que se hace referencia en el capítulo 41.4.

#### 41.3.4. Determinación cuantitativa.

La determinación cuantitativa se basa en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los triángulos dibujados debajo de cada pico. El área de cada triángulo se obtiene trazando rectas tangentes a los puntos de inflexión de cada pico, prolongándolas hasta su intersección con la línea base y multiplicando la altura del triángulo por la mitad de la base. En el caso de haber trabajado con atenuaciones diferentes para cada pico, se referirán todas las medidas a una misma sensibilidad del registrador, multiplicando la altura por el factor de atenuación correspondiente en cada caso, y el valor de la altura así corregida, por la mitad de la base. Si no es necesario efectuar corrección en relación al cambio de atenuación, como ocurre en la mayor parte de los análisis de rutina en que se trabaja con una sola atenuación, la medida del área se realiza más cómodamente multiplicando la altura del pico por el ancho a la mitad de la altura. El contenido de cada ácido en la muestra viene dado por la expresión

$$\text{Porcentaje A en peso} = \frac{\text{Superficie A}}{\sum \text{de las superficies}} \times 100,$$

siendo A el éster metílico correspondiente a un pico dado.

#### 41.4. Operaciones de comprobación.

##### 41.4.1. Reactivos necesarios:

Laurato de metilo.  
Palmitato de metilo.  
Esteárico de metilo.  
Oleato de metilo.  
Linoleato de metilo.

Estos ésteres metílicos han de ser puros, comprobada su pureza por cromatografía gaseosa, y conservados en condiciones que garanticen su inalterabilidad y comerciales como se indica en 41.2.3.3.

41.4.2. Prueba de comportamiento del instrumento y de la columna.

Se realiza determinando la resolución de dos productos críticos, como son el oleato y el esteárico de metilo. La resolución viene determinada por la expresión

$$\text{Resolución} = \frac{2D}{O + E}$$

Siendo:

D = distancia entre los dos máximos de los picos del oleato y el esteárico.

O = ancho de la base del pico correspondiente al oleato.

E = ancho de la base del pico correspondiente al esteárico.

Estos valores se determinan sobre el cromatograma obtenido con una muestra que contenga cantidades aproximadamente iguales de esteárico y oleato de metilo, inyectando una cantidad tal que la altura de estos picos alcance al 25-50 por 100 del ancho del papel de registro.

Si la resolución calculada es igual o mayor que 1,0, la columna y el instrumento se encuentran en condiciones satisfactorias. Todas las columnas en el transcurso de su utilización, sufren una pérdida gradual en la resolución de los picos; cuando el valor llegue a ser inferior a 1,0, debe instalarse una nueva columna.

#### 41.4.3. Situación de los ésteres en el cromatograma.

Utilizando los productos patrones a que se hace referencia en el apartado 41.4.1, se prepara una mezcla que contenga, preferiblemente, cantidades de un orden aproximado al existente en la grasa o grasas que se trata de analizar. Se registra el cromatograma de la forma usual, determinando los tiempos de retención absolutos o relativos para cada una de las especies contenidas en la mezcla.

En el caso de tener que identificar en el problema algún pico que no coincide con los ésteres contenidos en la mezcla patrón, es de suma utilidad efectuar, a partir de los datos obtenidos con la mezcla patrón, la representación gráfica de la función que relaciona los logaritmos de los tiempos de retención, con el número de átomos de carbono de cada ácido; para los términos comprendidos en una misma serie homóloga, esta función es lineal; por lo tanto, los tiempos de retención de los términos de la serie de los que no se disponga de muestra patrón pueden calcularse por interpolación o viceversa.

#### 41.4.4. Calibrado para aplicación cuantitativa.

Utilizando los productos patrones a que se hace referencia en el apartado 41.4.1, se prepara una mezcla que contenga cantidades exactamente pesadas de cada uno de los ésteres, debiendo tener una composición análoga a la de la muestra problema. Se registra el cromatograma de la forma usual, efectuándose los cálculos cuantitativos según se indica en el apartado 41.3.4.

Los resultados deducidos del cromatograma coinciden, normalmente, con los valores reales de la mezcla patrón. Sin embargo, en algunos casos, debido a diversas causas, se observan discrepancias que pueden ser corregidas aplicando factores de corrección. Estos factores de corrección no son aplicables más que en la parte lineal de la curva de respuesta del detector para cada constituyente. Por consiguiente, el operador debe ser extremadamente prudente en lo que respecta a la aplicación de estos factores, ya que ellos pueden variar en función de la composición de la mezcla a analizar, modificaciones en el detector y en el amplificador, alteración de la fase fija, etc. Si la cantidad encontrada para un ácido graso cualquiera de la mezcla patrón discrepa en más de un 10 por 100 de la cantidad calculada, éste indica que el aparato no funciona correctamente, siendo necesario buscar la causa.

El factor de corrección para cada ácido se calcula con relación al ácido palmítico, utilizando mezclas patrones con una composición análoga a la de la muestra problema que se trata de analizar. Se procede de la forma siguiente: se divide el porcentaje de cada ácido por el área del pico correspondiente y el cociente por el valor obtenido para el ácido palmítico:

$$f_x = \frac{x}{A_x} : \frac{P}{A_p} = \frac{x}{A_x} : \frac{A_p}{P}$$

Siendo:

$f_x$  = factor de corrección del ácido.

$x$  = tanto por ciento del ácido en la mezcla patrón.

$A_x$  = área del pico  $x$ .

$P$  = tanto por ciento del ácido palmítico en la mezcla patrón.

$A_p$  = área del pico del ácido palmítico.

Para aplicar estos factores a la mezcla problema se multiplican por la relación entre el área medida para cada ácido en el cromatograma y el área del pico correspondiente al ácido palmítico; se obtiene, procediendo de esta forma, la relación entre el contenido de cada ácido y el palmítico, tomado como unidad.

$$\frac{X}{P} = f_x \cdot \frac{A_x}{A_p}$$

Si están comprendidos en el cromatograma todos los ácidos componentes de la mezcla problema, a partir de las relaciones

calculadas se puede pasar fácilmente a la composición centesimal.

41.5. Notas.

41.5.1. En el caso de utilizarse el método de extracción a) (apartado 41.2.3.2.1), la pesada y metilación de la muestra se efectuará más cómodamente en el matraz de cuello largo, descrito en el apartado 41.2.1.5, efectuándose en el mismo recipiente, sin necesidad de transvasar, la adición de la disolución saturada de cloruro sódico.

41.5.2. En el caso de que se tuviese dificultad en la preparación de la disolución de ácido clorhídrico, se podría sustituir con una disolución del 5-8 por 100 (p/p) de ácido sulfúrico ( $d = 1,04$ ), en metanol anhidro, utilizable también en las operaciones descritas en los apartados 41.2.3.1.1 y 41.2.3.1.2.

41.5.3. La designación de los tamices corresponde a la nomenclatura del sistema U. S., referida a número de mallas por pulgada lineal; de acuerdo con la Norma UNE 7050, los tamices de 80 y 100 mallas/pulgada lineal (sistema U. S.) serían designados, respectivamente, tamiz 0,177 UNE 7050 y tamiz 0,149 UNE 7050, siendo las cifras indicadas las aberturas de malla, expresadas en milímetros.

41.6. Referencias.

UNE 55.037 Materias grasas. Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

43. RECONOCIMIENTO DE ÉSTERES NO GLICERIDOS EN GRASAS COMESTIBLES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

43.1. Principio.

Disolución de la muestra en hexano y posterior separación de los triglicéridos por cromatografía en capa fina.

Es aplicable a todos los aceites vírgenes o refinados, utilizables directamente en la alimentación humana.

El método ha sido estudiado con ésteres de ácidos grasos y los alcoholes siguientes: metanol, 1,2 y 1,3 propilenglicol y etilenglicol.

Los límites detectados, según ensayo colaborativo en el que han intervenido cinco laboratorios, oscila entre 0,7 por 100 (p/p) y 1 por 100 (p/p).

43.2. Material y aparatos.

43.2.1. Equipo de cromatografía en capa fina, compuesto de placas de gel de sílice G y un espesor de capa de 0,25 mm o de 0,40 mm en caso de ser necesaria una mayor resolución.

43.2.2. Placa calefactora adecuada para quemar placas que permita alcanzar temperaturas de 380° C.

43.2.3. Microjeringa de 10 µl.

43.3. Reactivos.

43.3.1. Hexano para cromatografía ( $d_{20°C} = 0,684$ ).

43.3.2. Eter etílico ( $d_{20°C} = 0,715$ ).

43.3.3. Líquido de desarrollo.

Mezclar 92 volúmenes de hexano y 8 volúmenes de éter etílico.

43.3.4. Acido sulfúrico al 50 por 100.

43.4. Procedimiento.

Depositar con una jeringa 2 a 3 µl de la disolución de la muestra en hexano al 10 por 100, aproximadamente, sobre la placa de cromatografía, a una distancia aproximada de 1 cm del borde inferior de la capa de sílice.

Introducir en la cubeta contenida el líquido de desarrollo hexano-éter etílico, esperando hasta que el frente del disolvente se sitúe a unos 3 cm, aproximadamente, del borde superior de la placa. Sacar la placa de la cubeta y dejar secar al aire, lo cual se consigue en unos minutos. Con el fin de facilitar el reconocimiento de los ésteres más difícilmente separables, es recomendable y necesario en algunos casos efectuar dos o tres desarrollos. Para ello, terminado el primer desarrollo y una vez seca la placa, volver a introducir en la cubeta, manteniéndola hasta que el frente del disolvente se haya situado a la misma altura anterior. Repetir el proceso una vez más si es necesario. En los casos de duda sobre el resultado positivo de la prueba, deberá repetirse la cromatografía, sometiendo la placa a dos o tres desarrollos.

Pulverizar la placa seca con una disolución de ácido sulfúrico al 50 por 100 y quemar sobre la placa calefactora a unos 300° C.

43.5. Interpretación de resultados.

A un tercio, aproximadamente, del borde inferior de la placa aparece una mancha intensa correspondiente a los triglicéridos. En aceites puros no aparece por encima ninguna otra mancha próxima a la de los triglicéridos, a excepción de algunos componentes del insaponificable que marchan con el frente del disolvente. Una mancha, más o menos intensa, situada por encima, próxima a la de los triglicéridos, acusa la presencia de ésteres extraños al glicerol. La distancia relativa entre estas dos manchas depende, lógicamente, del alcohol de que se trate; los ésteres de monoalcoholes, tales como el metílico o etílico, se sitúan más distanciados de como lo hacen los ésteres de dialcoholes, tales como el etilenglicol o propilenglicol.

43.6. Referencias.

1. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española 55.085.

44. TEMPERATURA DE INFLAMACION

44.1. Principio.

Inflamación momentánea de los vapores desprendidos de la materia grasa en ensayo, en contacto con el aire, operando en condiciones determinadas.

44.2. Material y aparatos.

44.2.1. Aparato de Pensky-Martens en taza cerrada (fig. 44.1) que consta de los elementos siguientes:

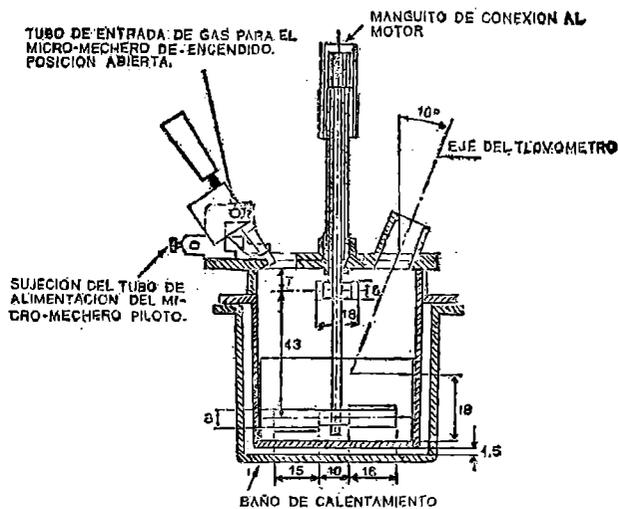


Fig. 44.1 (dimensiones en milímetros)

44.2.1.1. Taza cilíndrica de latón o bronce o aleación similar no oxidable y de conductividad térmica equivalente (figura 44.2). Deberá ir provista de una pestaña a todo su alrededor para su ejecución en el baño de calefacción, debiendo, además, fijarse en una posición determinada, impidiendo todo movimiento giratorio una vez situada dentro del baño. Llevará una marca circular alrededor de la pared interior, a una altura de 34 milímetros del fondo, indicando la cantidad que debe tomarse del aceite a ensayar. El volumen necesario para el ensayo, señalado por esta marca es de 70 ml. Llevará también un mango con el aislamiento conveniente, que permita el manejo cómodo de la taza para su colocación y retirada del bloque.

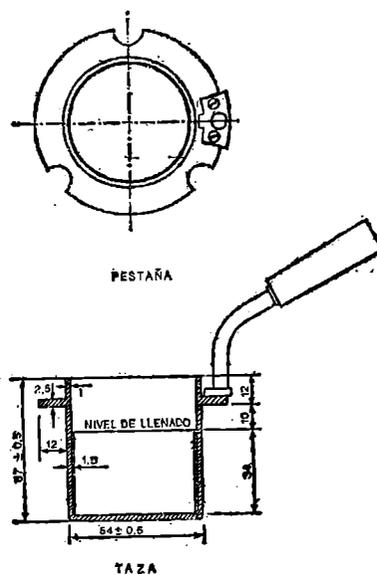


Fig. 44.2. (dimensiones en milímetros)

## 44.2.1.2. Tapa (fig. 44.3).

La taza irá provista de una tapa, la cual encajará en la parte superior, estando provista de cuatro orificios cuya situación y dimensiones son las indicadas en la figura.

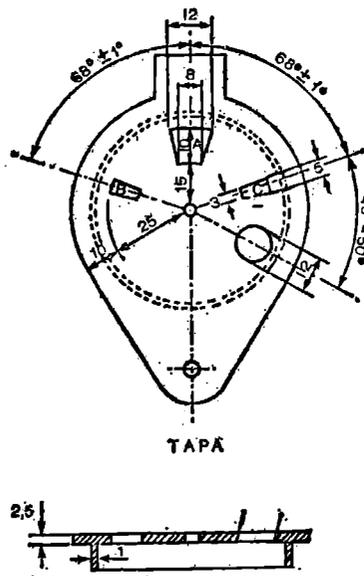


Fig. 44.3 (dimensiones en milímetros)

## 44.2.1.3. Obturador (fig. 44.4).

Encima de la tapa lleva una lámina que puede girar sobre el eje central del aparato, pudiendo efectuarse este giro accionando manualmente un mecanismo que permita el desplazamiento de la lámina entre dos posiciones extremas: Una, que puede denominarse posición de reposo, y otra, posición de encendido. El mecanismo irá provisto de un muelle que mantenga el obturador en posición de reposo, siendo necesario actuar en sentido contrario para pasarlo a la posición de encendido; de la presión manual, el obturador deberá recobrar automáticamente la posición inicial.

En la posición de reposo, las tres aberturas A, B y C de la tapa permanecen cerradas por el obturador; al girar la tapa, accionando el mecanismo aludido, y llevarla a la posición opuesta, se abrirán las tres aberturas, haciendo posible, al mismo tiempo, los movimientos que se indican en los dos apartados siguientes referentes al micromechero de encendido y a la agitación.

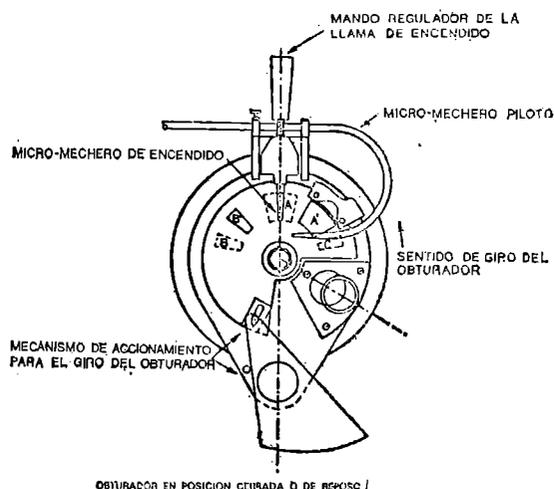


Fig. 44.4 (dimensiones en milímetros)

## 44.2.1.4. Micromechero de encendido (fig. 44.4).

Está constituido por un pequeño tubo, con un orificio de salida de 0,5 milímetros de diámetro, provisto de una válvula accionada por un tornillo que permite la regulación de la llama. Puede utilizarse gas ciudad o butano.

El micromechero va montado en un eje transversal, que permita un movimiento basculante, pudiendo introducirse la punta del mechero por el orificio A de la tapa (fig. 44.3) apoyándose en el borde. Situado en esta posición, quedarán introducidos dos milímetros de mechero y en una posición inclinada formando un ángulo de 40 grados con la vertical.

## 44.2.1.5. Micromechero piloto.

Es un mechero de características análogas al anterior, pero con un orificio de salida de 0,25 milímetros y sin válvula de regulación. Está situado en una posición horizontal, perpendicularmente al mechero de encendido, separado dos milímetros de la tapa móvil designado como obturador (fig. 44.4). El objeto de este micromechero es el mantener encendida una llama piloto que, al bascular el micromechero de encendido, e inmediatamente antes de penetrar en la abertura A, se enciende, penetrando ya encendido; al volver el mechero a su posición normal horizontal deberá apagarse nuevamente.

## 44.2.1.6. Agitador.

La tapa descrita anteriormente irá equipada con un agitador (fig. 44.1) montado en el centro de la tapa y constituido por dos láminas rectangulares de 15 mm de longitud y 8 mm de ancho, dispuestas formando entre sí un ángulo de 90°; la distancia entre los extremos de las láminas será de 40 mm y la distancia entre la cara interior de la tapa y el extremo inferior del agitador será de 50 mm. En la parte superior del eje y en la posición que se indica en el dibujo, llevará un segundo sistema de paletas, con un ancho de 8 mm y una distancia entre los extremos de las láminas de 18 mm. El eje con los sistemas de paleta irá conectado a un motor eléctrico, verificándose esta conexión mediante un cable flexible que pueda conectarse y desconectarse a voluntad.

El mando de accionamiento del agitador irá unido a un sistema mecánico adecuado para que al mismo tiempo de accionar el obturador, desconecte al motor del agitador y haga vascular el micromechero de encendido, para encender la llama e introducirla en la taza, tal como se ha explicado anteriormente; al dejar en libertad el mando de accionamiento del obturador, se establecerá la situación anterior, quedando apagado el micromechero en su posición normal, cerrada la taza y restablecido el funcionamiento del motor. El ciclo completo de estos movimientos deberá realizarse en un tiempo comprendido entre dos y tres segundos.

## 44.2.1.7. Baño de calentamiento.

Esta constituido por un cilindro metálico de aleación análoga a la de la taza, provisto de un sistema de calefacción en el que puede utilizarse una llama o calentamiento eléctrico, lo cual es preferible. En cualquier caso, el sistema utilizado dará lugar a un calentamiento uniforme de toda la superficie del baño, tanto en el fondo como en las paredes laterales, y la fuente de calefacción tendrá potencia suficiente para elevar la temperatura del baño de la forma que se especifica más adelante, pudiendo llevar el aceite contenido en la taza del ensayo a una temperatura de 350° C. El baño irá provisto, en su parte superior, de una placa con un orificio de 54,5 mm de diámetro, por el que se introducirá la taza conteniendo el aceite a ensayar, haciendo descansar sobre la placa la pestaña de que va provista la taza (fig. 44.2). La posición de la taza se fija exactamente en el centro del baño mediante unos tornillos que encajan en unas muescas situadas en la pestaña o utilizando cualquier otro dispositivo de fijación, quedando espacio libre entre la taza y el baño de calentamiento, de 4,5 mm, que debe mantenerse uniforme por toda la superficie (fondo y paredes laterales).

## 44.2.1.8. Termómetros.

Adaptables al aparato, con intervalos de 1° C y comprendiendo los límites entre los cuales se presume se han de situar las temperaturas a medir. Deberán haber sido debidamente contrastados, con una tolerancia en el error de escala de  $\pm 0,5$  grados centígrados.

44.2.2. Centrífuga de cabeza oscilante, con capacidad suficiente para centrifugar, en una sola operación, unos 100 ml de aceite.

## 44.3. Reactivos.

44.3.1. Sulfato cúprico anhidro, químicamente puro. Pulverizar en un mortero unos 50 g de  $\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}$ . El producto pulverizado se coloca en una cápsula que se mantiene en una estufa dos horas a 150° C.

## 44.4. Procedimiento.

## 44.4.1. Preparación de la muestra.

Tomar aproximadamente 100 g de muestra y adicionar un 5 por 100 de su peso de sulfato cúprico anhidro, agitar durante un minuto en una vasija cerrada y dejar reposar durante media hora. Centrifugar en tubo cerrado con tapón esmerilado a 2.800 r.p.m., debiendo quedar el aceite limpio (ver 44.6.1 y 44.6.2).

## 44.4.2. Ensayo preliminar.

En el caso general de tratarse de una muestra para la que se desconozca totalmente su comportamiento en el ensayo, será necesario efectuar previamente una o varias determinaciones preliminares que sirvan para conocer el valor aproximado del «punto de inflamación». Si se tratase de una muestra de naturaleza conocida para la que pueda preverse el orden aproximado de «la temperatura de inflamación», podría omitirse el ensayo preliminar, pudiendo cumplirse los requisitos exigidos en el ensayo definitivo.

## 44.4.3. Ensayo definitivo.

Llenar la taza del aparato con la grasa convenientemente preparada, cuidando que la base del menisco coincida con la línea marcada en el interior y evitando la formación de burbujas de aire. Colocar la tapa así preparada en el aparato, junto con los demás dispositivos y el termómetro de escala adecuada.

Encender la llama del micromechero piloto ajustando la entrada de gas de forma que la longitud de la llama sea de unos 4 mm; ajustar también la entrada de gas en el micromechero de encendido para que la llama, al efectuar el disparo, tenga una longitud de 5 a 8 mm.

Poner en marcha el dispositivo de calefacción y el agitador, regulado de forma que no sobrepase una temperatura que se sitúe de 5 a 10° por debajo de «la temperatura de inflamación prevista»; el agitador deberá girar a una velocidad de 60 a 120 revoluciones por minuto.

Alcanzada la temperatura previamente establecida, continuar la calefacción, regulada de forma que el aumento de temperatura sea de 0,5° C/min. Cuando falten unos 3° C para alcanzar la «temperatura de inflamación» se comienzan los ensayos. Para ello y a intervalos de un minuto se interrumpe la agitación y se acerca la llama a la superficie del aceite, abriendo el obturador que cierra la ventana de la taza y vasculando el micromechero hasta introducir la llama en el interior, debiéndose realizar esta operación en medio segundo. Dejar en esta posición un segundo, volviéndolo rápidamente a su posición primitiva, poniendo inmediatamente en marcha la agitación (ver 44.6.4).

Repetir esta operación a intervalos de un minuto, hasta que se observe una inflamación clara pero fugaz en los vapores que existen en el interior de la taza, y se extienden por toda la superficie del aceite. La temperatura a la que se produce este fenómeno es la que se toma como «temperatura de inflamación». Anotar la presión atmosférica a la que se ha realizado el ensayo (ver 44.6.5 y 44.6.6).

El número de aperturas del obturador hasta alcanzar la «temperatura de inflamación» no deberá ser nunca superior a cinco. Si fuera necesario rebasar esta cifra, repetir el ensayo tomando una nueva muestra de aceite.

Análogamente, si se consiguiese la inflamación en el primer intento, la temperatura registrada no se dará como aceptable, debiéndose repetir el ensayo con las correcciones oportunas.

La duración total del ensayo será aproximadamente de una hora y media.

## 44.5. Cálculos.

$$T_c = T_e - \frac{760 - p}{30}$$

Siendo:

$T_e$  = Valor leído como temperatura de inflamación.

$T_c$  = Valor corregido, expresado en grados centígrados, referido a la presión normal.

$p$  = presión atmosférica, expresada en mm de Hg, a la que se ha efectuado la medida.

La diferencia entre resultados sucesivos obtenidos por el mismo operador, con el mismo instrumental y con una misma muestra, no debe sobrepasar dos unidades. De no ser así, realizar un tercer ensayo o los que fueran necesarios hasta alcanzar la constancia debida.

## 44.6. Observaciones.

44.6.1. Si la grasa es sólida a la temperatura del laboratorio, fundir calentando a una temperatura que no exceda de 10° C a la temperatura de fusión. La determinación de la temperatura de inflamación se comenzará, en este caso, a la temperatura a la cual se haya realizado este proceso previo de fusión. Si fuese necesaria la desecación, se realizará, también, sobre la grasa licuada.

44.6.2. La deshidratación puede ser suprimida si la humedad de la muestra no es superior a 0,1 por 100. Si el contenido en agua fuese más elevado, la desecación es necesaria para eludir la posibilidad de que se forme una espuma excesiva, que podría apagar la llama al introducir el micromechero en la taza.

44.6.3. En los aparatos de funcionamiento automático, al reaccionar el mecanismo del obturador, se producen simultáneamente todos los movimientos descritos, debiéndose preocupar el operador únicamente de mantener el mecanismo en ten-

sión durante el tiempo establecido de un segundo, observando el proceso de inflamación y la temperatura.

44.6.4. El intervalo de un minuto entre cada dos ensayos de inflamación es el tiempo mínimo que se considera necesario para restablecer la concentración de saturación de los vapores del espacio libre de la taza, en equilibrio con el aceite en ensayo, equilibrio éste que se altera al efectuarse cada ensayo de inflamación.

44.6.5. El verdadero fenómeno de inflamación no debe confundirse con el halo azulado que se observa algunas veces rodeando la llama; esto indica que el fenómeno de inflamación está próximo, pero no debe confundirse con la verdadera inflamación del aceite.

Si al introducir la llama de encendido por la abertura de la placa se produce una inflamación permanente de los gases combustibles distinta al destello que se ha descrito anteriormente, este hecho pone en evidencia que el aceite se encuentra a una temperatura superior a su punto de inflamación, debiendo repetirse la experiencia partiendo de una nueva muestra.

## 44.7. Referencias.

1. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española. 55.103.

## 45. RECONOCIMIENTO DE ANTIOXIDANTES

## 45.1. Principio.

Los antioxidantes son extraídos por el acetonitrilo de una solución de la muestra en hexano y posterior fraccionamiento e identificación.

Aplicable a materias grasas destinadas directamente a la alimentación humana. No aplicable a grasas brutas o a aquellas otras que introduzcan impurezas en el extracto que dificulten el fraccionamiento cromatográfico y el reconocimiento de antioxidantes.

Los antioxidantes identificados por este método son: Acido nordihidroguayarático (NDHG), galato de propilo (GP), galato de octilo (GO), galato de dodecilo (GD), butilhidroxianisól (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT).

## 45.2. Material y aparatos.

45.2.1. Equipo de cromatografía en capa fina, con placas de gel de sílice G de tamaño conveniente, según el número de muestras que se deseen examinar en una sola operación y un espesor de capa de 0,25 milímetros. Ver 45.6.1.

45.2.2. Evaporador rotatorio.

45.2.3. Matraz de fondo redondo de 250 ml, utilizable con el evaporador rotatorio.

45.2.4. Estufa de desecación con calefacción eléctrica y regulación de temperatura, con un error de  $\pm 2^\circ\text{C}$  en todo el ámbito interior de la estufa.

45.2.5. Ampollas de extracción con capacidad de 250 ml.

45.2.6. Matraces cónicos de 250 ml y 1.000 ml con tapón esmerilado y con normalizado 29/32.

45.2.7. Matraces aforados de 100 ml con tapón esmerilado y con normalizado 14/23.

45.2.8. Vaso de 150 ml.

45.2.9. Jeringa de 20  $\mu\text{l}$ , graduada en  $\mu$ .

## 45.3. Reactivos.

45.3.1. Gel de sílice G, de calidad adecuada para cromatografía en capa fina y en especial para el fraccionamiento de los productos que se trata de separar, lo que se comprueba con los patrones correspondientes.

45.3.2. Metanol con un contenido de agua que no sobrepase el 0,5 por 100 (v/v).

45.3.3. Etanol con una riqueza de 96/97 por 100 (v/v).

45.3.4. Hexano normal para cromatografía ( $d_{20} = 0,584$ ).

45.3.5. Acetonitrilo.

45.3.6. Acetato de etilo.

45.3.7. Benceno.

45.3.8. Cloroformo.

45.3.9. Acido acético cristalizabile.

45.3.10. Acetonitrilo saturado de hexano.—En un matraz cónico de 100 ml introducir 900 ml de acetonitrilo. Agregar 100 ml de hexano y un poco de sulfato sódico seco. Agitar, cerrar el matraz con el tapón y dejar en reposo unas doce horas. En el momento del uso, sacar la cantidad necesaria de acetonitrilo.

45.3.11. Hexano saturado de acetonitrilo.—Proceder como se indica anteriormente, invirtiendo las cantidades de los dos disolventes. Conservar en el matraz hasta su utilización.

45.3.12. Líquido de desarrollo.—Inmediatamente antes de su utilización preparar una mezcla de hexano, benceno y ácido acético en las proporciones 40:40:20 (v/v/v).

45.3.13. Revelador.—Solución al 1 por 100 en etanol (m/v) de dicloro-2-5-quinona clorimida.

45.3.14. Soluciones patrón.—Disolver al 0,1 por 100 (m/v) en etanol los antioxidantes cuya identificación se quiera realizar en la grasa. Estos productos deberán ser puros, comportándose en la cromatografía como una sola especie química;

si apareciesen impurezas, éstas no deberán perturbar la marcha del proceso ni el reconocimiento de los otros antioxidantes.

#### 45.4. Procedimiento.

##### 45.4.1. Extracción de los antioxidantes.

Pesar de 7,5 a 10 ml de la muestra de aceite o grasa e introducirla en un vaso de 150 ml. Disolver con 100 ml de hexano, pudiéndose calentar suavemente en caso de necesidad para acelerar el proceso de disolución. Pasar la solución a una ampolla de extracción de 250 ml. Lavar el vaso con 25 ml de hexano, agregando este líquido a la ampolla de extracción. No debe quedar ninguna partícula insoluble en la solución. Añadir 25 ml de acetonitrilo saturado de hexano y agitar durante un minuto. Sacar la fase inferior de acetonitrilo, pasándola a una segunda ampolla de 250 ml. Si se forma una emulsión, calentar suavemente la ampolla haciendo caer sobre ella, desde un frasco lavador, un chorro de agua a unos 50° C, haciéndola girar al mismo tiempo muy lentamente. Prolongar la operación hasta lograr la separación en dos fases limpias.

Repetir otras tres veces consecutivas la extracción con el acetonitrilo saturado de hexano, empleando 25 ml en cada extracción acumulando los extractos en la misma ampolla.

Los extractos reunidos de acetonitrilo se lavan dos veces con hexano saturado de acetonitrilo, empleando 25 ml en cada lavado.

Pasar el extracto en acetonitrilo, una vez lavado, a un matraz de fondo redondo de 250 ml. Evaporar el disolvente en evaporador rotatorio, con vacío, calentar muy cuidadosamente y evitando que la temperatura del baño de agua no sobrepase, en ningún momento, los 40° C.

Una vez evaporado el disolvente, disolver el residuo en 2 ml de metanol, pasando la disolución a un frasquito de capacidad adecuada para su conservación y utilización en la cromatografía.

Si el residuo obtenido en la concentración no se disuelve totalmente en el metanol, filtrar la solución.

Para contenidos pequeños de antioxidantes, por ejemplo, de un orden inferior a 0,1 por 1.000, debe emplearse menos disolvente.

##### 45.4.2. Cromatografía en capa fina.

Depositar 10 µl de la disolución en metanol de los antioxidantes en una placa de dimensiones adecuadas, previamente activada en las condiciones recomendadas para cada caso, y en el centro de una línea situada a unos 2 cm del extremo inferior de la placa.

Depositar 4 µl de cada uno de los patrones con que se desee operar, a la derecha y a la izquierda de la mancha problema, distantes entre sí 10-15 mm.

Introducir la placa en la cubeta de desarrollo, cuidando que las manchas depositadas queden por encima del nivel del líquido en la cubeta.

Dejar la cubeta preferiblemente en la oscuridad o en una estancia débilmente iluminada, prolongando el desarrollo hasta que el frente del disolvente se sitúe a unos 15 cm de la línea de partida de los antioxidantes. Sacar la placa dejándola secar al aire.

Pulverizar la placa con el revelador, introduciéndola después en una estufa de aire regulada a 100° C ( $\pm 2^\circ$  C), donde permanecerá diez a quince minutos.

Sacar la placa de la estufa y observar las manchas del problema, comparándolas con las de los patrones.

#### 45.5. Interpretación de resultados.

El orden de colocación de los antioxidantes, en orden de menor a mayor desplazamiento, es el siguiente: NDHG, GP, GO, BHA, BHT (ver 45.6.2 y 45.6.3).

#### 45.6. Observaciones.

45.6.1. En determinados casos, para conseguir una separación efectiva de antioxidantes, con valores de Rf muy próximos, como por ejemplo el NDHG y GP, es aconsejable operar con espesores de gel de sílice de 0,40 mm en lugar de 0,25 mm, que es el más frecuente y con el que se consiguen normalmente resultados satisfactorios.

45.6.2. Se puede intensificar la coloración de las manchas, facilitando su reconocimiento y la sensibilidad del método, mediante reacción con el amoníaco.

Para ello, la placa, una vez revelada y seca, se introduce en una cubeta saturada de vapores de amoníaco, manteniéndola allí hasta observar una intensificación del color de las manchas. Se adquieren coloraciones características en algunos casos.

Debe cuidarse no prolongar demasiado el contacto con el amoníaco, en evitación de que se colorea el fondo de la placa, lo cual, en vez de beneficiar, podría dificultar el reconocimiento de los antioxidantes.

45.6.3. A título de orientación, se dan a continuación los valores Rf obtenidos con los seis antioxidantes citados anteriormente:

Antioxidantes	NDHG	GP	GO	GD	BHA	BHT
Rf	0,10	0,14	0,28	0,35	0,75	0,98

45.6.4. La aparición de una mancha de BHT muy débil, en comparación con el patrón, puede ser debido a una pérdida del producto en el lavado con hexano saturado de acetonitrilo. En este caso, proceder como sigue: Realizar la extracción tal y como dice el método. Recoger por separados los líquidos procedentes de la extracción con acetonitrilo saturado de hexano y los que proceden del lavado con hexano saturado de acetonitrilo. Evaporar los disolventes. Disolver ambos residuos con metanol (2 ml). Sobre la placa depositar unos 10 µl del extracto procedente de la extracción con acetonitrilo y 15 µl del que procede de los lavados con hexano. De esta forma, el BHT se detecta en ambos desarrollos, pudiéndose considerar la cantidad presente en la muestra por comparación con el patrón como «suma» de las intensidades de ambas manchas.

#### 45.7. Referencias.

1. Instituto de Racionalización del Trabajo. Una Norma Española. 53.017.

### 46. ACIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

#### 46.1. Principio.

Obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante reacción con una solución de hidróxido potásico en metanol y subsiguiente inyección directamente de la disolución de ésteres metílicos en el cromatograma.

El método es aplicable a las grasas de mantequillas u otras que contengan ácidos grasos de longitud de cadena inferior al C<sub>14</sub> y siempre que el contenido de ácidos libres no exceda del 1 por 100 expresados en ácido oleico.

#### 46.2. Material y aparatos.

46.2.1. Matraces con boca esmerilada y fondo redondo de 50 y 100 ml de capacidad.

46.2.2. Pipetas aforadas de 1 ml, 2 ml y 10 ml.

46.2.3. Matraces aforados de 50 y 100 ml de capacidad.

46.2.4. Probeta graduada de 10 ml.

46.2.5. Jeringa de características adecuadas para la inyección de la muestra, graduada en décimas de ml, con una capacidad total de 1 a 10 ml.

46.2.6. Cromatógrafo apto para trabajar en fase gaseosa, provisto de horno capaz de ser calentado hasta 250°-300° C y sistema de regulación que permita controlar la temperatura con un error de  $\pm 1,0^\circ$  C. Equipado con programador de temperatura capaz de llevar la temperatura del horno de 60° C a una velocidad de 4° C/min. Provisto de regulación independiente de la temperatura del inyector, que podrá ser calentado a una temperatura superior, por lo menos, en 50° a la máxima alcanzable por el horno provisto de un sistema de detección sensible, de ionización de llama de hidrógeno, que pueda ser mantenido a la temperatura de la columna, a unos 50° C por encima de la del horno.

46.2.7. Registrador con una tensión de entrada adecuada a la salida del amplificador del cromatógrafo, con una velocidad de respuesta mínima capaz de producir la deflexión completa de la escala en un segundo y una velocidad de desplazamiento del papel de 5 mm/min, que permita la posibilidad de variar esta velocidad acelerando o retardando el desplazamiento.

46.2.8. Tubo de nitrógeno a presión utilizable como gas portador, debiendo tener una riqueza mínima del 99,8 por 100.

46.2.9. Tubos de hidrógeno y aire a presión necesarios para el caso en que se utilice detector de llama de hidrógeno. El hidrógeno deberá tener una riqueza mínima del 99,8 por 100, debiendo estar seco. Como medida de seguridad, es muy conveniente colocar a la entrada de los gases en el cromatógrafo sendos tubos de desecación provistos de criba molecular 13X.

#### 46.2.10. Columna cromatográfica.

46.2.10.1. Columna que satisfaga las condiciones determinadas en 41.4.2 de los Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas.

46.2.10.2. Columna de vidrio con diámetro interior de 4 mm y una longitud aproximada de 2 mm. Rellenada con Chromosorb G, W o Q (80-100 mallas), conteniendo de 2,5 a 5 por 100 de un poliéster, siendo recomendable cualquiera de los tres siguientes: dietilenglicolsuccinato (DEGS), etilenglicolsuccinato o adipato (EGS o EGA), polietilenglicoladipato (PEGA).

Antes de emplear una columna nueva en la resolución de problemas analíticos, debe ser acondicionada eliminando todos aquellos productos volátiles que perturbarían la marcha de la cromatografía. Para ello, se monta en el cromatógrafo, sin conectarla al detector, y se calienta el horno a unos 10° por encima de la temperatura máxima a que vaya a ser utilizada la columna en trabajos posteriores; haciendo pasar, al mismo tiempo,

una corriente de nitrógeno de 30 a 40 ml/min; que se mantiene durante veinticuatro horas, como mínimo. La columna será apta para su utilización si, una vez conectada al detector y en funcionamiento normal, la línea base dibujada por el registrador acusa la estabilidad del sistema.

#### 46.3. Reactivos.

- 46.3.1. Metanol absoluto (99,8 por 100).  
 46.3.2. Hidróxido potásico, en lentejas.  
 46.3.3. Éter de petróleo o hexano.—Éter de petróleo (p. e. 40°-60° C), cuyo contenido en benceno no sea superior a 0,1 por 100, hexano normal, que cumpla las mismas especificaciones del éter de petróleo.  
 46.3.4. Heptano normal, con una riqueza mínima en heptano normal, determinado por cromatografía gaseosa, del 99 por 100.  
 46.3.5. Disolución 2 N de hidróxido potásico en metanol.—Disolver 11,2 g de hidróxido potásico en 100 ml de metanol.  
 46.3.6. Esteres metílicos de pureza adecuada para su utilización como patrones en cromatografía gaseosa.—Se dispondrá de los ésteres metílicos de los ácidos mencionados a continuación, debiendo tener una pureza mínima de 99 por 100, determinada por cromatografía gaseosa:

Ácido butanoico (butírico).  
 Ácido pentanoico (valeriánico).  
 Ácido hexanoico (caproico).  
 Ácido octanoico (caprílico).  
 Ácido decanoico (cáprico).  
 Ácido dodecanoico (láurico).  
 Ácido tetradecanoico (mirístico).  
 Ácido hexadecanoico (palmitico).  
 Ácido octadecanoico (esteárico).  
 Ácido 9-octadecanoico (oleico).  
 Ácido 9,12 octadecadienoico (linoleico).  
 Ácido eicosanoico (aráquico).

46.3.7. Solución de referencia I.—En un matraz aforado de 50 ml, se pesa, con exactitud de  $\pm 0,1$  mg, 1 g de pentanoato de metilo, disolviéndolo en heptano normal y completando hasta el enrase.

46.3.8. Solución de referencia II.—En un matraz aforado de 100 ml se pesa, con exactitud de  $\pm 0,1$  mg, 200 mg de pentanoato de metilo, disolviéndolo en heptano normal y completando hasta el enrase.

#### 46.4. Procedimiento.

##### 46.4.1. Preparación de los ésteres metílicos.

En un matraz de fondo redondo de 50 ml, pesar, con exactitud de  $\pm 0,1$  mg, 1 g de grasa. Añadir 10 ml de éter de petróleo o hexano y agitar suavemente hasta disolución de la grasa.

En el caso de que se quiera efectuar una determinación cuantitativa de los ácidos butírico y caproico en la muestra, agregar a la disolución en éter de petróleo de la grasa 1 ml, exactamente medido, de la solución de referencia más adecuada; para muestras conteniendo de 1-4 por 100 de ácido butírico se utilizará la solución de referencia I; para muestras conteniendo menos de 1 por 100 de ácido butírico, se utilizará la solución de referencia II.

Si se desea efectuar solamente un análisis completo de la fracción de ácidos grasos, para lo que se aplica el método de normalización interna, no será necesario el empleo de solución de referencia.

A la solución en éter de petróleo de la muestra, adicionada o no de solución de referencia, agregar 0,5 ml de disolución 2 N de hidróxido potásico. Agitar suavemente la mezcla hasta que se ponga transparente, para lo cual son suficientes unos veinte a treinta segundos. Casi inmediatamente después de observar la clarificación de la solución, suele apreciarse un enturbiamiento debido a la separación de glicerol, que se sedimenta rápidamente.

Inmediatamente después de terminada la reacción y observada la sedimentación, tomar la cantidad necesaria con la jeringa e inyectar en el cromatógrafo, una demora en la inyección de los ésteres metílicos daría lugar a la formación de jabones, con error en la determinación.

##### 46.4.2. Determinación cromatográfica.

###### 46.4.2.1. Condiciones de trabajo.

Temperatura de la columna: Temperatura programada de 60° C a 180° C, con una velocidad de 4° C/min.

Temperatura del inyector: 200° C.

Temperatura del detector: 200° C.

Gas portador: Nitrógeno (o helio), con un flujo de 80 ml/min.

Flujo de hidrógeno y aire para la alimentación del detector: Los flujos dependerán del tipo de detector utilizado, debiendo determinarse previamente para optimizar la respuesta.

El registro obtenido del cromatograma debe satisfacer las condiciones que se indican a continuación; caso contrario, se repite la inyección modificando la cantidad inyectada o la sensibilidad de trabajo hasta obtener un cromatograma satisfactorio.

Los requisitos exigibles son los siguientes:

a) El área total descrita en el registro, referida a la sensibilidad máxima utilizada en el curso de la operación, debe ser de un orden aproximado de 2.000 mm<sup>2</sup>, con una velocidad del papel en el registrador de 5 mm/min. De esta forma, los componentes presentes en una cuantía del 0,1 por 100 deben dar un pico, como mínimo, de 2 mm<sup>2</sup>, siendo, por tanto, perfectamente reconocibles.

b) Con el fin de conseguir que todos los picos caigan dentro del papel registrador, se utilizará, en cada caso, la atenuación de sensibilidad que sea necesaria, cuidando que el pico de mayor intensidad no sea atenuado más de ocho veces.

Una vez conseguido un registro satisfactorio, y habiendo alcanzado nuevamente la pluma la línea base, se interrumpe el funcionamiento del registrador y se retira el papel con el registro para la identificación de los picos y/o cálculos cuantitativos.

46.4.2.2. Identificación de los picos.—Se seguirán los criterios establecidos en el método número 41 de los Métodos Oficiales de Análisis de Aceites y Grasas.

46.4.2.3. Determinaciones cuantitativas.—La determinación cuantitativa se basa en el principio de que los pesos de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de los triángulos dibujados debajo de cada pico. El área de cada triángulo se obtiene trazando rectas tangentes a las líneas dibujadas en el registro, prolongándolas hasta su intersección con la línea base y multiplicando la altura del triángulo por la mitad de la base. En el caso de haber trabajado con atenuaciones diferentes para cada pico, se referirán todas las medidas a una misma sensibilidad del registrador, multiplicando la altura por el factor de atenuación correspondiente en cada caso, y el valor de la altura así corregida por la mitad de la base.

46.4.3. Determinación del contenido de los ácidos butírico y caproico en la materia grasa.—Esta determinación se realiza por el método del patrón interno, siendo el patrón elegido el pentanoato de metilo.

46.4.3.1. Preparación de la mezcla de calibración.—Con una exactitud de  $\pm 0,1$  mg y en un matraz aforado de 50 ml, pesar unos 100 mg de cada uno de los siguientes patrones: butanoato de metilo, pentanoato de metilo y caproato de metilo. Se disuelve la mezcla de heptano normal, y se diluye completando hasta el enrase.

Inyectar la cantidad necesaria de la solución anterior, normalmente 0,2-0,4  $\mu$ l, para que, trabajando a la sensibilidad media del aparato, se consiga situar los máximos de los picos en una posición del 70-80 por 100 del recorrido total de la pluma del registrador. Los tres picos deberán registrarse a la misma sensibilidad. Si fuese necesario, se diluirá la solución anterior con heptano normal en la relación necesaria para poder ajustarse a las prescripciones fijadas. Efectuar, cuando menos, tres determinaciones consecutivas, que no deben discrepar entre sí más del 1 por 100.

46.4.4. Análisis cuantitativo de la totalidad de los componentes de la fracción de ácidos grasos, comprendiendo del C<sub>4</sub> al C<sub>20</sub> y C<sub>18:3</sub>.

46.4.4.1. Preparación de la mezcla de calibración.—Determinar previamente el factor de corrección para cada ácido componente de la mezcla, referido a uno cualquiera de ellos, que se toma como patrón, eligiéndose normalmente para este fin el ácido palmítico, y debiendo tener la mezcla de calibración una composición análoga a la de la mezcla problema.

Para ello, si no se conoce previamente el orden de composición del problema, se realizará una determinación cromatográfica de orientación, realizándose en el registro la cuantificación de los componentes suponiendo el mismo factor de respuesta para todos ellos, efectuando un reparto proporcional entre las áreas medidas.

En un matraz aforado de 50 ml, pesar, con una exactitud de  $\pm 0,1$  mg, cantidades de los ésteres metílicos patrones que se indican a continuación proporcionales a las cifras de composición encontradas en el análisis de orientación anteriormente aludido, o previstas con anterioridad para la muestra. Los patrones que deben pesarse son los siguientes: butanoato de metilo, hexanoato de metilo, octanoato de metilo, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, oleato de metilo, linoleato de metilo y eicosanoato de metilo. Se disuelve la mezcla de heptano normal, agregando la cantidad adecuada de disolvente en relación al peso total de ésteres metílicos que se hayan pesado; para unos 500 mg en total, se deben emplear, como orientación, unos 50 ml de heptano. A continuación inyectar 0,2-0,4  $\mu$ l, para que, trabajando a la sensibilidad media del aparato, se consiga situar el máximo del pico correspondiente al componente mayoritario, en una posición del 70-80 por 100 del recorrido total de la pluma del registrador. Todos los picos deben registrarse a la misma sensibilidad, lo cual suele ser perfectamente factible en la grasa de leche; en aquellos casos en que la relación entre el pico mayoritario y el pico minoritario no permita registrar este último con las dimensiones adecuadas para efectuar una cuantificación correcta de su área, se podrá efectuar el cambio necesario en la atenuación del registro, procurando que ésta no sobrepase la relación de 4:1. Si fuese necesario, se diluirá la solución

con heptano normal en la relación necesaria para poder ajustarse a las prescripciones finadas. Efectuar, cuando menos, tres determinaciones consecutivas, que no deben discrepar entre sí más del 1 por 100.

#### 46.5. Cálculos.

46.5.1. Cálculo de los factores de corrección para los ácidos butírico y caproico.—Se determinan las áreas de los tres picos, siguiendo las normas que se contienen en el apartado 6.4, y se calculan los dos factores correspondientes al C<sub>4</sub> y C<sub>6</sub> con la fórmula siguiente:

$$f_x = \frac{x \cdot A_p}{P' \cdot A_x}$$

Siendo:

- f<sub>x</sub> = factor de corrección del ácido.
- x = cantidad pesada del ácido.
- A<sub>p</sub> = área medida en el registro para el patrón de pentanoato.
- A<sub>x</sub> = área medida en el registro para el ácido x.
- P' = peso del patrón pentanoato.

46.5.2. Cálculo del contenido de ácidos.—Los contenidos de ácido butírico y ácido caproico en la muestra de grasa se calculan por la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje del ácido} = \frac{f_x \cdot A_x \cdot P}{A_p \cdot M} \cdot 100$$

Siendo:

- f<sub>x</sub> = factor de corrección determinado para cada ácido, según se indica en el párrafo anterior.
- A<sub>x</sub> = área medida en el registro para el ácido.
- P = peso del patrón interno (pentanoato).
- A<sub>p</sub> = área medida en el registro para el patrón interno.
- M = peso de la muestra de grasa.

46.5.3. Cálculo de los factores de corrección.—Una vez determinadas las áreas de todos los picos, siguiendo las normas que se contienen en el apartado 46.4.2.2, se calcula el factor de cada ácido, referido al ácido palmítico tomado como unidad, utilizando la fórmula que se incluye en el apartado 46.5.1, sustituyendo el área A<sub>p</sub> y el peso P del compuesto patrón por los valores correspondientes al palmitato de metilo.

46.5.4. Cálculo de composición de la fracción de ácidos grasos.—Se calcularán las áreas corregidas de cada uno de los componentes de la fracción multiplicando el área medida en el registro por el factor de corrección determinado según se indica en el apartado anterior. El contenido de cada componente vendrá dado por la expresión:

$$\text{Porcentaje } x = \frac{f_x \cdot A_x}{\sum (f_x \cdot A_x)} \cdot 100$$

Siendo:

- f<sub>x</sub> = factor de corrección del componente x.
- A<sub>x</sub> = área medida en el registro para el componente x.
- ∑ (f<sub>x</sub> · A<sub>x</sub>) = suma de todas las áreas corregidas correspondientes a los componentes de la fracción.

#### 46.6. Referencias

1. Instituto Nacional de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española. 55.118.

### 47. FOSFORO

#### 47.1. Principio.

Incineración de la muestra en presencia de óxido de cinc, seguida de la medida colorimétrica del fósforo como azul de molibdeno.

Aplicable a aceites vegetales brutos, desgomados y refinados.

#### 47.2. Material y aparatos.

- 47.2.1. Crisoles de porcelana de 50 ml de capacidad.
- 47.2.2. Vidrios de reloj.
- 47.2.3. Placa de calefacción eléctrica, con regulador de temperatura.
- 47.2.4. Horno de mufla.
- 47.2.5. Embudo de vidrio de vástago corto de 50 mm de diámetro.
- 47.2.6. Papel de filtro de 90 mm de diámetro, Albet 242 o similar.
- 47.2.7. Frasco lavador de un litro de capacidad con cuello protegido del calor.
- 47.2.8. Matraces aforados de 50, 100, 250 y 500 ml de capacidad provistos de tapones de vidrio.
- 47.2.9. Pipetas de 2, 5, 10 y 25 ml de capacidad.

47.2.10. Pipetas de 10 ml de capacidad, divididas en décimas de mililitro.

47.2.11. Espectrofotómetro para medición en el visible.

47.2.12. Cubetas espectrofotométricas de 10 mm de paso.

#### 47.3. Reactivos.

- 47.3.1. Ácido clorhídrico (d = 1,19).
- 47.3.2. Óxido de cinc.
- 47.3.3. Hidróxido potásico.
- 47.3.4. Ácido sulfúrico (d = 1,84).
- 47.3.5. Molibdato sódico.
- 47.3.6. Sulfato de hidracina.
- 47.3.7. Fosfato ácido monopotásico, desecado a 103 ± 2° C durante dos horas antes de usarlo.
- 47.3.8. Disolución de molibdato sódico.—Añadir con precaución 140 ml de ácido sulfúrico a 300 ml de agua destilada. Dejar enfriar la temperatura ambiente, añadir 12,5 g de molibdato sódico y disolver totalmente. Llevar a un matraz aforado de 500 ml, diluir con agua destilada hasta el enrase, homogeneizar y dejar reposar durante veinticuatro horas, por lo menos, antes de usarla.
- 47.3.9. Disolución de sulfato de hidracina al 0,015 por 100.—Disolver en un matraz aforado 0,15 g de sulfato de hidracina en un litro de agua destilada.
- 47.3.10. Disolución de hidróxido potásico al 50 por 100 (m/ml). Disolver 50 g de hidróxido potásico en 50 ml de agua destilada.
- 47.3.11. Disolución de fosfato ácido monopotásico.—Disolver 1,0967 g de fosfato monopotásico seco en agua destilada. Diluir a 250 ml en un matraz aforado y agitar. Esta disolución contiene 1 mg de fósforo por mililitro. A continuación verter, con una pipeta, 5 ml de la disolución anterior en un matraz aforado de 500 ml y enrasar con agua destilada. Esta disolución contiene 0,01 mg de fósforo por mililitro.

#### 47.4. Procedimiento.

47.4.1. Construcción de la curva patrón.—Tomar, mediante pipeta, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ml de la disolución 47.3.11, e introducir en matraces aforados de 50 ml. Completar el volumen a 10 ml con agua destilada, utilizando la pipeta 47.2.10, continuando como se describe en 47.4.3 a partir de la adición de sulfato de hidracina. Las alícuotas tomadas de la disolución contienen 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,09 y 0,10 mg de fósforo. A continuación representar gráficamente los valores de absorbancia frente a los contenidos en fósforo, expresado en mg.

47.4.2. Preparación de la muestra.—Pesar, con precisión de 1 mg, de 3 a 3,2 g de muestra en un crisol de porcelana y añadir 0,5 g de óxido de cinc. Calentar lentamente en la placa eléctrica hasta que la muestra se espese y entonces aumentar gradualmente la calefacción hasta que la masa esté completamente carbonizada. Colocar el crisol en el horno de mufla a una temperatura de 550-600° C, manteniéndolo durante dos horas. Una vez transcurrido ese tiempo, dejar enfriar a la temperatura ambiente.

Añadir a las cenizas 5 ml de agua destilada y 5 ml de ácido clorhídrico. Cubrir el crisol con un vidrio de reloj y calentar suavemente a ebullición durante cinco minutos. Filtrar la disolución recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Lavar la parte inferior del vidrio de reloj y las paredes del crisol con 5 ml de agua destilada caliente, usando un frasco lavador con chorro de agua finísimo. Lavar el crisol y el papel de filtro con cuatro porciones de 5 ml de agua destilada caliente. Enfriar la disolución a temperatura ambiente y neutralizar hasta débil turbidez, adicionando unas gotas de potasa al 50 por 100. Añadir ácido clorhídrico gota a gota hasta que el precipitado de óxido de cinc se disuelva y entonces añadir dos gotas más. Diluir hasta 100 ml con agua destilada y agitar.

#### 47.4.3. Determinación.

Pasar, mediante pipeta, 10 ml de esta disolución a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 8 ml de la disolución de sulfato de hidracina y a continuación 2 ml de la disolución de molibdato sódico. Tapar e invertir el matraz aforado dos o tres veces, quitar el tapón y calentar durante 10 ± 0,5 minutos en baño de agua hirviendo. Transcurrido este tiempo retirar del baño, enfriar a 25 ± 5° C en baño de agua, diluir hasta el enrase con agua destilada y mezclar perfectamente. Llenar una cubeta del espectrofotómetro y medir la absorbancia a 650 nm utilizando como referencia agua destilada.

Realizar un ensayo en blanco como se ha descrito, pero sin añadir aceite.

#### 47.5. Cálculos.

Calcular el contenido en fósforo, expresado en tanto por ciento, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje fósforo} = \frac{10 (M - B)}{PV}$$

Siendo:

- M = contenido en fósforo, en mg, de la alícuota.
- B = contenido en fósforo, en mg, del ensayo en blanco.
- P = peso, en g, de la muestra.

V = volumen, en ml, tomados en 47.4.3.  
 % en fosfátidos = % fósforo × F, donde F = factor de conversión de fósforo en fosfátidos (ver 47.6.2).

47.6. Observaciones.

47.6.1. No debe demorarse la lectura espectrofotométrica una vez conseguido el desarrollo del color.

47.6.2. En el caso del aceite de soja el valor de V es prácticamente igual a 30.

47.7. Referencias.

1. Instituto Nacional de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española. 55.108-73.

48. GRASA NEUTRA

48.1. Principio.

Retención de los ácidos grasos libres y sustancias no grasas por cromatografía en columna de alúmina. Los productos no retenidos en la columna se pesan, obteniéndose por diferencia a 100 los ácidos grasos libres e impurezas retenidas en la columna.

No es aplicable con carácter general a los aceites de orujos.

48.2. Material y aparatos.

48.2.1. Equipo para cromatografía en columna, compuesto de:

48.2.1.1. Columna de vidrio, provista de una placa de vidrio porosa número 2, correspondiente a un diámetro medio de poro de 40 a 90 μ (fig. 48.1).

48.2.1.2. Depósito de disolvente para la alimentación de la columna (fig. 48.2).

48.2.1.3. Soporte para el manejo del frasco de pesada (figura 48.3).

48.2.1.4. Frasco de pesada de unos 20 ml de capacidad (figura 48.4).

48.2.1.5. Tubo de prolongación para el vaciado del frasco de pesada en la columna (fig. 48.5).

48.2.1.6. Matraz redondo, fondo plano, de vidrio Pyrex o similar, de 250 ml de capacidad y boca esmerilada normalizada 29/32.

48.2.2. Ampolla de decantación de 125 ml de capacidad, con llave de vidrio.

48.2.3. Frasco lavador de unos 125 ml de capacidad.

48.2.4. Estufa de vacío que permita calentar hasta 110° C como mínimo y regulación de ± 1° C. La temperatura será además uniforme en todo el espacio interior, tolerándose diferencias que no superen 1° C entre posiciones extremas.

48.2.5. Horno de mufla capaz de alcanzar una temperatura de 800° C y regulación de ± 5° C.

48.2.6. Desecador conteniendo un agente desecante apropiado.

48.2.7. Evaporador rotatorio.

48.2.8. Cápsulas de porcelana, fondo redondo de 50 mm Ø y 20 mm de altura.

48.2.9. Pesa sustancias de vidrio, de 60 mm Ø interior y 40 de altura.

48.2.10. Tubo de cromatografía, de 10 cm de longitud y 1,5 centímetros de diámetro interior, provisto de llave esmerilada, con orificio de paso de 1,5 a 2 mm y placa filtrante de vidrio porosidad número 2, correspondiente a un tamaño medio de poro de 40 a 90 μ.

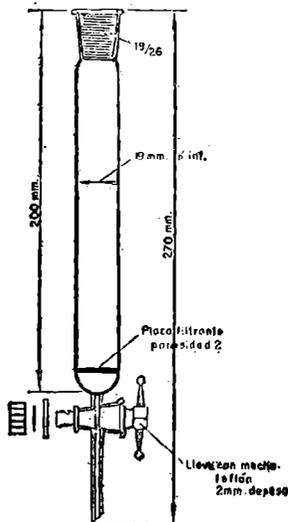


Fig. 48.1.—Columna

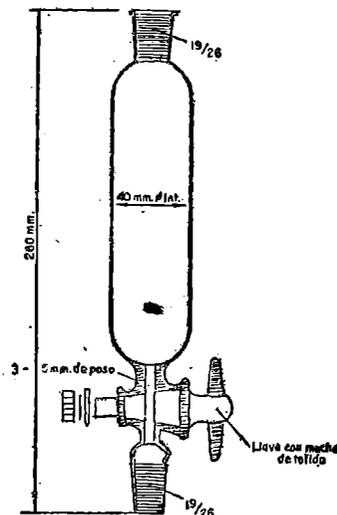


Fig. 48.2.—Depósito de disolvente



Fig. 48.3.—Soporte

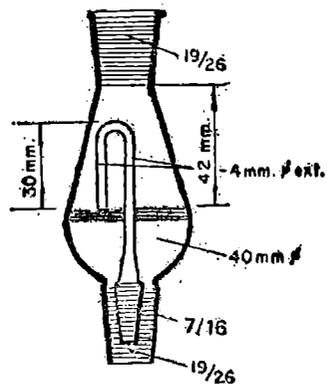


Fig. 48.4.—Frasco de pesada  
 Capacidad útil = 20 ml

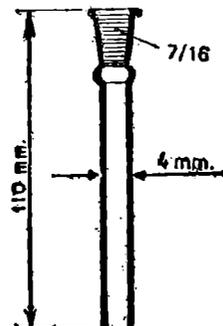


Fig. 48.5.—Tubo de prolongación

## 48.3. Reactivos.

48.3.1. Eter etílico.

48.3.2. Metanol anhidro.

48.3.3. Eter etílico-metanol.—Mezclar 975 ml de 48.3.1 y 25 ml de 48.3.2.

48.3.4. Hexano, con un contenido máximo de 0,5 por 100 de aromáticos.

48.3.5. Alúmina para cromatografía en columna de las siguientes características: pH en suspensión acuosa al 5 por 100;  $7,0 \pm 0,5$ ; actividad IV según Brockmann (ver 48.6.1). Granulometría.—El análisis granulométrico del producto debe dar un contenido inferior al 10 por 100 de partículas con un grosor igual o inferior a 63 micras e inferior al 0,1 por 100 de partículas con un grosor mayor de 250 micras, con una medida estadística para la totalidad de 120 micras  $\pm 5$  por 100.

48.3.6. p-amino-azo-benceno.

48.3.7. Rojo Sudan (Sudan II) (xileno-azo- $\beta$ -naftol).48.3.8. Amarillo Sudan (Sudan I) (benceno-azo- $\beta$ -naftol).

48.3.9. Benceno purísimo, exento de tiofeno.

## 48.4. Procedimiento.

## 48.4.1. Preparación de la columna de alúmina.

Pesar, con aproximación de 0,5 g, 20 g de alúmina e introducirlos en una ampolla de extracción de 125 ml, agregando después 50 ml del disolvente 48.3.3, con el que se llena también la columna hasta ocupar, aproximadamente, 2/3 de su capacidad. Colocar la ampolla encima de la columna, de manera que el tubo de salida coincida con el extremo superior de la columna. Abrir la llave de la ampolla dejando salir la papilla de alúmina y disolvente que caerá en el interior de la columna; al mismo tiempo, abrir la llave de la columna, regulando la salida del disolvente, de forma que el nivel de líquido en el interior de la columna se mantenga prácticamente constante, procurando más bien que el nivel suba en lugar de disminuir. Cuando toda la papilla de alúmina haya pasado a la columna, arrastrar las últimas porciones adheridas a las paredes, enjuagando el recipiente con un poco del mismo disolvente. Mantener abierta la llave de la columna, dejando salir lentamente el disolvente hasta que el nivel se haya situado a la altura del relleno de alúmina. Agregar hexano a la columna hasta situar el nivel a 1 cm, aproximadamente, del extremo inferior del cono esmerilado.

## 48.4.2. Preparación de la muestra de grasa.

Introducir el frasco de muestra en una estufa de aire regulada a la temperatura necesaria para conseguir la fusión completa de la muestra, lo que se consigue normalmente calentando de 30 a 40°C. Conseguida la fusión, si se observa la presencia de sedimentos o materia en suspensión no fundible, agitar fuertemente el frasco hasta conseguir la homogeneización de su contenido y, una vez conseguido, efectuar inmediatamente la pesada de la muestra en el frasco de pesada (fig. 4).

## 48.4.3. Fraccionamiento cromatográfico.

Pesar, con aproximación de 0,2 mg, 5 g de muestra en el frasco de pesada (fig. 4), utilizando para ello el soporte adecuado (fig. 3). Una vez efectuada la pesada, separar del soporte el frasco con el aceite, ajustando el tubo de prolongación (fig. 5) al cono situado en la parte inferior del frasco.

Ajustar el frasco, con el tubo de prolongación, a la boca superior de la columna cromatográfica y verter en el interior del frasco con el aceite el disolvente 48.3.3, utilizando el frasco lavador y dirigiendo el chorro a las paredes con el fin de lavar y arrastrar hacia el fondo el aceite que haya podido quedar adherido a la superficie; con el mismo chorro se mezclará todo el contenido para conseguir la homogeneización de la disolución de aceite.

Continuar agregando disolvente hasta que el nivel quede ligeramente por debajo del extremo superior del sifón; dirigiendo el chorro a la pared lateral superior, seguir agregando cuidadosamente hasta que el nivel líquido sobrepase ligeramente la altura del sifón y comience a caer por el tubo vertiendo en la columna cromatográfica.

Ajustar el depósito del disolvente (fig. 2) a la boca del frasco, cargándose con 125 ml de disolvente, colocar el matraz de 250 ml, previamente desecado a 105°C y pesado, a la salida de la columna, con el fin de recoger el líquido que fluye de la misma. Abrir la llave del depósito y la de la columna, regulándose ambas de forma que el líquido fluya en el matraz a una velocidad de 4-5 ml por minuto, manteniéndose el nivel en el frasco por encima del extremo superior del sifón. Si el disolvente no fluye al frasco por la llave del depósito, tapar el tubo hasta que comience el flujo; quitar el tapón y continuar la operación normalmente. El desarrollo quedará terminado cuando haya pasado la totalidad del líquido y no calga disolvente en el matraz.

La disolución recogida en el matraz se concentra en un evaporador rotatorio con vacío, calentando a la temperatura conveniente para evitar una ebullición tumultuosa que pudiera provocar proyecciones violentas del líquido.

Una vez eliminado el disolvente, llevar el matraz a una estufa de vacío para eliminar los residuos volátiles que queden en el aceite, manteniéndose el matraz en la estufa durante una hora. Sacar y pasar a un desecador, donde se deja enfriar, pesando a continuación. Repetir este tratamiento en operaciones sucesivas, hasta conseguir peso constante, con precisión del mg.

## 48.5. Cálculos.

$$\% \text{ aceite neutro} = \frac{P - P_0}{M} \cdot 100$$

Siendo:

P = peso del matraz con el aceite.

P<sub>0</sub> = peso del matraz vacío.

M = peso de la muestra en gramos.

% pérdida cromatográfica = 100 - % de aceite neutro.

## 48.6. Observaciones.

48.6.1. La determinación de la actividad de la alúmina según Brockmann se realiza en la forma siguiente:

La alúmina que se ha de ensayar se introduce en la columna cromatográfica 48.2.10, procurando conseguir una distribución homogénea, formando una capa de 5 cm de altura y colocando en la parte superior un disco de papel de filtro. Preparar una disolución mezclando 2 ml de benceno, 8 ml de hexano, 2 mg de rojo Sudan, 2 mg de p-amino-azobenceno y 2 mg de amarillo Sudan. Verter la disolución de colorantes en la columna, abrir la llave y dejar pasar la disolución hasta que el nivel líquido quede justamente a la altura de la alúmina. Verter a continuación el líquido de desarrollo constituido por una mezcla de benceno-hexano en la proporción 4:1 en volumen, del que se hacen pasar por la columna 20 ml. La velocidad de salida se regula con la llave, manteniendo un flujo de 0,5 a 1 ml por minuto, recogiendo el líquido en un matraz cónico de boca estrecha.

Terminado el desarrollo, con una alúmina de grado IV que es la apropiada, el amarillo Sudan habrá sido eliminado totalmente de la columna, quedando retenidos los otros dos que aparecerán en dos bandas: Una inferior roja, correspondiente al rojo Sudan y otra superior amarilla correspondiente al amino-azo-benceno. Una situación distinta de estos colorantes deberá interpretarse como un grado de actividad mayor o menor del producto, requiriendo el ajuste de su contenido en agua de la forma conveniente.

## 48.6.2. Preparación de la alúmina.

Partiendo de una alúmina de actividad superior a IV, se adicionarán cantidades crecientes de agua hasta conseguir en el ensayo de actividad, realizado como se indica en el apartado 48.6.1, el grado IV necesario.

Efectuado esto, si se dispone de una partida relativamente importante de alúmina, es conveniente determinar su humedad, siguiendo la metódica que se describe en 4.8.3, conocido este dato, en operaciones sucesivas, bastará con determinar la humedad de la alúmina, calculando la cantidad de agua que hay que añadir para obtener su producto de actividad IV.

Para incorporar a la alúmina una determinada cantidad de agua, se procederá de la forma siguiente: Introducir la alúmina pesada en un matraz o frasco con tapón esmerilado con una capacidad aproximadamente el doble del volumen de alúmina. Agregar el peso calculado de agua destilada, tapar el recipiente y agitar hasta conseguir la homogeneización del producto. Mantener el frasco cerrado durante 48 horas como mínimo, agitando durante este tiempo unas 10 ó 12 veces por lo menos. Después de este tratamiento la alúmina debe estar lista para su utilización.

## 48.6.3. Determinación de la humedad de la alúmina.

En una capsulita de porcelana pesar, con precisión de 1 miligramo, 1 g de alúmina. Introducir en la mufla del horno y mantenerla 2 horas a 600°C. Dejar enfriar parcialmente e introducir en una pesasustancias de dimensiones adecuadas; tapar y llevar a un desecador donde se mantiene hasta adquirir la temperatura ambiente. Pesar la totalidad, sin destapar el pesasustancias.

Previamente la cápsula vacía se habrá calentado en el horno a 600°C, durante media hora como mínimo; y el pesasustancias, en una estufa de aire a 105°C, durante una hora, dejándolos enfriar en el desecador. Las piezas así desecadas se pesarán vacías.

$$\text{Porcentaje de humedad de la alúmina} = \frac{(P_1 - P_0) 100}{P}$$

siendo:

P<sub>1</sub> = peso de la cápsula y el pesasustancias con la alúmina.P<sub>0</sub> = peso de la cápsula y el pesasustancias con la alúmina, una vez desecada.

P = peso exacto de la muestra de alúmina.

## 48.7. Referencias.

1. Instituto de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española, 55.105.

## ANEJO II

## METODOS DE ANALISIS DE PRODUCTOS CARNICOS

## 1. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS

## 1.1. Principio.

Las operaciones descritas a continuación tienen por finalidad conseguir una muestra para el análisis lo más homogénea posible. Por ello, toda simplificación o tratamiento insuficiente en esta operación puede conducir a unos resultados que no sean representativos.

## 1.2. Material y aparatos.

- 1.2.1. Cuchillo.
- 1.2.2. Trituradoras eléctricas de distinto grado de finura en el picado.
- 1.2.3. Frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, de color topacio, boca ancha y tapón esmerilado.
- 1.2.4. Cápsulas de porcelana de 20 cm de diámetro.

## 1.3. Procedimiento.

- 1.3.1. Tomar una muestra representativa de 200 g.
- 1.3.2. Quitar la piel si la tuviere (embutidos, etc.).
- 1.3.3. Partirla con cuchillo en rodajas o trozos de 0,5-1 cm.
- 1.3.4. Cortar los trozos en pequeños cubos.
- 1.3.5. Pasarlos varias veces por trituradora hasta conseguir una mezcla homogénea.
- 1.3.6. La muestra, bien homogeneizada debe guardarse inmediatamente en los frascos, limpios y secos, de forma que queden llenos, para prevenir pérdidas de humedad.
- 1.3.7. Conservarlos en refrigeración de forma que evite su deterioro y cualquier cambio en su composición.
- 1.3.8. Tomar las muestras para las diferentes determinaciones a ser posible dentro de las 24 horas siguientes.

## 2. ALMIDON

(Método cualitativo)

## 2.1. Principio.

El almidón reacciona con el yodo dando coloración azul.

## 2.2. Material y aparatos.

- 2.2.1. Erlenmeyer de 150 ml de capacidad.
- 2.2.2. Frasco cuentagotas.
- 2.2.3. Pipeta de 10 ml de capacidad.

## 2.3. Reactivos.

## 2.3.1. Solución iodo-iodurada:

Mezclar 1 g de yodo y 2 g de yoduro potásico en agua destilada hasta 200 ml.  
Mantener la solución en el frasco cuentagotas.

## 2.4. Procedimiento.

## 2.4.1. Preparación de la muestra:

Como en el método 1.

## 2.4.2. Valoración:

Introducir 10 g de la muestra preparada como 2.4.1 en un Erlenmeyer de 150 ml. Añadir 40 ml de agua destilada. Hervir durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo enfriar exteriormente el matraz en corriente de agua fría.

Con pipeta de 10 ml atravesar la capa grasa superior, tomando 10 ml del líquido inferior, transvasándoles a un tubo de ensayo. Añadir 5 gotas de la solución 2.3.1.

## 2.5. Interpretación de resultados.

En presencia de almidón aparecerá una coloración azul-negra.

## 3. ALMIDON

(Método cuantitativo)

## 3.1. Principio.

Extracción de azúcares simples con etanol caliente 80 por 100, permaneciendo el almidón.—El residuo de almidón se solubiliza con ácido perclórico diluido, y medida a 630 nm del color desarrollado al calentarlo con el reactivo antrona-sulfúrico.

## 3.2. Material y aparatos.

- 3.2.1. Balanza analítica.
- 3.2.2. Matraces aforados de 100 ml y 200 ml.
- 3.2.3. Tubos de centrifuga, cónicos, de 100 ml.
- 3.2.4. Pipetas graduadas de 10 ml, 25 ml, 5 ml y 2 ml.
- 3.2.5. Centrifuga de 2.500 r. p. m.
- 3.2.6. Baño de agua.

## 3.2.7. Baño de agua termostatable hasta 25° C.

## 3.2.8. Probeta graduada de 25 ml.

## 3.2.9. Papel de filtro Whatman número 12, o equivalente.

## 3.2.10. Espectrofotómetro capaz de lecturas de 630 nm.

## 3.3. Reactivos.

3.3.1. Disolución de ácido sulfúrico-antrona.—Disolver 0,2 g de antrona en 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El reactivo sirve para 3-4 días conservándolo a 0° C.

3.3.2. Glucosa patrón.—Disolver 0,1 g de glucosa anhidra en 100 ml de agua.

## 3.3.3. Ácido perclórico al 52 por 100.

## 3.3.4. Etanol al 80 por 100.

## 3.3.5. Etanol puro.

## 3.3.6. Eter de petróleo.

## 3.3.7. Disolución etanol-éter de petróleo (1/3) (v/v).

## 3.4. Procedimiento.

3.4.1. Extracción de azúcar y de grasa.—Pesar 2 g de carne triturada preparada como en el método 1 en un tubo centrífugo cónico de 100 ml. Añadir 25 ml de disolución etanol-éter de petróleo (1-3), tapar con tapón, agitar vigorosamente y centrifugar a 2.500 r. p. m. durante 5 minutos. Decantar y dejar a un lado la disolución etanol-éter de petróleo. Añadir 10 ml de etanol caliente al 80 por 100, agitar y centrifugar a 2.500 r. p. m. durante 5 minutos. Dejar a un lado la disolución alcohólica y repetir la extracción alcohólica con etanol caliente.

3.4.2. Extracción de almidón.—Añadir 5 ml de agua al residuo y remover. Añadir 6,5 ml de disolución de ácido perclórico diluido (52 por 100); remover o agitar durante 5 minutos. Dejar reposar durante 15 minutos. Añadir 20 ml de agua y centrifugar durante 5 minutos. Verter la disolución de almidón en un frasco volumétrico de 100 ml. Añadir 6,5 ml de disolución de ácido perclórico (52 por 100) y remover. Dejar reposar durante treinta minutos. Remover y lavar el contenido entero del tubo en el frasco volumétrico que contiene el primer extracto. Llevar a volumen y filtrar por papel filtro (3.2.9).

3.4.3. Determinación de almidón.—Diluir 5 ml de disolución de almidón filtrada en 200 ml con agua destilada. Pipetear 5 ml de dicha disolución en un tubo, enfriar en baño de María y añadir 10 ml de antrona reactivo (3.3.1). Mezclar completamente y calentar durante 7,5 minutos a 100° C. Quitar el tubo del baño, enfriar con rapidez a 25° C y determinar la absorbancia a 630 nm. El color permanece fijo durante treinta minutos.

## 3.5. Cálculos.

3.5.1. Curva patrón de glucosa.—Diluir 1, 2, 5 y 10 ml de 3.3.2 hasta 100 ml con agua destilada. A partir de las lecturas obtenidas, dibujar la curva patrón.

## 3.5.2. Contenido en almidón de la muestra:

% glucosa = 0,04 · ug de glucosa leídos en la curva patrón.  
% almidón = 1,06 · % glucosa.

## 3.6. Observaciones.

3.6.1. Teniendo en cuenta que el carragenato se determina como almidón, se deberá deducir del valor obtenido de almidón el correspondiente de carragenato.

3.6.2. En los productos que declaren contener carragenato y hasta que no exista técnica oficial para su determinación cuantitativa, se permitirá una tolerancia del 1,4 por 100 en el valor obtenido de almidón.

## 3.7. Bibliografía

1. W. Glover, H. Kirschenbaum y A. Caldwell (Departamento de Consumo y Comercialización, Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos, Laboratorios de Inspección de Carne, Nueva York, N.Y. 10011).

## 4. CONSERVADORES

(Por cromatografía en capa fina)

## 4.1. Principio.

Extracción de los conservadores por medio de una mezcla de éter y éter de petróleo y posterior identificación por cromatografía en capa fina.

## 4.2. Material y aparatos.

- 4.2.1. Homogeneizador.
- 4.2.2. Matraces.
- 4.2.3. Erlenmeyer de 25 y 250 ml.
- 4.2.4. Refrigerantes de reflujo.
- 4.2.5. Filtro Büchner y papel de filtro de filtración rápida.
- 4.2.6. Embudos y papel de filtro plegados.
- 4.2.7. Ampolla de decantación de 100 y 250 ml.
- 4.2.8. Cápsulas de porcelana de fondo plano.
- 4.2.9. Tubos pequeños de cristal con tapón.
- 4.2.10. Material para cromatografía en capa fina:

— Cubeta.

— Micropipetas.

- Secador.
- Fuente de ultravioleta.
- Placas de poliamida (20 x 20) con soporte de aluminio y revelador de fluorescencia incorporado tipo F-254 Merck, o equivalente.

## 4.3. Reactivos.

- 4.3.1. Aloxión acuosa de ácido sulfúrico al 10 por 100 (v/v).
- 4.3.2. Reactivo de Carrez (para defecación).
- 4.3.2.1. Solución acuosa de ferrocianuro potásico al 15 por 100 (p/v).
- 4.3.2.2. Solución acuosa de acetato de cinc al 30 por 100 (p/v).
- 4.3.3. Cloruro sódico.
- 4.3.4. Mezcla de éter y éter de petróleo (1/1).
- 4.3.5. Solución acuosa saturada de cloruro sódico.
- 4.3.6. Sulfato de sodio anhidro.
- 4.3.7. Soluciones testigo conteniendo 3 g/l en la mezcla a partes iguales de éter y éter de petróleo de los siguientes conservadores:
  - 4.3.7.1. Acido salicílico.
  - 4.3.7.2. Acido benzoico.
  - 4.3.7.3. Acido clorobenzoico.
  - 4.3.7.4. Acido parahidroxibenzoico.
  - 4.3.7.5. Ester etílico del ácido parahidroxibenzoico.
  - 4.3.7.6. Acido sórbico.

## 4.3.8. Eluyentes:

- 4.3.8.1. Mezcla de n-pentano, n-hexano, ácido acético (10, 3).
- 4.3.8.2. Mezcla de benceno, acetato de etilo, ácido acético (85, 10, 5).

## 4.4. Procedimiento.

## 4.4.1. Extracción de los conservadores.

Tomar aproximadamente 50 g de la muestra preparada como en el método 1 y transvasarla a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 15 ml de solución de ácido sulfúrico al 10 por 100 diluidos en 80 ml de agua hirviendo. Añadir 10 ml de solución de ferrocianuro potásico y agitar; 10 ml de solución de acetato de cinc y agitar.

Adaptar el refrigerante de reflujo. Someter la mezcla duran-

te treinta minutos a ebullición bajo un ligero reflujo. Filtrar rápidamente en caliente sobre un disco de papel de filtro mojado colocado sobre un embudo. El filtrado queda generalmente turbio. Añadir 2 ml de ferrocianuro potásico y agitar 2 ml de solución de acetato de cinc y agitar. Añadir 20 g, aproximadamente, de cloruro sódico. Filtrar en caliente (aproximadamente a 80° C) sobre filtro plegado, mojado, de forma que se retengan las grasas. Enfriar el filtrado. Trasvasar el filtrado a un embudo de decantación de 250 ml. Extraer los conservadores de la fase acuosa por medio de tres lavados con 20 ml de mezcla éter y éter de petróleo agitando suavemente durante 10 minutos, aproximadamente, para evitar la formación de una emulsión. Reunir los tres extractos etéreos y eliminar la fase acuosa. Lavar dos veces la fase etérea con 20 ml de solución saturada de cloruro sódico para romper las emulsiones que eventualmente hayan podido formarse y dos veces con 20 ml de agua destilada. Trasvasar la solución etérea a un matraz de 250 ml en el cual se haya puesto en el fondo un gramo de sulfato sódico anhidro. Tras dejarlo durante algunos minutos en contacto, transvasarlo a una pequeña cápsula de porcelana de fondo plano. Evaporar el disolvente a temperatura ambiente (no calentar para evitar la pérdida de ácido benzoico). Redisolver el depósito de la cápsula con algunas gotas de mezcla de éter y éter de petróleo. Lavar la cápsula dos o tres veces con el mismo disolvente para obtener un extracto de un volumen total, aproximadamente, de 0,5 ml.

## 4.4.2. Preparación del cromatograma.

Depositar las soluciones separadas sobre la placa de poliamida a 1 cm del borde por medio de una micropipeta (el diámetro de las manchas no debe ser mayor de 1 a 2 mm). Aplicar de la misma forma las soluciones testigo para comparar, una vez desarrollado el cromatograma, con las muestras problema, lo cual nos evita medir los Rf. Colocar la placa en la cubeta. Eluir hasta que el frente del eluyente haya recorrido los dos tercios de la placa. Sacar la placa y secar.

## 4.5. Interpretación de resultados.

4.5.1. El ácido salicílico ha sido escogido como sustancia de referencia, por producir fluorescencia azul de las manchas que se obtienen en los cromatogramas cuando éstos se ponen bajo luz ultravioleta, por lo cual pueden ser identificados fácil y rápidamente, bien por medida de sus Rf o bien por comparación con las manchas producidas por las soluciones testigo.

## 4.5.2. Rf de los conservadores.

	Acido p-hidroxibenzoico	Ester etílico del ácido p-hidroxibenzoico	Acido salicílico	Acido clorobenzoico	Acido benzoico	Acido sórbico
Eluyente 1 ... ..	0,05	0,21	0,46	0,75	0,86	0,94
Eluyente 2 ... ..	0,10	0,56	0,25	0,54	0,70	0,82

## 5. NITROGENO TOTAL

## 5.1. Principio.

Ataque del producto por ácido sulfúrico concentrado, catalizado con sulfato de cobre y selenio, en el cual se transforma el nitrógeno orgánico en iones amonio, que en medio fuertemente básico, permite la destilación del amoníaco, que es recogido sobre ácido bórico. La posterior valoración con ácido clorhídrico permite el cálculo de la cantidad inicialmente presente de nitrógeno en la muestra.

## 5.2. Material y aparatos.

- 5.2.1. Balanza analítica.
- 5.2.2. Batería calefactora.
- 5.2.3. Probetas de 50 ml.
- 5.2.4. Matraces Kjeldahl de 800 ml.
- 5.2.5. Embudos de vástago largo.
- 5.2.6. Embudos de 8 cm. de diámetro.
- 5.2.7. Aparato de destilación.
- 5.2.8. Erlenmeyer de 200 ml.
- 5.2.9. Bureta con divisiones de 0,1 ml.
- 5.2.10. Frascos de 250 ml de boca ancha con rosca.

## 5.3. Reactivos.

- 5.3.1. Sulfato de cobre.
- 5.3.2. Sulfato potásico.
- 5.3.3. Acido sulfúrico concentrado, d = 1,84.
- 5.3.4. Selenio en polvo.
- 5.3.5. Solución de hidróxido sódico al 40 por 100.
- 5.3.6. Solución de ácido bórico al 4 por 100.
- 5.3.7. Acido clorhídrico 0,1 N.
- 5.3.8. Indicador.

Disolver 2 g de rojo de metilo y 1 g de azul de metileno en 1.000 ml de etanol al 95 por 100 (v/v). Este indicador vira de violeta a verde a pH 5,4. Conservarlo en frasco tapado.

## 5.3.9. Piedra pómez.

## 5.4. Procedimiento.

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 1-3 g de la muestra, según contenido, preparada según el método 1. Llevar la muestra pesada al matraz Kjeldahl, e introducir sucesivamente unos granos de piedra pómez, 15 g de sulfato potásico, 0,5 g de sulfato de cobre, y una punta de espátula de selenio en polvo. Agregar 25 ml de ácido sulfúrico, mezclar suavemente por rotación y colocar el matraz en una batería calefactora, poniendo un embudo adecuado (5.2.5) en la boca. Calentar suavemente al principio, y cuando el conjunto adquiere una cierta decoloración aumentar la intensidad de calefacción. Agitar de vez en cuando con suavidad por rotación. Una vez que el líquido queda transparente, con una coloración azul verdosa, prolongar la ebullición al menos hora y media. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y añadir con precaución 100 ml de agua, disolviendo por rotación suave el sulfato potásico cristalizado.

En un Erlenmeyer de 200 ml poner 25 ml de ácido bórico al 4 por 100 y unas gotas de indicador (5.3.8). Introducir hasta el fondo en el Erlenmeyer la alargadera del aparato de destilación. Colocar el matraz en el aparato de destilación, ajustándolo bien, poniendo un poco de grasa en los esmerilados. Agregar, por el depósito superior, otros 100 ml de agua y 100 ml de disolución de hidróxido sódico al 40 por 100. Calentar suavemente hasta ebullición.

Aumentar el calentamiento recogiendo, al menos, 150 ml de destilado, o prolongarlo, hasta el momento en que se produzca una ebullición a golpes.

Retirar el Erlenmeyer, lavar la alargadera y el interior del refrigerante, recogiendo sobre el destilado las aguas de lavado.

Valorar hasta la coloración original, violeta, con ácido clorhídrico 0,1 N. Efectuar una prueba en blanco, utilizando 5 ml de agua destilada en vez de la muestra, siguiendo todo el procedimiento.

#### 5.5. Cálculo.

$$\text{Porcentaje N total} = \frac{0,14 f (V_1 - V_2)}{p}$$

$$\text{Porcentaje proteína total} = 6,25 \cdot \text{porcentaje N total}$$

Siendo:

- f = factor del clorhídrico.  
 $V_1$  = volumen en ml de ácido clorhídrico gastado en la valoración.  
 $V_2$  = volumen en ml de ácido clorhídrico gastado en el ensayo en blanco.  
 p = peso en gramos de la muestra.

#### 5.6. Referencias.

1. Norma internacional ISO R-837.

### 6. CENIZAS

#### 6.1. Principio.

Añadición de solución de acetato de magnesio, desecación en baño de agua o baño de arena, incineración en un horno a 550° C y posterior determinación de la masa del residuo, teniendo en cuenta la cantidad de óxido de magnesio proveniente de la adición de la solución de acetato de magnesio utilizada en primer lugar.

#### 6.2. Material y aparatos.

- 6.2.1. Cápsulas de porcelana de cuarzo o platino, con fondo plano, de aproximadamente 15 cm<sup>2</sup> de superficie y 25 mm de altura, de paredes ligeramente inclinadas.
- 6.2.2. Pipeta de 1 y 2 ml de doble aforo.
- 6.2.3. Baño de agua o baño de arena o placa calefactora.
- 6.2.4. Horno de mufla provisto de termostato y capaz de alcanzar al menos 800° C.
- 6.2.5. Desecador provisto de un agente deshidratante eficaz con indicador.
- 6.2.6. Balanza analítica.
- 6.2.7. Pinzas adecuadas para el manejo de las cápsulas.

#### 6.3. Reactivos.

- 6.3.1. Solución de acetato magnésico, que contenga 150 g/l. Pesar 15 g del reactivo anhidro o 25 g del tetrahidrato y llevarlos, una vez disueltos, a un matraz de 100 ml; enrasar.

#### 6.4. Procedimiento.

Introducir la cápsula bien limpia en el horno regulado a 550° C durante 20 minutos. Sacarla e introducirla en el desecador, permaneciendo en él 30 minutos. Pesarla con una precisión de 0,1 mg.

Introducir en la cápsula un peso P de muestra, aproximadamente 5 g, preparada según el método 1 y pesada con una precisión de 0,1 mg. Añadir 1 ml de la disolución de acetato magnésico (6.3.1) uniformemente. Colocar la cápsula en un baño de arena, o placa calefactora, hasta conseguir la carbonización de la muestra, prestando mucha atención a las osibles proyecciones. Transferir la cápsula al horno de mufla que debe quedar estabilizado a 550° C por espacio de, al menos, 1 hora. Si no alcanzan el grado de blancura deseado, debe sacarse la cápsula, dejarla enfriar y añadir unos mililitros (2-4) de agua destilada. Evaporar el agua en baño de arena. Introducir de nuevo la cápsula en el horno de mufla por espacio de 30 minutos y repetir las operaciones anteriores si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises. Sacarlas del horno e introducirlas en el desecador durante 30 minutos.

Pesar con precisión de 0,1 mg.

Efectuar dos determinaciones sobre la misma muestra.

#### 6.5. Cálculos.

$$\text{Porcentaje cenizas} = (M_2 - M_0 - M_3) \cdot \frac{100}{M_1 - M_0}$$

Siendo:

- $M_0$  = masa, en gramos, de la cápsula.  
 $M_1$  = masa, en gramos, de la cápsula conteniendo la muestra.  
 $M_2$  = masa, en gramos, de la cápsula y el residuo después de incineración.  
 $M_3$  = masa, en gramos, del óxido magnésico proveniente de la disolución de acetato magnésico añadido.

#### 6.6. Observaciones.

6.6.1. La diferencia entre dos determinaciones sobre la misma muestra, realizadas simultáneamente o rápidamente una después de otra por el mismo analista, no debe ser superior a 0,10 g por 100 g de muestra.

#### 6.7. Referencias.

1. Norma internacional ISO R-936.

### 7. FOSFORO

#### 7.1. Principio.

Transformación en ácido pirofosfórico, posterior hidrólisis del mismo y medida del color producido al añadirle el reactivo molibdato-vanadato.

#### 7.2. Material y aparatos.

- 7.2.1. Matraces aforados de 1.000, 250 y 100 ml.
- 7.2.2. Pipetas de 10, 20 y 50 ml.
- 7.2.3. Matraces Kjeldahl de 500 u 800 ml.
- 7.2.4. Balanza analítica.
- 7.2.5. Espectrofotómetro capaz de efectuar lecturas a 436 nm.

#### 7.3. Reactivos.

- 7.3.1. Solución de vanadato amónico.—Disolver 2,5 g de vanadato de amonio en 500 ml de agua hirviendo. Después de refrigeración, acidular con 20 ml de ácido nítrico concentrado y diluir hasta 1.000 ml.
- 7.3.2. Solución de molibdato amónico.—Disolver 100 g de molibdato amónico en 500 ml de agua a 50° C. Después de refrigeración añadir con precaución 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de enfriar diluir hasta 1.000 ml.
- 7.3.3. Reactivo molibdato-vanadato.—Una parte del reactivo 7.3.1. y una parte del reactivo 7.3.2.
- 7.3.4. Ácido nítrico concentrado.
- 7.3.5. Ácido sulfúrico concentrado.
- 7.3.6. Ácido sulfúrico diluido 1 : 10.
- 7.3.7. Selenio en polvo.
- 7.3.8. Agua oxigenada de 20 volúmenes.
- 7.3.9. Fosfato monopotásico.

#### 7.4. Procedimiento.

##### 7.4.1. Análisis de la muestra:

Introducir en un matraz Kjeldahl 5 g de la sustancia a analizar preparada según el método 1. Añadir 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y el catalizador de selenio (utilizando una punta de espátula). Dejar 12 horas en reposo. Añadir unos 20 ml de agua oxigenada. Calentar seguidamente la mezcla hasta ebullición y una vez clarificada prolongarla durante 2 horas de manera que se hidrolice todo el ácido pirofosfórico que hubiera podido formarse. Trasvasar la mezcla después de refrigeración, a un vaso volumétrico de 250 ml y completar hasta el trazo de aforo con agua destilada. Si hubiera una precipitación de sulfato de calcio o de ácido salicílico, pasar la solución por un filtro cuantitativo. Para la dosificación del ácido fosfórico, hacer pasar con la pipeta 10 ml de filtrado (el equivalente de 0,2 g) de la muestra en un matraz aforado de 100 ml y añadir 20 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de reactivo de molibdato-vanadato. Completar la solución hasta el trazo de aforo con agua y efectuar la medida espectrofotométrica al cabo de 10 minutos.

##### 7.4.2. Preparación de la curva patrón.

Disolver 4,393 g de fosfato monopotásico, previamente secado sobre ácido sulfúrico concentrado, en 1.000 ml de agua. La solución contiene un mg de P por ml. Las soluciones patrón conteniendo de 1 a 45 µg de P por ml se preparan trasvasando con la pipeta la cantidad deseada de solución P en un vaso volumétrico de 100 ml, añadiendo 20 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de reactivo de molibdato-vanadato y completando hasta el trazo de calibrado con agua destilada. Al término de 10 minutos se mide la absorción de la solución (en una cubeta de 1 cm de paso) a 436 nm contra una solución testigo, sirviéndose de un espectrofotómetro. Trazar la curva patrón.

#### 7.5. Cálculo.

Calcular el contenido en fósforo total, expresado en porcentaje de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a partir de la lectura en el espectrofotómetro y con ayuda de la curva patrón.

$$\text{Porcentaje P} = \frac{A}{400 \cdot M}$$

$$\text{Porcentaje P}_2\text{O}_5 = 2,29 \cdot \text{porcentaje P}$$

Siendo:

- A = µg de fósforo leídos en la curva.  
 M = peso, en g, de la muestra.

#### 7.6. Bibliografía.

- Pulls, G. (1981) Landwirtschaftliche Forschung, 14, 38-39.

### 8. CLORURO

#### 8.1. Principio.

Extracción de los cloruros del producto picado con agua caliente y alcohol y posterior determinación por el método Carpenter-Vohlard.

8.2. *Material y aparatos.*

- 8.2.1. Papel de filtro.
- 8.2.2. Embudos.
- 8.2.3. Matraces aforados de 250 y 200 ml.
- 8.2.4. Erlenmeyer de 150 y 250 ml.
- 8.2.5. Pipetas de 5 ml.
- 8.2.6. Bureta con divisiones de 0,1 ml.
- 8.2.7. Balanza analítica.
- 8.2.8. Placa calefactora.
- 8.2.9. Agitador magnético con calefacción.
- 8.2.10. Agitador de imán-teflón.
- 8.2.11. Vasos de precipitado de 500 ml.
- 8.2.12. Centrifuga provista de tubos de al menos 100 ml de capacidad.

8.3. *Reactivos.*

- 8.3.1. Solución titulada de nitrato de plata 0,1 N.
- 8.3.2. Solución de ácido nítrico concentrado  $d = 1,63$ .
- 8.3.3. Solución acuosa de sulfato férrico amónico (alumbre férrico) al 4 por 100.
- 8.3.4. Nitrobenceno.
- 8.3.5. Solución titulada de sulfocianuro potásico o amónico 0,1 N.
- 8.3.6. Solución de alcohol etílico al 40 por 100.
- 8.3.7. Reactivo de Carrez.
- 8.3.7.1. Solución acuosa de ferrocianuro potásico al 15 por 100.
- 8.3.7.2. Solución acuosa de acetato de cinc al 30 por 100.

8.4. *Procedimiento.*8.4.1. *Preparación del extracto.*

Pesar, con precisión de 1 mg, un peso P (alrededor de 10 g) de la muestra preparada según el método 1, introduciéndola en un Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 150 ml de alcohol al 40 por 100. Poner en el agitador y calentar suavemente. Prolongar la agitación durante una hora al menos. Transvasar a un matraz aforado de 250 ml con alcohol de 40 por 100 a través de un embudo y una varilla. Añadir consecutivamente 5 ml de cada uno de los reactivos de Carrez y enrasar. Agitar y dejar 10 minutos en reposo. Centrifugar 5 minutos a 2.000 r. p. m. Separar la grasa que sobrenada con ayuda de una espátula. Filtrar en un matraz aforado de 200 ml hasta el enrase. Verter el contenido del matraz en un vaso de 500 ml, lavando con una pequeña porción de agua. Este líquido de lavado se une al inicial en el vaso. Colocar en una placa y evaporar el líquido hasta 100 ml aproximadamente para eliminar el alcohol. Dejar enfriar y llevar el líquido de nuevo al matraz de 200 ml y enrasar con agua.

8.4.2. Introducir en un erlenmeyer de 250 ml y agitando suavemente entre adición y adición: 10 ml exactamente medidos de solución 0,1 N de nitrato de plata, 1 ml de solución de ácido nítrico concentrado, 1 ml de solución de sulfato férrico amónico al 4 por 100, 10 ml del extracto problema, 50 ml de agua destilada.

Dejar reposar durante 10 minutos en la oscuridad. Añadir 1 ml de nitrobenceno para aglomerar el precipitado y obtener una solución limpia. Valorar el exceso de nitrato de plata con la solución de sulfocianuro 0,1 N, hasta que se produzca el viraje.

8.5. *Cálculos.*

El tanto por ciento de cloruros presentes en la muestra, expresado en cloruro sódico, viene dado por la fórmula:

$$\text{Porcentaje ClNa} = \frac{14,625 (10 - n)}{P}$$

Siendo:

P = peso, en g, de la muestra de la que se ha obtenido el extracto.

n = volumen, en ml, de la solución de sulfocianuro gastados en la valoración.

## 9. GRASA

9.1. *Principio.*

Extracción de la grasa de la muestra previamente hidrolizada y desecada, por medio de hexano o éter de petróleo. Eliminación del disolvente por evaporación, desecación del residuo y posterior pesada después de enfriar.

9.2. *Material y aparatos.*

- 9.2.1. Erlenmeyer de 500 ml.
- 9.2.2. Vidrios de reloj.
- 9.2.3. Placa calefactora.
- 9.2.4. Papel de filtro Albet 242 Ø o similar.
- 9.2.5. Embudos.
- 9.2.6. Extractor Soxhlet.
- 9.2.7. Estufa eléctrica.
- 9.2.8. Balanza analítica.
- 9.2.9. Desecador provisto de un deshidratante eficaz (gel de sílice) con indicador de humedad.

9.3. *Reactivos.*

- 9.3.1. n-hexano o éter de petróleo con un intervalo de punto de ebullición 40-60° C e índice de bromo inferior a 1, o éter etílico anhídrido exento de peróxidos.
- 9.3.2. Piedra pómez.
- 9.3.3. Ácido clorhídrico 3 N.

9.4. *Procedimiento.*

Pesar con aproximación de 1 mg, 2,5 g de muestra preparada como en el método 1 e introducirlos en un Erlenmeyer de 500 ml. Añadir 100 ml de ácido clorhídrico 3 N (9.3.4) y unos trozos de piedra pómez. Cubrir la boca del Erlenmeyer con un vidrio de reloj, y someter la mezcla a una ebullición suave en la placa calefactora durante 1 hora. Enfriar y filtrar sobre doble filtro evitando cualquier paso de materia grasa al filtrado: Lavar el residuo con agua fría hasta desaparición de la reacción ácida. Verificar que en el filtrado no existe materia grasa.

Colocar los papeles de filtro conteniendo el residuo sobre un vidrio de reloj y desecarlos durante hora y media en la estufa a 95-98° C. Una vez seco el conjunto, introducirlo en el cartucho de extracción, extrayendo con el Soxhlet con éter etílico durante 6 horas, regulando la ebullición de forma que se produzcan 15 sifonadas al menos en cada hora. Eliminar el disolvente en el rotavapor y eliminar el resto del disolvente en la estufa durante hora y media a 75° C. Enfriar el matraz con la grasa en desecador, matraz que previamente fue tarado, y pesar cuando se alcanza la temperatura ambiente.

Repetir el calentamiento y la pesada hasta que la diferencia entre dos consecutivas sea menor de 5 mg.

9.5. *Cálculos.*

Expresar el resultado, en porcentaje de peso:

$$\text{Porcentaje grasa} = \frac{P' - P}{P''} \times 100$$

Siendo:

P = peso, en g, del matraz.

P' = peso, en g, del matraz con la grasa.

P'' = peso, en g, de la muestra.

9.6. *Referencias.*

1. Norma ISO-1443.

## 10. HUMEDAD

10.1. *Principio.*

Formación de una pasta con ayuda de arena y etanol, que es sometida primeramente a un presecado en baño de María y a continuación secada a  $102 \pm 2^\circ \text{C}$  hasta obtener un peso constante.

10.2. *Material y aparatos.*

- 10.2.1. Balanza analítica.
- 10.2.2. Cápsulas de acero inoxidable con tapa de 60 mm de diámetro y 25 mm de altura.
- 10.2.3. Varilla fina de vidrio con punta aplastada, que entre por completo en la cápsula.
- 10.2.4. Desecador provisto de un deshidratante eficaz (gel de sílice con indicador de humedad).
- 10.2.5. Baño de agua.
- 10.2.6. Estufa eléctrica regulada a  $102 \pm 2^\circ \text{C}$ .

10.3. *Reactivos.*

- 10.3.1. Arena de mar lavada a los ácidos, cuya granulometría esté comprendida entre 0,25 y 1,4 mm.
- 10.3.2. Etanol del 95 por 100 en volumen como mínimo.

10.4. *Procedimiento.*

Secar la cápsula conteniendo una cantidad de arena igual a 3-4 veces el peso de muestra y la varilla de vidrio, durante 30 minutos, en la estufa regulada a  $102 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Sacarla de la estufa e introducirla en el desecador, hasta que alcance la temperatura ambiente, y pesar el conjunto con 0,1 mg de aproximación.

Introducir en dicha cápsula un peso de muestra preparada según el método 1 aproximadamente 5 g y pesar de nuevo con aproximación de 0,1 mg.

Añadir a la cápsula 5 ml de etanol (10.3.2) y remover la mezcla con la varilla de vidrio. Colocar la cápsula al baño de agua regulándolo a una temperatura comprendida entre 60 y 80° C para evitar las posibles proyecciones, mantener el calentamiento hasta que el alcohol se evapore. Secar la muestra durante cuatro horas en la estufa a  $102 \pm 2^\circ \text{C}$ . Retirar la cápsula de la estufa y colocar en el desecador, hasta que alcance la temperatura ambiente. Pesar con aproximación de 0,1 mg.

Repetir las operaciones de secado hasta peso constante.

Efectuar por lo menos dos determinaciones sobre la misma muestra.

## 10.5. Cálculos.

$$\text{Porcentaje humedad} = (M_1 - M_2) \frac{100}{M_1 - M_0}$$

Siendo:

- $M_0$  = masa, en g, de la cápsula, la varilla y la arena.  
 $M_1$  = masa, en g, de la cápsula, la varilla, la arena y la muestra antes del desecado.  
 $M_2$  = masa, en g, de la cápsula, la varilla, la arena y la muestra después del desecado.

## 10.6. Observaciones.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones simultáneas o realizadas inmediatamente una después de la otra, efectuadas por el mismo analista, no debe ser superior a 0,1 g de agua por 100 g de muestra (0,1 por 100).

## 10.7. Referencias.

1. Norma internacional ISO R-1442.

11. AZUCARES TOTALES, REDUCTORES Y LACTOSA  
(Método de Luff-Schoorl)

## 11.1. Principio.

Los azúcares se disuelven en etanol diluido o bien en agua y después de la eliminación del alcohol se valoran por el método de Luff-Schoorl antes y después de la inversión.

## 11.2. Material y aparatos.

- 11.2.1. Pipetas de 1, 2, 5, 10, 25 ml.  
 11.2.2. Probetas de 50 ml.  
 11.2.3. Matraces Erlenmeyer de cuello esmerilado de 300 ml.  
 11.2.4. Bureta con divisiones de 0,1 ml.  
 11.2.5. Refrigerantes de reflujo.  
 11.2.6. Baño de arena.  
 11.2.7. Baño de agua.

## 11.3. Reactivos.

- 11.3.1. Etanol diluido al 40 por 100 (v/v) d 20° C  $\approx$  0,948 llevado a punto de viraje con fenoltaleína en una parte alícuota.  
 11.3.2. Solución de naranja de metilo al 0,1 por 100 (p/v).  
 11.3.3. Acido clorhídrico 4 N.  
 11.3.4. Acido clorhídrico 0,1 N.  
 11.3.5. Hidróxido sódico 0,125 N.  
 11.3.6. Reactivo de Luff-Schoorl.

11.3.6.1. Solución A.—50 g de ácido cítrico en 500 ml de agua.  
 11.3.6.2. Solución B.—Disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml de agua caliente, dejando enfriar.

11.3.6.3. Solución C.—Disolver 25 g de sulfato de cobre pentahidrato exento de hierro en 100 ml de agua.

Mezclar cuidadosamente la solución A con la B, añadiendo también con suave agitación la solución C, aforando el conjunto a 1.000 ml. Dejar reposar una noche y filtrar. El pH de la solución debe ser alrededor de 9,4.

Comprobar las concentraciones, que deben ser 0,1 N para el cobre y 2 N para el carbonato sódico.

11.3.7. Solución de tiosulfato sódico 0,1 N con factor exactamente calculado.

11.3.8. Solución de almidón.—Pesar 5 g de almidón soluble, haciendo un engrudo con 30 ml de agua hirviendo; este engrudo se vierte sobre 1 l de agua hirviendo, manteniendo durante 3 minutos la ebullición, dejar enfriar, y añadir 10 mg de iodo mercúrico como agente conservador.

## 11.3.9. Acido sulfúrico 6 N.

## 11.3.10. Gránulos de piedra pómez.

11.3.11. Solución hidroglicérida de invertasa, conteniendo 2.750 unidades/ml.

11.3.12. Suspensión de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) 25 g de dicha levadura fresca en 100 ml de agua. Esta solución se conserva como máximo una semana en el refrigerador.

## 11.3.13. Soluciones de defecación.

11.3.13.1. Carrez I.—Disolver en 50 ml de agua 24 g de acetato de cinc ( $\text{CH}_3\text{COO}$ )<sub>2</sub> Zn.2H<sub>2</sub>O y 3 g de ácido acético glacial. Completar a 100 ml con agua destilada.

11.3.13.2. Carrez II.—Disolver en 50 ml de agua 10,6 g de ferrocianuro potásico  $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  completando a 100 ml con agua destilada.

## 11.3.14. Isopentanol como antiespumante (opcional).

## 11.4. Procedimiento.

## 11.4.1. Preparación del extracto.

Como en 8.4.1.

## 11.4.2. Valoración de azúcares reductores.

Tomar con una pipeta una cantidad del extracto no superior a 25 ml y que contenga menos de 60 mg de azúcares reductores

expresados en glucosa. Si fuera preciso tomar una cantidad menor de 25 ml (caso no frecuente en productos a base de carne) se completa hasta dichos 25 ml con agua destilada, determinándose el contenido de azúcares reductores según el método de Luff-Schoorl posteriormente descrito.

Los resultados se expresan en glucosa por ciento.

11.4.3. Valoración de azúcares totales, después de la inversión.

Se pueden seguir dos métodos:

11.4.3.1. Método químico.—Tomar por medio de una pipeta 50 ml del extracto en un matraz de 100 ml aforado, y añadir cuatro gotas de naranja de metilo (11.3.2) y después gota a gota ácido clorhídrico 4 N (11.3.3) hasta viraje neto al color rojo. Añadir posteriormente 15 ml de clorhídrico 0,1 N (11.3.4) y llevar al baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Enfriar rápidamente a 20° C y añadir 15 ml de NaOH 0,125 N, o la precisa para el viraje del indicador. Aforar a 100 ml con agua destilada.

Tomar una cantidad no superior a 25 ml que contenga menos de 60 mg de azúcares totales, expresados en glucosa, como en el apartado 11.4.2, determinándose el porcentaje de azúcares reductores según el método de Luff-Schoorl, que se expresa en azúcar invertido o bien en sacarosa, multiplicando el valor obtenido por el factor 0,95.

11.4.3.2. Método enzimático.—Tomar 50 ml del extracto correspondiente en un matraz de 100 ml aforado, añadir 2 ml de solución hidroglicérida de invertasa y dejar reposar una hora a 50° C en estufa. Enfriar a 20° C enrasando exactamente a 100 ml.

Tomar una cantidad no superior a 25 ml y proseguir como en los casos anteriores y con las mismas especificaciones.

## 11.4.4. Valoración de lactosa.

Tomar en un matraz aforado de 100 ml, 50 ml del extracto correspondiente. Añadir 5 ml de suspensión de levadura (11.3.12), homogeneizar y dejar durante 2 horas en un baño a 39° C. Enfriar a 20° C. Añadir 2,5 ml de solución Carrez I (11.3.13.1) y agitar, añadir 2,5 ml de solución Carrez II (11.3.13.2) y agitar de nuevo. Completar el volumen a 100 ml, mezclar y filtrar. Tomar 25 ml de filtrado como máximo, y con un contenido en lactosa entre 40 y 80 mg, introducirlos en un Erlenmeyer de 300 ml.

Proceder de la misma forma con un ensayo en blanco de 5 ml de levadura.

Determinar el contenido en lactosa según el método de Luff-Schoorl, los resultados se expresan en lactosa anhidra por ciento.

El método se basa en el hecho de que el *Saccharomyces cerevisiae* hidroliza todos los azúcares exceptuando la lactosa.

## 11.4.5. Valoración según el método de Luff-Schoorl.

Tomar con la pipeta 25 ml exactos del reactivo de Luff-Schoorl y verterlos en un Erlenmeyer de 300 ml sobre las correspondientes alícuotas de azúcares, añadir unos gramos de piedra pómez y calentar en tela metálica con mechero fuerte de manera que hierva dos minutos aproximadamente, llevar el Erlenmeyer a un baño de arena previamente calentado de forma que se caliente únicamente el fondo del recipiente, adaptándose un refrigerante de reflujo y manteniendo la ebullición durante 10 minutos exactos.

Enfriar rápidamente, y valorar a los 5 minutos, añadiendo 3 g de iodo potásico disuelto en 2 ml de agua, y lentamente para evitar las proyecciones, 25 ml de ácido sulfúrico 6 N, valorando el iodo puesto en libertad con tiosulfato 0,1 N, hasta obtener un color amarillo débil, añadir el indicador de almidón (11.3.8) y terminar la valoración hasta decoloración.

Efectuar una valoración análoga en blanco, mezclando 25 ml del reactivo de Luff-Schoorl con 25 ml de agua, sin previa ebullición, y con la adición de iodo potásico y sulfúrico 6 N.

## 11.5. Cálculos.

Con la ayuda de la tabla 1 determinar la cantidad de azúcar en mg correspondiente a la diferencia entre los volúmenes de tiosulfato en ml consumidos en la valoración en blanco y problema.

Sean a los mg de azúcares correspondientes:

$$\text{Porcentaje azúcares} = \frac{25 \cdot a}{P \cdot V}$$

Siendo:

P = peso, en g, de la muestra inicial de la que se obtuvo el extracto.

V = volumen, en ml, de alícuota tomada.

Esta expresión es válida cuando el extracto se haya enrasado a 250 ml.

## 11.6. Observaciones.

11.6.1. Los resultados obtenidos para azúcares totales realizando los dos tipos de inversión son semejantes. Pero si el análisis no se realiza con frecuencia, es preferible el método químico, por el posible deterioro de la invertasa y su alto precio.

11.6.2. La diferencia entre el porcentaje de azúcares totales y el de azúcares reductores, multiplicado por 0,95 da el contenido en sacarosa de la muestra.

11.6.3. El contenido en azúcares reductores, exceptuando la lactosa, se obtiene multiplicando el valor de ésta, obtenido según (11.4.4), por 0,675 y restando este resultado del contenido en azúcares reductores totales.

TABLA 1

Para 25 ml de reactivo Luff-Schoorl

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N	Glucosa, fructosa Azúcares invertidos C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactosa C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltosa C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
	ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg
1	2,4	2,4	3,5	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

## 12. HIDROXIPROLINA

## 12.1. Principio.

Prevía hidrólisis en medio ácido de las proteínas y oxidación de la hidroxiprolina. El derivado formado con el p-dimetilaminobenzaldehído se valora colorimétricamente.

## 12.2. Material y aparatos.

- 12.2.1. Balanza analítica.
- 12.2.2. Matraces de fondo plano de 250 ml de capacidad.
- 12.2.3. Refrigerantes de reflujo.
- 12.2.4. Baño de arena.
- 12.2.5. Agitador magnético.
- 12.2.6. pH-metro.
- 12.2.7. Matraces aforados de 50, 100, 200 y 1.000 ml de capacidad.
- 12.2.8. Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.
- 12.2.9. Tubos de ensayo de 16 x 160 mm, aforados a 12 ml.
- 12.2.10. Baño de María.
- 12.2.11. Espectrofotómetro o colorímetro capaces para lecturas a 560 nm.
- 12.2.12. Cubetas de 1 cm de paso de luz específicas para luz visible.

## 12.3. Reactivos.

- 12.3.1. Piedra pómez.
- 12.3.2. Solución acuosa de ácido clorhídrico al 50 por 100 (v/v) (diluir a 1.000 ml, 500 ml de solución concentrada de ácido clorhídrico de densidad 1,19).
- 12.3.3. Solución concentrada de hidróxido sódico de densidad 1,33 (400 g/l) (p/v).
- 12.3.4. Solución de hidróxido sódico al 10 por 100 (p/v).
- 12.3.5. Alcohol isopropílico puro.
- 12.3.6. Solución acuosa de cloramina T al 10,5 por 100 (p/v).
- 12.3.7. Solución tampón de pH = 6 (disolver 34 g de acetato sódico anhidro, 36,5 g de citrato trisódico monohidratado, 5,5 g de ácido cítrico en 385 ml de alcohol isopropílico puro y enrasar a 1.000 ml con agua destilada).
- 12.3.8. Solución oxidante, que debe prepararse en el momento de su empleo, un volumen de la solución 12.3.6 y cuatro volúmenes de la solución 12.3.7.
- 12.3.9. Solución acuosa de ácido perclórico al 17,5 por 100.
- 12.3.10. Solución de p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB) al 5 por 100 en alcohol isopropílico. Esta solución se conserva una semana a temperatura ambiente.
- 12.3.11. L-hidroxiprolina.

## 12.4. Procedimiento.

## 12.4.1. Preparación de la muestra.

Pesar con 1 mg de aproximación P gramos de la muestra convenientemente homogeneizada (aproximadamente 3 g) sobre papel de fumar sin engomar, e introducir la muestra en el matraz de fondo plano (12.2.2). Añadir piedra pómez v 50 ml de la solución de ácido clorhídrico al 50 por 100 (12.3.2). Montar los refrigerantes de reflujo y colocarlos en el baño de arena. Calentar de forma que se mantenga una ebullición suave al menos durante siete horas. Refrigerar rápidamente los matraces bajo corriente de agua. Ajustar el contenido de los matraces a un pH comprendido entre 6 y 7, añadiendo y agitando fuertemente 28 ml de la solución concentrada de hidróxido sódico, dejar enfriar al chorro de agua y llevar al pH anteriormente indicado con solución diluida de hidróxido sódico (12.3.4). Transferir el contenido a un matraz aforado de 200 ml y enrasar dejando en reposo durante una hora. Filtrar a través de papel de filtro plegado. Tomar una alícuota del filtrado y diluirla 10 o 20 veces con agua destilada. Es conveniente realizar ambas diluciones, porque permiten obtener dos valores sobre la misma muestra.

## 12.4.2. Preparación de la curva patrón.

La coloración obtenida sigue la ley de Beer-Lambert cuando la concentración de hidroxiprolina se encuentra comprendida entre 0 y 20 µg/ml.

Teniendo en cuenta los numerosos factores que influyen en la formación del derivado coloreado, es indispensable construir para cada determinación una curva patrón, realizándose el desarrollo del color al mismo tiempo sobre las diluciones problema y los patrones.

Preparar una solución madre conteniendo 400 µg/ml de hidroxiprolina con agua destilada. A partir de esta solución, hacer diluciones que contengan 5, 10 y 20 µg/ml con agua destilada. Tomar una serie de tubos de ensayo aforados a 12 ml y poner en uno de ellos (tubo testigo) 1 ml de agua destilada. En los tres siguientes colocar 1 ml de las soluciones que contienen 5, 10 y 20 µg/ml de hidroxiprolina. En los dos siguientes 1 ml de cada una de las diluciones diluidas del filtrado. Añadir a cada tubo sucesivamente: 2 ml de isopropanol puro (12.3.5) y 1 ml de la solución oxidante recientemente preparada (12.3.8) y agitar. Dejar reposar durante 10 minutos, transcurrido dicho tiempo añadir de nuevo a cada tubo: 3 ml de la solución de ácido perclórico al 17,5 por 100 (12.3.9) y 2 ml de p-DMAB (12.3.10), homogeneizar el contenido de los tubos y llevarlos al baño de María regulado a 60° C, permaneciendo en él 20 minutos,

retirarlos del baño y enfriarlos bajo corriente de agua. Ajustar hasta 12 ml con isopropanol y agitar.

Leer la densidad óptica de cada tubo ajustando el cero con el tubo testigo a 560 nm.

Trazar la correspondiente curva patrón, colocando en abscisas las absorbancias y ordenadas las concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  de hidroxiprolina.

### 12.5. Cálculos.

$$\text{Porcentaje hidroxiprolina} = \frac{x \cdot d}{50 P}$$

Siendo:

x = cantidad de hidroxiprolina leída en la curva patrón.

d = dilución del filtrado realizado.

P = peso inicial de la muestra.

Porcentaje colágeno = 8 % de hidroxiprolina.

### 12.6. Observaciones.

12.6.1. Cuando la muestra a analizar sea de alto contenido en colágeno, el tiempo de ebullición deberá prolongarse al menos durante nueve horas.

## 13. NITRITOS

### 13.1. Principio.

Del extracto obtenido, adicionándole ácido sulfanílico y  $\alpha$ -nailamina, se lee la intensidad de la coloración obtenida mediante colorimetría o espectrofotometría.

### 13.2. Material y aparatos.

13.2.1. Matraces aforados de 100 y 1.000 ml de capacidad.

13.2.2. Probetas de 100 ó 200 ml de capacidad.

13.2.3. Baño de María.

13.2.4. Papel de filtro plegado de 15 cm de diámetro aproximadamente.

13.2.5. Tubos de ensayo de 150 x 25 mm.

13.2.6. Matraces Erlenmeyer de 300 ml de capacidad.

13.2.7. Espectrofotómetro capaz de leer a 520 nm.

13.2.8. Cubetas de 1 cm de paso específicas para luz visible.

### 13.3. Reactivos.

13.3.1. Solución patrón de nitrito sódico.—Pesar, con aproximación de 1 mg, 1 g de nitrito sódico, disolver en agua y completar hasta 1.000 ml. Tomar con la pipeta 5 ml de esta solución e introducirla en otro matraz aforado de 1.000 ml. Enrasar.

13.3.2. Reactivo colorimétrico.

13.3.2.1. Solución I.—Disolver calentando al baño de María 6 g de ácido sulfanílico en 200 ml de ácido acético glacial y 400 ml de agua destilada. Añadir 200 ml de una solución de cloruro sódico que contiene 100 g/l de cloruro sódico. Diluir con agua hasta 1.000 ml.

13.3.2.2. Solución II.—Disolver calentando al baño de María 0,3 g de cloruro de  $\alpha$ -nailamina en 100 ml de agua destilada. Filtrar si es necesario y añadir 200 ml de ácido acético glacial. Diluir hasta 1.000 ml con agua destilada.

Manipular con precaución esta disolución por su carácter cancerígeno.

Ambas soluciones (13.3.2.1 y 13.3.2.2) deben conservarse en frascos topacio bien cerrados. El reactivo colorimétrico se obtiene mezclando volúmenes iguales de ambas soluciones.

### 13.4. Procedimiento.

13.4.1. Preparación del extracto.—Como en 8.4.1.

13.4.2. Valoración de la muestra.—Del extracto obtenido en 13.4.1, tomar 25 ml y añadir 1 g, aproximadamente, de carbón activo si es necesario decolorar. Filtrar hasta que el filtrado sea transparente. Del filtrado tomar una alícuota de 10 ml y ponerla en un tubo de ensayo 13.2.5. Si se toman menos de 10 ml, completar hasta 10 ml con agua destilada. Añadir 10 ml del reactivo colorimétrico, mezclar y dejar reposar la solución quince minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

A partir de los 20 minutos y antes de 4 horas, medir la densidad óptica de la solución en una cubeta de 1 cm de paso de luz a 520 nm de longitud de onda.

Si la solución coloreada problema presenta una coloración superior a la de la solución patrón más concentrada, tomar una alícuota menor de 10 ml.

Efectuar dos determinaciones sobre la misma muestra.

13.4.3. Preparación de la curva patrón.—Tomar de la solución patrón (13.3.1) alícuotas de 5, 10 y 20 ml y llevar a 100 ml con agua. El contenido de estas soluciones es, respectivamente, de 0,25, 0,50 y 1 p. p. m. de nitrito sódico.

Transferir 10 ml de cada una de estas soluciones a un tubo de ensayo (13.2.5), añadir 10 ml del reactivo colorimétrico y proceder a su valoración colorimétrica o espectrofotométrica a 520 nm, llevando absorbancias frente a concentraciones expresadas en p. p. m. de nitrito sódico.

### 13.5. Cálculos.

Calcular el contenido en nitritos de la muestra expresado en p. p. m. por medio de la fórmula:

$$\text{p. p. m. NO}_2\text{Na} = C \frac{2.500}{m \cdot V}$$

m = peso de muestra de la que se ha obtenido el extracto.

V = volumen, en ml, tomado del extracto decolorado.

C = concentración en nitrito sódico expresada en  $\mu\text{g/ml}$  determinada sobre la curva patrón.

Tomar como resultado la media de los valores obtenidos en dos determinaciones paralelas si las condiciones de reproducibilidad se cumplen.

### 13.6. Observaciones.

La diferencia entre dos determinaciones paralelas sobre una misma muestra, realizadas simultáneamente por el mismo analista, no debe ser superior al 10 por 100 del contenido calculado en nitritos.

### 13.7. Referencias.

1. Norma ISO/DIS 2918.

## 14. NITRATOS

### 14.1. Principio.

Al reaccionar en medio sulfúrico los nitratos con la brucina se produce una coloración amarilla-marrón, cuya intensidad es proporcional al contenido en nitratos presentes, lo que permite su valoración colorimétrica o espectrofotométrica.

### 14.2. Material y aparatos.

14.2.1. Matraz aforado de 50 ml de capacidad.

14.2.2. Espectrofotómetro o colorímetro capaces para lecturas a 410 nm.

14.2.3. Cubetas de 1 cm de paso específicas para luz visible.

### 14.3. Reactivos.

14.3.1. Solución patrón de nitratos.—Disolver 0,1629 g de nitrato potásico anhidro en agua y enrasar a 1 l. 1 ml de esta solución contiene 0,1 mg de nitrato.

14.3.2. Reactivo brucina-ácido sulfanílico.—Disolver 1 g de brucina y 0,1 g de ácido sulfanílico en unos 70 ml de agua destilada caliente, añadir 3 ml de ácido clorhídrico concentrado, dejar enfriar y enrasar a 100 ml con agua. La solución debe guardarse en frasco color topacio.

14.3.3. Solución de ácido sulfúrico.—Añadir con cuidado 500 ml de ácido sulfúrico concentrado a 75 ml de agua destilada. Debe conservarse herméticamente cerrado.

### 14.4. Procedimiento.

14.4.1. Preparación del extracto.—Como en 8.4.1.

14.4.2. Valoración de la muestra.—Introducir en un matraz aforado de 50 ml de capacidad 10 ml del extracto (14.4.1), 1 ml del reactivo (14.3.2) y 10 ml del reactivo (14.3.3) muy lentamente, mezclar y dejar en reposo durante diez minutos al abrigo de la luz.

Pasado este tiempo, añadir agua destilada, agitando, hasta completar unos 40 ml y dejar reposar durante quince minutos en la oscuridad.

Enfriar el matraz en un baño de hielo hasta que alcance la temperatura ambiente, preferiblemente también en la oscuridad. A continuación, enrasar a 50 ml con agua, homogeneizar el contenido del matraz y leer la absorbancia a 410 nm. El cero se ajusta con 20 ml de agua sometida al proceso anteriormente descrito.

14.4.3. Preparación de la curva patrón. Tomar distintas alícuotas de la solución 14.3.1 y tratar como en 14.4.2.

### 14.5. Cálculos.

Llevar la absorbancia obtenida a la curva patrón y expresar el correspondiente contenido de nitratos en mg por kg.

### 14.6. Observaciones.

14.6.1. Periódicamente resulta aconsejable confirmar o rectificar los valores de la curva patrón, lo que es absolutamente necesario cuando se cambia de reactivos.

14.6.2. En las condiciones citadas, se pueden medir concentraciones de nitrato comprendidas entre 50 y 500  $\mu\text{g/l}$ .

14.6.3. El ácido sulfanílico se añade al reactivo 14.3.2 para evitar la posible interferencia del ión nitrito. Las interferencias de iones ferrosos, férricos y manganesos sólo son apreciables cuando su concentración es superior a 1 mg/l.

## 15. pH

## 15.1. Principio.

Medida del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio, función de la actividad de iones hidrógeno a ambos lados de la membrana. Utilizar como referencia un electrodo de calomelanos.

## 15.2. Material y aparatos.

15.2.1. pH-metro capaz de determinar la segunda cifra decimal.

15.2.2. Electrodo de vidrio de punta fina o convencional (según la dureza de la muestra).

15.2.3. Electrodo de calomelanos.

## 15.3. Reactivos.

15.3.1. Disolución tampón de pH = 4.

15.3.2. Disolución tampón de pH = 7.

## 15.4. Procedimiento.

Tomar una cantidad de muestra preparada según el método 1 o bien directamente, en el caso de muestras homogéneas, añadir igual cantidad de agua destilada, mezclar y dejar reposar durante diez minutos.

Ajustar el pH-metro a la temperatura de trabajo con las disoluciones 15.3.1 y 15.3.2 e introducir los electrodos de vidrio y de referencia, separados al menos 2 cm.

Conectar el pH-metro y esperar a que se estabilice.

## 15.5. Expresión de los resultados.

Anotar el valor de pH indicado por el aparato. Repetir la operación dos veces al menos.

## 15.6. Observaciones.

15.6.1. Es necesaria una limpieza escrupulosa de los electrodos entre determinaciones sucesivas, lo que al tratarse de productos con un alto contenido en materia grasa es más laboriosa que en disoluciones desengrasadas, requiriendo a veces ser frotados o sumergidos en alcohol, éter dietílico, éter de petróleo, etcétera; secarlos convenientemente y lavarlos finalmente con agua destilada; secarlos de nuevo, quedando así dispuestos para una nueva lectura.

## METODOS BIOLOGICOS

## 1. IDENTIFICACION DE ESPECIE ANIMAL

## 1.1. Principio.

Las proteínas musculares de las distintas especies animales, aunque muy similares entre sí, tienen en cada grupo zoológico una estructura específica que permite diferenciar carnes de especies distintas por métodos serológicos (técnica de Uhlenhuth).

Sólo es aplicable a productos crudos.

## 1.2. Material y aparatos.

1.2.1. Tubos de precipitación de 20 x 4 mm.

1.2.2. Gradillas metálicas para los tubos anteriores.

1.2.3. Precipitoscopio (cámara oscura con luz indirecta).

1.2.4. Pipetas capilares muy finas.

1.2.5. Pinzas.

1.2.6. Bisturí.

1.2.7. Tijeras.

1.2.8. Gasa.

1.2.9. Papel de filtro.

1.2.10. Tubos de ensayo.

1.2.11. Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.

## 1.3. Reactivos.

1.3.1. Suero fisiológico estéril.

1.3.2. Antisueros específicos (su especificidad debe ser contrastada en el momento de su utilización).

## 1.4. Procedimiento.

Separar del producto cárnico entre 5 y 10 g de carne magra lo más exenta posible de grasa. Picar en trozos muy pequeños, poniéndose a macerar en suero fisiológico estéril en la proporción de 1/10. Mantener el macerado puesto en un Erlenmeyer de 250 ml en frigorífico durante 24 horas, al objeto de evitar la proliferación bacteriana.

Transcurridas las 24 horas, filtrar el macerado a través de gasa y papel de filtro cuantas veces sea necesario, hasta obtener un líquido transparente, sin importar que tenga coloración propia. Diluir el filtrado, que estaba a 1/10, hasta 1/25 y 1/50.

Poner en una gradilla metálica tres tubos de precipitación para las tres diluciones preparadas. Tomar con pipeta capilar una para cada dilución, partes de las disoluciones (antígeno problema), llevándolo hasta el fondo de los tubos. Colocar se-

guidamente el antisuero que se ensaya (anticuerpo específico conocido) en los tres tubos mediante pipeta capilar muy fina de la manera siguiente: Poner el tubo conteniendo el antígeno problema en posición horizontal, llevando en este momento la pipeta con el antisuero hasta el fondo del tubo, momento en que se vuelve a poner el tubo en posición vertical, con lo que saldrá una pequeña cantidad de antisuero que desplazará hacia arriba el antígeno, pero sin mezclarse con él; volver a poner de nuevo en posición horizontal el tubo, sacando rápidamente la pipeta que contiene el antisuero. El tubo debe estar siempre en posición horizontal a la entrada o la salida de la pipeta con el antisuero, evitando de esta forma que los dos líquidos reaccionantes se mezclen. Utilizar una sola pipeta para cada antisuero. Es conveniente poner dos tubos testigos, uno para el suero y otro para el antígeno, testigos que necesariamente deben dar siempre reacción negativa.

## 1.5. Interpretación de resultados.

La reacción positiva se produce con la aparición de un anillo blanquecino, opalescente, en la zona de separación de ambos líquidos reaccionantes antes de 15 minutos. Reacciones positivas posteriores a este tiempo deben considerarse inespecíficas. La reacción tiene lugar, para un mismo antígeno, a distintos tiempos, según sea el título del antisuero empleado.

## 1.6. Observaciones.

1.6.1. La lectura de los resultados debe hacerse con luz intensa indirecta y sobre fondo oscuro, preferiblemente en un precipitoscopio.

## 1.7. Referencias.

1. Normalización de Técnicas en Bromatología Sanitaria. F. Pérez Flórez. 1970.

## ANEJO III

METODOS DE ANALISIS DE CEREALES Y DERIVADOS  
16. ACIDO ASCORBICO (VITAMINA C)

(Método cualitativo)

## 16.1. Principio.

Este método sirve para determinar la presencia de vitamina C en harina y consiste en la aparición de puntos blancos sobre fondo rosa del reactivo sal sódica del 2,6 diclorofenol indofenol en medio ácido.

## 16.2. Material y aparatos.

16.2.1. Placa Petri de 95 cm<sup>2</sup>.

## 16.3. Reactivos.

16.3.1. Disolución acuosa al 0,05 por 100 de la sal sódica del 2,6 diclorofenol indofenol.

16.3.2. Disolución acuosa al 5 por 100 de ácido metafosfórico.

## 16.4. Procedimiento.

Extender 10 g de la muestra sobre una placa de vidrio compactándola de forma que quede bien uniforme. Rociar por completo con la disolución del ácido metafosfórico y a continuación hacer lo mismo con la disolución de la sal sódica del 2,6 diclorofenol indofenol. Al cabo de unos minutos aparecen unos puntos blancos más o menos grandes sobre el fondo rosa.

## 18. FOSFORO

## 18.1. Principio.

Transformación de los compuestos fosforados en ortofosfatos y posterior valoración colorimétrica con fosfomolibdovanadato.

## 18.2. Material y aparatos.

18.2.1. Espectrofotómetro o colorímetro que permita lecturas a 430 nm.

18.2.2. Crisoles de porcelana, de 35 mm de diámetro y 45 milímetros de altura, sin tapadera.

18.2.3. Matracas aforados de 100 y 500 ml de capacidad.

18.2.4. Baño de agua.

18.2.5. Estufa de desecación con sensibilidad de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

## 18.3. Reactivos.

18.3.1. Amoníaco concentrado de densidad  $\rho = 0,910\text{ g/ml}$ .

18.3.2. Disolución de molibdato amónico al 10 por 100 (p/v). Disolver 100 g de molibdato amónico en agua caliente; añadir 10 ml de amoníaco concentrado de  $\rho = 0,910\text{ g/cm}^3$  para asegurar su conservación y completar hasta 1.000 ml con agua destilada.

18.3.3. Acido nítrico de densidad  $\rho = 1,38\text{ g/ml}$ .

18.3.4. Ácido nítrico al 10 por 100 (p/v).—Disolver 16 ml de ácido nítrico  $\rho = 1,38 \text{ g/cm}^3$ , hasta 100 ml con agua destilada.

18.3.5. Disolución de metavanadato de amonio.—Disolver 2,35 gramos de metavanadato de amonio en 400 ml de agua destilada y caliente. Añadir lentamente y agitando 20 ml de la disolución que contiene 7 ml de ácido nítrico  $\rho = 1,381 \text{ g/ml}$  y 13 ml de agua destilada.

18.3.6. Reactivo nitromolibdovanadato.—Mezclar 200 ml de la disolución de molibdato amónico al 10 por 100 y 200 ml de la disolución de metavanadato de amonio, con 134 ml de ácido nítrico  $\rho = 1,381 \text{ g/cm}^3$  o en su lugar 192 ml de ácido nítrico  $\rho = 1,331 \text{ g/ml}$ .

18.3.7. Ácido clorhídrico concentrado de densidad  $\rho = 1,19 \text{ g/ml}$ .

18.3.8. Disolución patrón de fósforo.—Pesar 4,394 g de fósforo monopotásico, previamente desecado en estufa a  $100^\circ \text{C}$  durante unas doce horas. Disolver en agua destilada y llevar a un volumen de 1.000 ml en un matraz aforado. 1 ml corresponde a 1.000 gammas de fósforo.

18.3.9. Disoluciones patrones.—Tomar 10 ml de la disolución anterior y diluir con agua destilada hasta el enrase en un matraz aforado de 100 ml, obteniéndose una concentración de 100 gammas de fósforo por mililitro. Tomar partes alicuotas de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 ml y llevar a un volumen de 10 ml con agua destilada. Su concentración será de 5, 10, 15, 20 y 25 gammas/ml. Añadir 10 ml del reactivo nitromolibdovanadato y proceder como se describe en el método.

#### 18.4. Procedimiento.

Pesar, con una aproximación de  $\pm 0,1 \text{ mg}$ , de 0,3 a 1,5 g de muestra en un crisol previamente calcinado y tarado. Introducir el crisol en la mufla a una temperatura inferior a  $100^\circ \text{C}$ . Aumentar la temperatura paulatinamente hasta alcanzar los  $550^\circ \text{C}$ ; mantener esta temperatura durante 2 horas. No se debe pasar de  $550^\circ \text{C}$ , para evitar decrepitaciones y volatilizaciones, ya que cuando existen cloruros en el producto a analizar, puedan afectar a los resultados. El tiempo que debe permanecer el crisol con la muestra en la mufla es variable y estará de acuerdo con la naturaleza y con la cantidad de la muestra. Suelen ser suficientes 2 horas, pero si transcurrido este tiempo las cenizas del crisol no presentan el color blanco grisáceo deseado, sacar el crisol de la mufla y dejar enfriar dentro de un desecador, añadiendo posteriormente unas gotas de agua o, mejor, unas gotas de agua oxigenada de 50 volúmenes. Introducir el crisol en la estufa de desecación a  $100^\circ \text{C}$  para eliminar el agua o el agua oxigenada. Eliminada la humedad, introducir nuevamente el crisol en la mufla a  $550^\circ \text{C}$ . Dejar transcurrir el tiempo necesario hasta que las cenizas contenidas en el crisol alcancen el color deseado. Sacar el crisol de la mufla y llevar a un desecador con sustancias desecadoras. Dejar enfriar hasta la temperatura ambiente.

Obtendidas las cenizas, añadir en el crisol una cantidad de ácido clorhídrico concentrado (18.3.7) hasta que las cenizas queden cubiertas. Evaporar el ácido clorhídrico en el baño de agua a ebullición, hasta sequedad, en un dispositivo adecuado para la eliminación de vapores ácidos. Disolver el residuo en 3 ml de ácido nítrico al 10 por 100 y hervir en el baño de agua durante 5 minutos, utilizando el dispositivo adecuado para la eliminación de los vapores ácidos. No se debe dejar secar el contenido para evitar la hidrólisis de los ortofosfatos que produciría reacciones coloreadas. Filtrar a través de papel, sobre un matraz aforado de 500 ml, lavando con agua destilada los crisoles donde estaban contenidas las cenizas y diluir hasta el enrase.

Para desarrollar la reacción de color, colocar, en una cubeta o tubo de espectrofotómetro o fotocolorímetro, 10 ml de la disolución problema y añadir 10 ml del reactivo nitromolibdovanadato. Agitar, dejar reposar durante diez minutos. Efectuar la lectura espectrofotométrica o fotocolorimétrica a 430 nm, utilizando como blanco la mezcla de 10 ml de agua destilada y 10 ml de reactivo nitromolibdovanadato. La coloración amarilla, desarrollada es estable durante varios días.

#### 18.5. Cálculos.

Leer en el espectrofotómetro o fotocolorímetro y buscar su correspondencia en fósforo en la curva patrón.

$$\text{Fósforo (\%)} = \frac{F \cdot 0,005}{P}$$

Siendo:

F = concentración de fósforo, en gammas, encontrada en la curva patrón/10 ml disolución.

P = peso, en gramos, de la muestra empleada.

#### 18.6. Referencias.

1. Instituto de Racionalización y Normalización del Trabajo. Una Norma Española UNE 64017.

## 19. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HARINAS DE TRIGO COMUN (-TRITICUM VULGARE-) EN SEMOLAS Y PASTAS ALIMENTICIAS

### 19.1. Principio.

El método se basa en la detección y cuantificación de un componente designado  $\text{CM}_1$ , del extracto cloroformo-metanol del endospermo de trigo o de productos derivados de él, cuyo control genético radica en el cromosoma 1D de «Triticum Vulgare» y que por tanto no se encuentra en «T. durum».

El mencionado extracto, al que se designa proteína  $\text{CM}$ , se fracciona por electroforesis sobre gel de almidón, y el componente  $\text{CM}_1$  se estima visualmente o se cuantifica densitométricamente.

### 19.2. Material y aparatos.

19.2.1. Balanza analítica.

19.2.2. Equipo de electroforesis.—Fuente de tensión, corriente continua 0-500 v, -100 mA. Placas de vidrio de  $20 \times 20 \text{ cm}$  marcos de plástico de  $20 \times 20 \text{ cm}$  exterior, de  $18 \times 18 \text{ cm}$  interior y de 3 mm de espesor. Depósitos de electrodos de  $20 \times 10 \times 10 \text{ cm}$  centímetros.

19.2.3. Densitómetro de reflexión, en el caso de que se quiera cuantificar.

19.2.4. Tubos de  $8 \times 50 \text{ mm}$  o similar, con tapones de corcho.

19.2.5. Gradilla.

19.2.6. Dos placas de acero inoxidable de  $5 \times 7 \times 1 \text{ cm}$  o dimensiones similares.

19.2.7. Jeringa de vidrio de 1 ml de capacidad.

19.2.8. Capilares de 10 cm de largo.

19.2.9. Placa de porcelana con pocillos.

19.2.10. Probetas de 100 ml y 1.000 ml.

19.2.11. Vasos de 500 ml y de 1.000 ml.

19.2.12. Baño de agua con termómetro.

19.2.13. Cubeta de plástico de al menos  $25 \times 25 \times 5 \text{ cm}$ .

### 19.3. Reactivos.

19.3.1. Cloroformo.

19.3.2. Metanol.

19.3.3. Eter dietílico libre de peróxidos.

19.3.4. Etanol del 70 por 100.

19.3.5. Papel Albet número 502, o similar, y papel de filtro.

19.3.6. Almidón hidrolizado para electroforesis Connaught o similar.

19.3.7. Tampón lactato de aluminio-ácido láctico, 0,1 N, pH 3,2 en urea 3 M.—Diluir 4,9 g de lactato de aluminio en agua destilada, añadir 10,6 ml de ácido láctico purísimo y 180 g de urea, completando hasta 1 litro con agua destilada. Este tampón sirve tanto para el gel de almidón como para los compartimentos de los electrodos.

19.3.8. Solución de nigrosina soluble en agua al 0,5 por 100 en acético-agua (1/1) (v/v).

19.3.9. Gel de almidón.—Mezclar 24,5 g de almidón y 180 ml de tampón en un vaso de 500 ml, agitar suavemente con una varilla en baño de agua a  $80 \pm 3^\circ \text{C}$  hasta que gelifique (2-3 minutos). El gel caliente se vierte sobre una placa de vidrio a la que se ha superpuesto un marco de plástico de las mismas dimensiones externas que la placa y de 3 mm de espesor; extender uniformemente con la varilla y, finalmente, prensar suavemente con una placa de vidrio de las mismas dimensiones sin dejar burbujas. Dejar reposar durante al menos 3 horas.

### 19.4. Procedimiento.

19.4.1. Extracción y preparación para electroforesis de la proteína  $\text{CM}$ .—Pesar 50 mg de harina, sémola, grano o pasta alimenticia y transferirlos a un tubo de  $8 \times 50 \text{ mm}$  o similar. El grano y la pasta se aplastan por presión entre dos placas de acero inoxidable antes de ser transferidas al tubo. Añadir aproximadamente 0,5 ml de éter dietílico en cada tubo y dejar reposar durante no menos de 30 minutos, agitando ocasionalmente. Después de la última agitación se deja sedimentar por gravedad y el sobrenadante se elimina con la ayuda de una jeringa. El disolvente residual se deja evaporar a la temperatura ambiente o en una estufa a  $35^\circ \text{C}$  durante 10 minutos. Agregar aproximadamente 0,25 ml de cloroformo-metanol (2/1) (v/v) a cada tubo, tapar y dejar reposar durante 2 horas, agitando ocasionalmente.

Después de la última agitación, dejar sedimentar por gravedad y transferir el extracto sobrenadante con un capilar a una pieza de papel Albet número 502 o similar, de dimensiones  $3 \times 10 \text{ mm}$ . Con el capilar se satura el papel, que se deja evaporar antes de una nueva adición (ver 19.6.4), repitiendo la operación hasta agotar el sobrenadante. Para esta operación, las piezas de papel a las que se van a transferir las distintas muestras se depositan en distintos pocillos de una placa de porcelana o similar. Se recomienda realizar la transferencia entre 10 y 20 muestras simultáneamente.

19.4.2. Electroforesis sobre gel de almidón de la proteína  $\text{CM}$ .—Separar cuidadosamente una de las placas de vidrio con la ayuda de una espátula y recubrir la superficie expuesta del gel con un plástico fino. Marcar en dicha superficie una fila de ranuras (1 cm de largo cada una) a 3 cm de uno de los

bordes del gel. Alojarse en dicha ranura las piezas de papel Albet número 502 o similar que portan las muestras, previamente impregnadas con tampón. Disponer el gel horizontalmente apoyado sobre las cubetas de electrodos y establecer la conexión eléctrica mediante puentes de papel de filtro (20 papeles de dimensiones apropiadas superpuestos).

#### 19.5. Interpretación de resultados.

19.5.1. Detección de trigo exaploide.—La electroforesis del extracto CM de trigo exaploide («T. Vulgare») muestra tres bandas, designadas CM1, CM2 y CM3, mientras que la de trigo tetraploide («T. durum») sólo presenta dos CM2 y CM3.

El trigo exaploide se detecta en una mezcla por la aparición de CM1 en el perfil electroforético. Para el tamaño de muestra anteriormente propuesto, CM1 se detecta en mezcla de 10-15 por 100. Usando muestras de tamaño doble, el umbral de detección se reduce proporcionalmente.

19.5.2. Cuantificación de trigo exaploide en mezclas.—La acotación del porcentaje de «T. Vulgare» en una mezcla se basa en la cuantificación de la relación CM1, CM2 y en la estimación de la variabilidad intraespecífica de CM1 y CM2.

En la figura 1-A se presenta la forma de acotar gráficamente el porcentaje de trigo exaploide en mezclas basándose en la medida de la relación CM1, CM2 mediante densitometría de reflectancia con luz de 820 nm. En la figura 1-B se representa la variación de la amplitud de la acotación según el valor obtenido.

Una estimación semicuantitativa, más imprecisa que la anterior, puede obtenerse por comparación visual del problema con una serie de mezclas conocidas que pueden incorporarse al mismo gel.

#### 19.6. Observaciones.

19.6.1. Las condiciones de electroforesis son 10 V/cm—durante seis horas.

19.6.2. La tinción se realiza con nigrosina al 0,05 por 100 en acético.—Agua (1/1) (v/v) durante 14-16 horas en una cubeta de plástico de dimensiones apropiadas, dejando el gel con la cara opuesta a la de inserción hacia arriba.

19.6.3. La decoloración del fondo se realiza en pocos minutos con etanol al 70 por 100.

19.6.4. Cuando se manejan 10-20 muestras, después de una transferencia se devuelve el capilar al tubo y se pasa a la muestra siguiente. Cuando se llega a la muestra final, ya se ha evaporado la primera y está en condiciones de una nueva transferencia.

#### 19.7. Referencias.

1. R. García Faure y F. García Olmedo: «A new Method for the Estimation of Common Wheat in Pasta Products». *Lebensm. Wis. U. Technol.* Vol. 2. 1969.

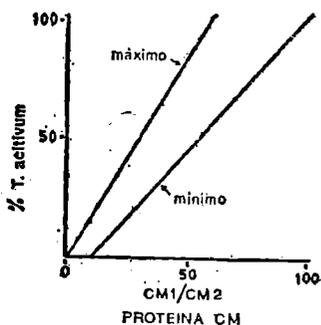


Fig. 1-A

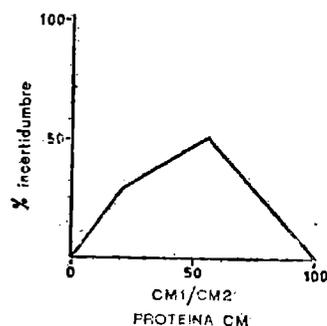


Fig. 1-B

## 20. DETECCIÓN DE HARINAS DEGRADADAS POR EL ATAQUE DE PLANTATOMIDOS

### 20.1. Principio.

Se detecta la degradación de la calidad panadera de la masa de harina mediante la determinación del exceso de actividad proteolítica.

### 20.2. Material y aparatos.

Como en 14.2.

### 20.3. Reactivos.

Como en 14.3.

### 20.4. Procedimiento.

Como el 14.4 con las siguientes modificaciones:

20.4.1. El número de piezas de masa serán seis.

20.4.2. Transcurrido el tiempo normal de 26 minutos del comienzo de amasado, extraer tres piezas de la cámara del alveógrafo y analizarlas obteniendo sus correspondientes curvas. El resto de las piezas se analizan sobre el mismo papel después de un período de reposo de tres horas.

Si alguno de los alveolos o curvas fuera claramente anormal debe desecharse la curva.

### 20.5. Expresión de los resultados.

Si existe una actividad proteolítica excesiva, la segunda serie de curvas presentará menor extensibilidad y tenacidad, siendo mayor la diferencia entre ellas, a mayor actividad.

Cuantificar esta actividad calculando la degradación de W y G en la forma siguiente:

$$\text{Porcentaje de degradación de } W = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \cdot 100$$

$$\text{Porcentaje de degradación de } G = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \cdot 100$$

### 20.6. Referencias.

1. Harinas. Actividad proteolítica. H-80277-A. Ministerio del Aire.

## ANEJO IV

### MÉTODOS DE ANÁLISIS DE FERTILIZANTES

#### 16(b). FOSFORO SOLUBLE EN AGUA

(Colorimetría)

##### 16(b).1. Principio.

Extraer el fósforo soluble en agua de la muestra y determinar su cantidad midiendo espectrofotométricamente la absorbancia del complejo coloreado que forma el ión ortofosfato con el molibdeno.

No es aplicable a las escorias básicas ni a los abonos que producen soluciones coloreadas o que contengan otros iones además del ortofosfato que formen complejos coloreados con el malibdivanadato.

##### 16(b).2. Material y aparatos.

16(b).2.1. Matraces aforados de 100 ml de capacidad.

16(b).2.2. Buretas de 20 ml de capacidad.

16(b).2.3. Pipetas de 20 ml de capacidad.

16(b).2.4. Espectrofotómetro o colorímetro capaces para lecturas a 400 nm.

##### 16(b).3. Reactivos.

16(b).3.1. Soluciones de fosfato monopotásico puro y seco (a 105°C durante dos horas) que contengan de 0,4 a 1,0 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ml con intervalos de 0,1 mg/ml. Preparar semanalmente las soluciones de 0,4 a 0,7 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ml.

16(b).3.2. Ácido nítrico.

16(b).3.3. Solución de molibdivanadato.—Disolver 40 g de molibdato vanadato amónico tetrahidrato en 400 ml de agua caliente y enfriar. Disolver 2 g de metavanadato amónico en 250 ml de agua caliente, enfriar y añadir 450 ml de ácido perclórico del 70 por 100. Añadir gradualmente y agitando la solución de molibdato a la solución de metavanadato y diluir a 2 l.

##### 16(b).4. Procedimiento.

16(b).4.1. Preparación de la solución.—Poner un gramo de muestra sobre un filtro de 9 cm de diámetro y lavar con pequeñas porciones de agua hasta obtener, aproximadamente, 250 ml de filtrado. Dejar pasar cada porción a través del filtro antes de añadir otra nueva y si el filtrado no puede completarse al cabo de una hora, aplicar succión. Si el filtrado está turbio añadir de 1 a 2 ml de ácido nítrico. Enrasar a 250 ml con agua destilada y mezclar. Para muestras con menos del 5 por 100 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> diluir a 250 ml y para muestras que contengan más del 5 por 100 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> diluir a un volumen tal que una alícuota de 5 ó 10 ml contenga de 2 a 5 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

16(b).4.2. Muestras que contienen menos del 5 por 100 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.—Introducir en un matraz aforado de 100 ml una alícuota de 5 ml de la solución problema [16(b).4.1] y 5 ml de la solución patrón de fosfato que contenga 2 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Desarrollar color como en 16(b).5.1 y determinar la absorbancia correspondiente de la misma manera que para las soluciones patrones de fosfatos 16(b).6.1, ajustando el aparato a cero de absorbancia con el patrón de 2 mg. Leer el contenido de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> de la solución problema llevando el valor de la absorbancia a la curva patrón [16(b).6.1].

Como series de soluciones problemas, vaciar y rellenar la célula de referencia con el patrón de 2 mg después de cada determinación.

16(b).4.3. Muestras que contienen más de 5 por 100 de  $P_2O_5$ . Tomar alícuota de 5 ó 10 ml de la solución problema (para que contenga de 2 a 5 mg de  $P_2O_5$ ) [16(b).4.1] e introducir en un matraz aforado de 100 ml sin adición de solución patrón de fosfato y proceder como en 16(b).4.2.

16(b).5. Cálculo.

16(b).5.1. Preparación de la curva patrón.—Tomar alícuotas de los siete patrones de fosfato monopotásico [16(b).3.1] (conteniendo de 2-5 mg de  $P_2O_5$ /alícuota) en matraces aforados de 100 ml y añadir 45 ml de agua. A continuación, y dentro de cinco minutos cuando se trata de series, añadir 20 ml de molibdoanadato con una bureta o pipeta, enrasar y mezclar. Dejar reposar diez minutos. Leer a 400 nm.

16(b).5.2. Muestras que contienen menos de 5 por 100 de  $P_2O_5$ :

$$\frac{\text{Porcentaje } P_2O_5 \text{ en la muestra} = 100 \text{ (mg de } P_2O_5 \text{ sobre la curva patrón} - 2)}{20}$$

16(b).5.3. Muestras que contienen más de 5 por 100 de  $P_2O_5$ :

$$\frac{\text{Porcentaje } P_2O_5 \text{ en la muestra} = 100 \times \text{mg de } P_2O_5 \text{ sobre la curva patrón}}{\text{mg de la muestra en la alícuota}}$$

16(b).6. Observaciones.

16(b).6.1. Introducir en matraces aforados de 100 ml alícuotas de 5 ml de las soluciones de fosfato 16(b).3.1 que contenga 2 y 3,5 mg de  $P_2O_5$ /alícuota, respectivamente, y desarrollar color como en 16(b).5.1. Ajustar el aparato poniendo a cero la absorbancia con la solución patrón de 2 mg y determinar la absorbancia para la solución patrón de 3,5 mg (esencial que la absorbancia de esta última sea prácticamente idéntica al valor que le corresponde en la curva patrón).

16(b).7. Referencias.

1. A. O. A. C.: «Official Methods of Analysis». Ed. 1970, página 14/20.032.

17(b). FOSFORO SÓLUBLE EN AGUA Y EN CITRATO AMÓNICO NEUTRO (Asimilable) (Colorimetría)

17(b).1. Principio.

Después de separar el fósforo soluble en agua de la muestra, someter el residuo a una extracción con disolución neutra de citrato amónico. El fósforo asimilable puede determinarse en la disolución obtenida al reunir los extractos acuosos y de citrato amónico.

No es aplicable a aquellos abonos que después de tratarlos con la mezcla ácida ternaria conserven algo de color o aquellos que contengan otros iones además del ortofosfato que formen complejos coloreados con el molibdoanadato.

17(b).2. Material y aparatos.

17(b).2.1. Matraces aforados de 500 ml de capacidad.  
17(b).2.2. Matraces aforados de 200 ml.  
17(b).2.3. Matraces aforados de 250 ml.  
17(b).2.4. Espectrofotómetro o colorímetro capaces para lecturas a 400 nm.  
17(b).2.5. Placa calefactora.

17(b).3. Reactivos.

17(b).3.1. Soluciones de fosfato monopotásico puro y seco (a 105° C durante dos horas) que contengan de 0,4 a 1,0 mg de  $P_2O_5$ /ml con intervalos de 0,1 mg/ml. Preparar semanalmente las soluciones de 0,4 a 0,7 mg de  $P_2O_5$ /ml.

17(b).3.2. Mezcla ácida ternaria.—Añadir 20 ml de ácido sulfúrico a 100 ml de ácido nítrico, mezclar y añadir 40 ml de ácido perclórico al 70 por 100.

17(b).3.3. Molibdoanadato modificado.—Disolver 40 g de molibdato amónico en 400 ml de agua caliente y enfriar. Disolver 2 g de metavanadato amónico en 250 ml de agua caliente, enfriar y añadir 250 ml de ácido perclórico del 70 por 100. Añadir gradualmente agitando la solución de molibdato a la solución de metavanadato y enrasar a 2 litros.

17(b).3.4. Solución de citrato amónico neutro.—Debe tener un peso específico de 1,09 a 20° C y un pH igual a 7,0 determinado electrométicamente.

Disolver 370 g de ácido cítrico cristalizado en 1,5 litros de agua y casi neutralizar, añadiendo 345 ml de hidróxido amónico (de 28 a 29 por 100 de  $NH_3$ ). Si la concentración de amoníaco es menor del 28 por 100 añadir mayor volumen y disolver el ácido cítrico en un volumen más pequeño de agua. Enfriar y comprobar el pH. Ajustar a pH = 7 con hidróxido amónico (1 + 7) o con disolución de ácido cítrico. Si es preciso diluir la solución hasta que el peso específico sea de 1,09 a 20° C. El volumen será, aproximadamente, de 2 litros.

Conservar en frascos herméticamente cerrados y comprobar el pH de vez en cuando, reajustándolo si difiere de 7,0.

17(b).4. Procedimiento.

17(b).4.1. Preparación de la solución.—Poner un gramo de muestra sobre un papel de filtro de 9 cm de diámetro y lavar por gravedad sobre un matraz aforado de 500 ml con 12 porciones de agua de 10 ml. Dejar que cada porción pase a través del filtro antes de añadir más. Dejar escurrir el papel completamente y después enjuagar el embudo con 10 ml de agua destilada.

Tratar el residuo insoluble en agua con la solución de citrato amónico neutro, transfiriendo el filtro y el residuo, dentro del intervalo de una hora, a un matraz de 200 ó 250 ml que contenga 100 ml de citrato amónico previamente calentado a 65° C. Cerrar herméticamente el matraz con un tapón de goma blanda, agitar vigorosamente hasta reducir a pulpa el papel y quitar la presión levantando momentáneamente el tapón. A continuación colocar el matraz cerrado en un baño agitador a 65° C exactamente y agitar durante una hora (la acción del aparato debe ser tal que la dispersión de la muestra ha de ser mantenida continuamente en la solución de citrato y que esta solución bañe continuamente las superficies internas del tapón y del matraz). Quitar el matraz del aparato y transferir su contenido al que tiene la fracción soluble en agua. Enfriar a temperatura ambiente inmediatamente enrasar y mezclar completamente y dejar en reposo por lo menos dos horas antes de tomar la alícuota.

17(b).4.2. Muestras que contienen menos del 5 por 100 de  $P_2O_5$ .—Tomar una alícuota de 10 ml en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Añadir 5 ml de mezcla ácida ternaria, agitar el matraz con movimiento rotatorio, hervir suavemente durante quince minutos y digerir a 150-200° C hasta que la solución quede con una sal blanca e incolora. Evaporar hasta humos blancos y continuar calentando durante cinco minutos. Enfriar y añadir 15 ml de agua y hervir cinco minutos. Trasvasar el contenido del Erlenmeyer a un matraz aforado de 100 ml, diluir a 50 ml, agitar con movimientos rotatorios y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 5 ml de la solución patrón de fosfato que contenga 2 mg de  $P_2O_5$  y 20 ml de la solución de molibdoanadato modificado. Diluir a 100 y continuar como en 16(b).4.2.

17(b).4.3. Muestras que contienen más del 5 por 100 de  $P_2O_5$ . Introducir en un matraz de 100 ml una alícuota de 5 ó 10 ml de tal forma que dicha alícuota contenga de 2 a 5 mg de  $P_2O_5$  y digerir la muestra como en 17(b).4.2.

Continuar como en 17(b).4.2, pero sin añadir solución patrón de fosfato.

17(b).5. Cálculo.

17(b).5.1. Preparación de la curva patrón como en 16(b).5.1.  
17(b).5.2. Muestras que contienen menos del 5 por 100 de  $P_2O_5$  (como en 16(b).5.2).  
17(b).5.3. Muestras que contienen más del 5 por 100 de  $P_2O_5$  (como en 16(b).5.3).

17(b).6. Referencias.

1. A. O. A. C.: «Official Methods of Analysis». Ed. 1970, página 15/2.046.

22. BORO SOLUBLE EN ACIDO

22.1. Principio.

Consiste en pasar el boro a  $BO_3H_3$ , el cual puede ser valorado con un álcali fuerte, previa exaltación de su acidez por formación de un ión complejo con una sustancia polihidroxilada (manitol o sorbitol).

22.2. Material y aparatos.

22.2.1. Balanza analítica.  
22.2.2. pH-metro o similar.  
22.2.3. Vaso de 250 ml.

22.3. Reactivos.

22.3.1. Solución patrón de ácido bórico.

Disolver 1 g de  $BO_3H_3$  en  $H_2O$  y llevar a 1 litro.

1 ml contendrá 0,1748 mg de B.

22.3.2. Solución patrón de NaOH.

Preparar una solución de concentración 0,025 N libre de  $CO_2$  y a continuación se titula de la siguiente manera: Pipetear 25 ml de la solución patrón de  $BO_3H_3$  depositándolos en un Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 3 g de ClNa e indicador rojo de metilo, diluyéndose con agua destilada hasta 150 ml; calentar hasta ebullición para expulsar el  $CO_2$ , enfriar y titular potenciométricamente como en 22.4. Realizar un blanco repitiendo la titulación cambiando los 25 ml de la solución patrón de  $BO_3H_3$  por 25 ml de agua. Para determinar la equivalencia en B se efectúan los siguientes cálculos:

mg B/ml = 4,369/ml de la solución de NaOH — ml gastados en el blanco.

Esta solución se debe preservar del  $CO_2$  atmosférico.

## 22.3.3. Solución del indicador rojo de metilo.

Disolver 0,1 mg de rojo de metilo en 50 ml de alcohol, diluir hasta 100 ml con agua y filtrar si es necesario.

- 22.3.4. ClH.
- 22.3.5. ClH 0,5 N.
- 22.3.6. ClH 0,02 N.
- 22.3.7. Solución de  $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$  al 10 por 100.
- 22.3.8. NaOH 0,5 N.
- 22.3.9. NaOH 0,025 N.
- 22.3.10. ClNa.
- 22.3.11. Manitol o sorbitol.

## 22.4. Procedimiento.

Pesar la muestra con exactitud de 1 mg (22.6.1), depositando la cantidad de sustancia pesada en un vaso de 250 ml. Añadir, aproximadamente, 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y 3 ml de ClH. Calentar a ebullición y mantener ésta durante un tiempo suficiente como para descomponer los carbonatos. Mantener a continuación la solución caliente sin llegar a ebullición durante el procedimiento de eliminación de posibles fosfatos. Añadir unos 10 ml de solución de  $(\text{NO}_3)_2 \text{Pb}$  al 10 por 100 ó 1 ml por cada 1,2 por 100 de  $\text{P}_2\text{O}_5$  si el contenido de éste se conoce y es superior al 12 por 100. Añadir  $\text{CO}_3\text{H Na}$  hasta neutralizar. Seguidamente añadir unas cuantas gotas de rojo de metilo y continuar añadiendo  $\text{CO}_3\text{H Na}$  hasta conseguir un viraje alcalino del rojo de metilo (amarillo o ligeramente anaranjado). A continuación calentar la mezcla al baño de María durante treinta minutos, añadiendo pequeñas cantidades de  $\text{CO}_3\text{H Na}$  si fuera necesario para mantener el color (22.6.2). Después de la neutralización y el período de calentamiento, tendremos de 40-50 ml de solución. Filtrar la solución en caliente, recogiéndola sobre un Erlenmeyer de 250 ml, lavando el filtro con agua caliente. Se acidifica con unas cuantas gotas de ClH y calentar brevemente para expulsar el  $\text{CO}_2$ . Neutralizar la solución en caliente con NaOH 0,5 N y acidificar de nuevo con ClH 0,5 N, añadiendo de 0,3-0,5 ml de exceso. Diluir a 150 ml, aproximadamente, y calentar de nuevo a ebullición durante unos minutos para expulsar el  $\text{CO}_2$  que pueda quedar. Enfriar a temperatura ambiente con agua fría. Neutralizar la mezcla con NaOH 0,5 N y colocar dentro del vaso los electrodos y agitador magnético.

Comenzar a agitar y ajustar a pH = 6,30 mediante la adición de NaOH 0,25 N o ClH 0,02 N y según se requiera (22.6.3). Una vez que el pH se mantenga a 6,30, se procede a efectuar la lectura en la bureta de NaOH 0,25 N; añadir 20 g de manitol o de cristales de D-sorbitol y efectuar la valoración con sosa 0,25 N hasta obtener nuevamente el pH 6,30 (desconectar el pHmetro dejando la lectura a 6,30 cuando se añade el manitol, conectándolo de nuevo cuando el indicador se acerca a su punto final, continuando añadiéndole cuidadosamente solución patrón de NaOH hasta que la aguja del galvanómetro vuelva a cero). De esta manera, con práctica, se trabaja sin sobrepasar el punto final de la titulación. Cuando se alcanza el punto final, se efectúa de nuevo la lectura de la cantidad de NaOH gastado. Efectuar un blanco con todos los reactivos a excepción de la muestra a analizar.

## 22.5. Cálculos.

Calcular el contenido en B aplicando la siguiente fórmula:

$$\% B = (\text{ml de NaOH gastados en la determinación} - \text{ml blanco}) \cdot (\text{mg B/ml de solución de NaOH}) / 10 \text{ g muestra.}$$

## 22.6. Observaciones.

22.6.1. Para muestras de hasta 0,45 por 100 de contenido en B, pesar 1 g. Para contenidos más altos, pesar menos, pero guardando, aproximadamente, esta proporción.

22.6.2. Si el color de la solución palidece debido a la presencia de nitratos, añadir más rojo de metilo. Por el contrario, si dicho color se oscurece debido a la materia orgánica, se aconseja seguir la neutralización por medio de la técnica del indicador externo.

22.6.3. El pH se debe mantener; de no ocurrir así, sería debido a una expulsión incompleta del  $\text{CO}_2$ .

## 22.7. Referencias.

1. A. O. A. C.: «Official Methods of Analysis». Ed. 1970, página 24/2.103.

## 23. BORO SOLUBLE EN AGUA

## 23.1. Principio.

Consiste en pasar el boro a  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , el cual puede ser valorado con un álcali fuerte, previa exaltación de su acidez por formación de un ión complejo con una sustancia polihidroxilada (manitol o sorbitol).

## 23.2. Material y aparatos.

- 23.2.1. Matraces de 250 ml.
- 23.2.2. Papel de filtro Whatman número 40, o similar.
- 23.2.3. Matraces de 500 ml.
- 23.2.4. Titulador automático.

## 23.3. Reactivos.

- 23.3.1.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .
- 23.3.2. Solución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  al 10 por 100.
- 23.3.3. Coadyuvante de filtración inerte.
- 23.3.4. Ácido clorhídrico (1 + 5).

## 23.4. Procedimiento.

Pesar 2,5 g de muestra y depositarla en un Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 125 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , calentando a ebullición durante diez minutos, filtrando a continuación a través de papel Whatman número 40, o papel similar, recogiéndose el filtrado sobre un Erlenmeyer de 400 ml. Lavar bien el filtro con seis porciones  $\text{H}_2\text{O}$  caliente y diluir hasta 200 ml con  $\text{H}_2\text{O}$ . Calentar el filtrado hasta ebullición. Añadir seguidamente 15 ml de solución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  al 10 por 100 con objeto de precipitar los fosfatos y sulfatos. Añadir a continuación  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  en polvo con cuidado y agitando constantemente hasta conseguir un pH alcalino (usando como indicador fenolftaleína) y añadiendo exceso de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Calentar a ebullición durante sesenta minutos o más para expulsar el  $\text{NH}_3$  (muestras que tengan fuerte color debido a la materia orgánica serán mantenidas en ebullición durante un tiempo más prolongado). Si es necesario, añadir agua con objeto de mantener el volumen de 150 ml.

Añadir una o dos cucharadas de un coadyuvante de filtración inerte y filtrar mediante succión a través de pasta de papel prensado, recogiéndolo sobre un Erlenmeyer de 500 ml. Lavar el precipitado con seis porciones  $\text{H}_2\text{O}$  hirviendo. Añadir ClH (1 + 5) hasta decolorar la fenolftaleína que contenía el filtrado. Añadir rojo de metilo y, mediante sucesivas adiciones de ClH, llevarlo a color rosa. Añadir plato poroso y el agitador, cubrir con vidrio de reloj y calentar durante cinco minutos a ebullición para expulsar el  $\text{CO}_2$ . Enfriar con agua teniendo la precaución de mantenerlo cubierto con el vidrio de reloj. Lavar agitador, vidrio de reloj y Erlenmeyer comenzando la titulación añadiendo solución patrón de NaOH 0,05 N hasta color amarillo del rojo de metilo (23.3.2). Añadir 20 g de D-manitol y 1 ml o más de fenolftaleína, agitar y lavar las paredes del Erlenmeyer. Efectuar la titulación hasta viraje rosa del indicador. Efectuar un blanco repitiendo todas las operaciones efectuadas con la muestra.

## 23.5. Cálculos.

Calcular el contenido en B aplicando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ ml de NaOH } 0,05 \text{ N} = 0,000540 \text{ g de B} = 0,00477 \text{ g Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$$

## 23.6. Referencias.

1. A. O. A. C.: «Official Methods of Analysis». Ed. 1970, página 25/2.016.

## 24. DETERMINACION DEL MAGNESIO

(Por absorción atómica)

## 24.1. Principio.

Consiste en solubilizar el Mg de la muestra con diferentes ácidos, según el tipo de fertilizante, y se mide su absorción a 285,2 nm, refiriéndola a la correspondiente curva patrón.

## 24.2. Material y aparatos.

- 24.2.1. Matraces aforados de 50, 100 y 1.000 ml de capacidad.
- 24.2.2. Espectrofotómetro de absorción atómica.

Longitud de onda: 285,2 nm.

Gases: aire- $\text{C}_2\text{H}_2$ .

Rango: 0,2-2  $\mu\text{g/ml}$ .

## 24.3. Reactivos.

24.3.1. Solución patrón de Mg 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .—Pesar 1.000 mg de metal puro Mg, agregar 50 ml de agua y añadir lentamente 10 ml de ClH. Diluir a un litro.

24.3.2. Solución de lantano al 5 por 100.—50 g de La por litro en ClH, aproximadamente, del 5 por 100. Disolver 58,65 g de  $\text{La}_2\text{O}_3$  en 250 ml de ClH (1 : 1) diluyendo a un litro con agua destilada.

- 24.3.3. ClH.
- 24.3.4. ClH 2 N.
- 24.3.5. ClH 0,5 N.
- 24.3.6. AlH (1 : 1).
- 24.3.7.  $\text{ClO}_4\text{H}$  al 70 por 100 d = 1,67.
- 24.3.8. Ácido fluorhídrico.
- 24.3.9. Metanol.

## 24.4. Procedimiento.

24.4.1. Materiales inorgánicos y mezcla de fertilizantes.

Disolver 1 g de muestra muy bien homogeneizada e introducir en un Erlenmeyer de 150 ml; añadir 10 ml de ClH concentrado. Evaporar la solución a casi sequedad por ebullición. Redisolver el residuo en 20 ml de ClH 2 N, hirviéndolo para su

disolución si es necesario. Filtrar a través de papel rápido recogiendo en un matraz de 100 ml, lavando el papel de filtro y el Erlenmeyer con agua. Medir la absorbancia de esta solución directamente o diluir con ClH 0,5 N para obtener soluciones que entren dentro del rango del aparato.

24.4.2. Fertilizantes que contengan materia orgánica.—Pesar 1 g de muestra y ponerla en una cápsula de porcelana; calentar en la mufla a 500° C durante una hora. Añadir seguidamente 10 ml de ClH y continuar como en 24.4.1.

24.4.3. Fertilizantes que contengan elementos fritos.

Disolver 1 g, o menos, de muestra bien pulverizada en 5 ml de ClO<sub>4</sub>H y 5 ml de FH. Evaporar a ebullición hasta desaparición de los humos densos del ClO<sub>4</sub>H. Diluir cuidadosamente con H<sub>2</sub>O, filtrar y proceder como en 24.4.1. Alternativamente se disuelve la muestra en 10 ml de ClH, 5 ml de FH y 10 ml de metanol. Evaporar a sequedad. Añadir 5 ml de ClH y volver a evaporar. Repetir la adición de ClH y la subsiguiente evaporación. Disolver el residuo como en 24.4.1.

24.4.4. Determinación.—(El P puede interferir al Mg con llama de aire C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Se elimina la interferencia por adición de la solución de lantano a las soluciones preparadas a partir de la muestra y a las soluciones patrones, de manera que las diluciones finales contengan, al menos, 1 por 100 de La).

Ajustar las condiciones óptimas del aparato. Se puede utilizar para evitar diluciones una línea secundaria menos sensible. Leer, por lo menos, cuatro puntos de la curva de calibrado después de medir cada grupo de 6-12 muestras.

Restablecer el cero con agua cada vez que sea necesario. Se debe efectuar una curva de calibrado antes y después de efectuar la medida de cada grupo de muestras. Dibujándose la curva de calibrado con absorciones contra concentraciones expresadas en µg/ml.

#### 24.5. Cálculos.

Porcentaje de elemento = (µg/ml) × (F/peso de la muestra · 10<sup>4</sup>)  
Siendo F = ml de la dilución original.  
x ml de la dilución final/ml de la alícuota tomada.

Esta fórmula se utilizará cuando el volumen original de 100 ml se diluya.

#### 24.6. Referencias.

1. A. O. A. C.: «Official Methods of Analysis». Ed. 1970, página 24/2.097.

### 25. AZUFRE LIBRE

#### 25.1. Principio.

Extracción del azufre con sulfuro de carbono, oxidación del azufre o sulfato y posterior precipitación del sulfato mediante cloruro bórico.

#### 25.2. Material y aparatos.

- 25.2.1. Vaso de 250 ml.
- 25.2.2. Extractor tipo Soxhlet.
- 25.2.3. Horno eléctrico regulable.
- 25.2.4. Baño de agua.
- 25.2.5. Papel Whatman número 42 o similar o filtro Gooch.

#### 25.3. Reactivos.

- 25.3.1. Sulfuro de carbono.
- 25.3.2. Solución saturada de bromo en tetracloruro de carbono.
- 25.3.3. Acido nítrico concentrado.
- 25.3.4. Acido clorhídrico concentrado.
- 25.3.5. Acido clorhídrico al 2 por 100.
- 25.3.6. Solución de azul de bromofenol.—Disolver 0,1 g de azul de bromofenol en 1,5 ml de hidróxido sódico 0,1 N y diluir a 25 ml con agua destilada.
- 25.3.7. Hidróxido amónico concentrado.
- 25.3.8. Solución de cloruro de bario al 10 por 100.—Disolver 100 g de Ba Cl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en 900 ml de agua destilada. Filtrar a través de papel Whatman número 42 o equivalente.

#### 25.4. Procedimiento.

Extraer 1 g de muestra con sulfuro de carbono en el extractor Soxhlet y dejar drenar el cartucho al menos doce veces. Transferir el extracto a un vaso de 250 ml y evaporar el sulfuro de carbono en corriente de aire a temperatura ambiente. Calentar en estufa durante veinte minutos a 60-70° C y dejar enfriar a temperatura ambiente; una vez frío, añadir 10 ml de la solución 25.3.2 y dejar tapado durante veinte minutos, agitando varias veces. Añadir 15 ml de ácido nítrico y dejar tapado de nuevo durante treinta minutos, volviendo a agitar suavemente. Evaporar en baño de agua hirviendo hasta reducir el volumen aproximadamente a 5 ml, añadir 20 ml de ácido clorhídrico y evaporar igualmente hasta reducir el volumen a 5 ml. Añadir 50 ml de agua, filtrar y lavar el filtro con ácido clorhídrico al 2 por 100. Añadir al filtrado dos gotas de azul de bromofenol y después hidróxido amónico hasta el

primer cambio de color. Añadir lentamente ácido clorhídrico hasta reacción netamente ácida más cinco gotas en exceso; diluir a 150 ml con agua, calentar a ebullición y añadir lentamente gota a gota la solución 25.3.8 aproximadamente hasta el 50 por 100 de exceso. Tapar el vaso y ponerlo al baño de agua hirviendo durante una hora como mínimo, enfriar a la temperatura ambiente y filtrar a través de papel de filtro Whatman número 42 o equivalente o de un filtro Gooch previamente desecado por calcinación a 800° C, al menos, durante veinte minutos. Lavar diez veces el filtro con agua caliente, desecar y calcinar a 800° C hasta peso constante.

#### 25.5. Cálculo.

Calcular el contenido del azufre en tanto por ciento.

P = peso, en g, de las cenizas.

P' = peso, en g, de la muestra.

$$\text{Azufre (\%)} = \frac{P \cdot 0,1374}{P'} \times 100$$

#### 25.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. «Official Methods of Analysis», 1975, 2.149, pág. 29.

### 26. AZUFRE TOTAL

#### 26.1. Principio.

Oxidación del azufre o sulfato y posterior precipitación del sulfato con cloruro bórico.

#### 26.2. Material y aparatos.

- 26.2.1. Vaso de 250 ml.
- 26.2.2. Papel Whatman número 42 o similar o filtro Gooch.
- 26.2.3. Baño de agua.
- 26.2.4. Horno eléctrico regulable.

#### 26.3. Reactivos.

- 26.3.1. Solución de cloruro de bario al 10 por 100.—Disolver 100 g de Ba Cl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en 900 ml de agua destilada. Filtrar a través de papel Whatman número 42 o equivalente.
- 26.3.2. Solución de bromo al 10 por 100.—Disolver 10 g de bromo en 90 g de tetracloruro de carbono y agitar hasta homogeneidad. Guardar en frasco con tapón de vidrio.
- 26.3.3. Acido nítrico concentrado.
- 26.3.4. Acido clorhídrico concentrado.
- 26.3.5. Solución de nitrato de plata al 1 por 100.

#### 26.4. Procedimiento.

26.4.1. Preparación de la muestra.—Pesar una cantidad de muestra que contenga entre 50-150 mg de azufre y colocarla dentro de un vaso de 250 ml de capacidad. A continuación añadir 20 ml de la solución 26.3.2. Mezclar, agitando el vaso a intervalos de cinco minutos, durante media hora. Añadir 15 ml de ácido nítrico y mezclar de la misma forma que anteriormente. Evaporar en baño de agua hirviendo hasta reducir el volumen a 1-2 ml. Añadir 15 ml de ácido clorhídrico y 10 ml de H<sub>2</sub>O y evaporar hasta sequedad en baño de agua. Añadir 10 ml de ácido clorhídrico y 50 ml de H<sub>2</sub>O, calentarlo hasta ebullición y hervir durante cinco minutos, a continuación filtrar a través de papel Whatman número 42 o equivalente. Lavar el papel con 20 ml de agua caliente, efectuando esta operación diez veces.

26.4.2. Determinación.—A partir del filtrado obtenido según 26.4.1, calentar hasta ebullición y añadir 5-6 gotas de la solución 26.3.1. Pasado un minuto, añadir lentamente una cantidad de la solución 26.3.1, equivalente al contenido supuesto de azufre (1 ml = 0,014 g de S), más 5 ml en exceso. Llevar a ebullición suave durante una hora; pasado este tiempo, retirar y dejar reposar durante quince-veinte minutos hasta la sedimentación del precipitado, a continuación filtrar a través de un filtro de Gooch, previamente desecado por ignición y tarado, o papel Whatman número 42 o equivalente. Lavar con agua caliente hasta que 10 ml del filtrado no precipite al añadir 3 ml de nitrato de plata al 1 por 100. A continuación desecar e incinerar a 800° C hasta peso constante.

#### 26.5. Cálculo.

Calcular el contenido en azufre en tanto por ciento.

P = peso, en g, de las cenizas.

P' = peso, en g, de la muestra.

$$\text{Azufre (\%)} = \frac{P \cdot 0,1374}{P'} \times 100$$

#### 26.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. «Official Methods of Analysis 1975, 2.148, pág. 39.

## 27. AZUFRE DE SULFATOS

## 27.1. Principio.

Solubilización del sulfato en medio ácido, y precipitación con cloruro bórico. Aplicación a fertilizantes compuestos, sulfato potásico y sulfato magnésico.

## 27.2. Material y aparatos.

- 27.2.1. Vasos de 250 ml.
- 27.2.2. Papel Whatman número 42, o similar, o filtro Gooch.
- 27.2.3. Baño de agua.
- 27.2.4. Horno eléctrico regulable.

## 27.3. Reactivos.

- 27.3.1. Solución de cloruro de bario al 10 por 100.—Disolver 100 g de  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  en 900 ml de agua destilada. Filtrar a través de papel Albet número 242 o equivalente.
- 27.3.2. Ácido clorhídrico concentrado.
- 27.3.3. Solución de nitrato de plata al 1 por 100.

## 27.4. Procedimiento.

27.4.1. Preparación de la muestra.—Pesar con exactitud de 0,1 mg una cantidad de muestra que contenga 0,1 a 0,2 g de  $SO_4$ , pasar a un vaso de 250 ml y añadir 25 ml de ácido clorhídrico concentrado y 50 ml de  $H_2O$ . Hervir durante diez minutos.

A continuación, filtrar a través de papel Whatman número 42 o equivalente. Lavar con unas diez porciones de 10 ml de agua caliente.

27.4.2. Determinación.—El filtrado obtenido se calienta hasta ebullición y se añaden cinco-seis gotas de solución 27.3.1. Pasado un minuto añadir lentamente una cantidad de solución 27.3.1, equivalente al contenido supuesto de azufre (1 ml = 0,042 g

de  $SO_4$ ) mas 5 ml en exceso. Llevar a ebullición suave durante una hora, pasado este tiempo retirar y dejar reposar durante quince-veinte minutos hasta la sedimentación del precipitado, a continuación filtrar a través de un filtro Gooch, previamente desecado por calcinación y tarado, o papel Albet número 242 o equivalente. Lavar con agua caliente hasta que 10 ml de filtrado no precipiten al añadirle 3 ml de la solución 27.3.3. A continuación, desecar y calcinar a  $800^\circ C$  hasta peso constante.

## 27.5. Cálculo.

Calcular el contenido en azufre o sulfato en tanto por ciento.

P = peso, en g, de las cenizas.

P' = peso, en g, de la muestra.

$$\% SO_4 = \frac{P \cdot 0,4115 \cdot 100}{P'}$$

$$\% S = \frac{P \cdot 0,1374 \cdot 100}{P'}$$

## 27.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. «Official Methods of Analysis 1975, 2.148, pág. 29.

## 28. CLORUROS

(Solubles en agua)

## 28.1. Principio.

Solubilización de los cloruros en agua y subsiguiente valoración con nitrato de plata en presencia de cromato potásico.

## 28.2. Material y aparatos.

- 28.2.1. Material necesario para filtración.
- 28.2.2. Matraz aforado de 250 ml de capacidad.
- 28.2.3. Vaso de precipitados de 150 ml de capacidad.
- 28.2.4. Material necesario para volumetría.

## 28.3. Reactivos.

- 28.3.1. Solución de nitrato de plata.—Disolver 5 g de nitrato de plata recristalizado y enrasar con agua a 1.000 ml. Titular dicha solución con cloruro sódico, de manera que 1 ml de la solución de nitrato de plata equivalga a 0,001 g de cloro.
- 28.3.2. Indicador de cromato potásico al 5 por 100 (p/v).—Disolver 5 g de cromato potásico en 100 ml de agua.

## 28.4. Procedimiento.

Pesar 2,5 g de muestra y ponerla sobre un papel de filtro de 11 cm, lavar a continuación con sucesivas porciones de agua hirviendo hasta su completo lavado; aproximadamente se emplean unos 250 ml de agua.

Recoger el filtrado sobre un matraz aforado de 250 ml, enfriar y enrasar con agua.

Tomar 50 ml de filtrado y llevarlos a un vaso de precipitados de 150 ml de capacidad, añadir 1 ml indicador de cromato potásico al 5 por 100 (p/v), ajustar el pH entre 6 y 7 y valorar con la solución de nitrato de plata (28.3.1.) hasta color rojo constante de cromato de plata.

## 28.5. Cálculos.

Calcular el contenido en cloro expresado en gramos:

$$Cl^- \text{ en g} = V \cdot 0,001.$$

Siendo:

V = volumen en ml gastados de la solución de nitrato de plata.

## 28.6. Referencias.

1. Association of Official Analytical Chemists. «Official Methods of Analysis». Ed. 1975, 39, pág. 24.

## 29. CINCO

## 29.1. Principio.

Solubilizar el Zn de la muestra con diferentes ácidos, según el tipo de fertilizante, y medir su absorción a 213,8 nm, refiriéndola a la correspondiente curva patrón.

## 29.2. Material y aparatos.

- 29.2.1. Vaso de precipitado de 150 ml de capacidad.
- 29.2.2. Matraces aforados de 100 y 1.000 ml de capacidad.
- 29.2.3. Espectrofotómetro de absorción atómica.

Longitud de onda: 213,8 nm.

Gases: aire-acetileno.

Rango: 0,5-5 ppm.

29.2.4. Cápsula o crisol de platino.

29.2.5. Cápsula o crisol de porcelana.

## 29.3. Reactivos.

- 29.3.1. Solución patrón de cinc de 1.000 ppm.—Disolver en 10 ml de ácido clorhídrico 6 N, 1.000 g de cinc metal y llevar a 1.000 ml con agua destilada.

29.3.2. Ácido clorhídrico.

29.3.3. Ácido clorhídrico 6 N.

29.3.4. Ácido clorhídrico 2 N.

29.3.5. Ácido clorhídrico 0,5 N.

29.3.6. Ácido fluorhídrico.

29.3.7. Ácido perclórico.

29.3.8. Metanol.

## 29.4. Procedimiento.

29.4.1. Materiales inorgánicos y fertilizantes compuestos.—Disolver 1 g de muestra bien molida en 10 ml de ácido clorhídrico utilizando un vaso de precipitado de 150 ml. Someter a ebullición hasta casi sequedad, sin dejar que la evaporación sea completa. Redisolver el residuo en 20 ml de ácido clorhídrico 2 N calentando a ebullición si es necesario. Filtrar, a través de papel de filtrado rápido, sobre un matraz de 100 ml, lavando completamente el papel y el residuo con agua destilada. Medir la absorción de la disolución directamente, o en caso necesario diluir con ácido clorhídrico 0,5 N hasta conseguir una solución dentro del rango de la curva de calibrado.

29.4.2. Fertilizantes conteniendo materia orgánica.—Pesar 1 g de muestra en una cápsula de porcelana y calentar en una mufa en corriente de aire durante una hora a  $300^\circ C$ ; romper la pasta y disolver en 10 ml de ácido clorhídrico como en 29.4.1.

29.4.3. Fertilizantes fritos que contengan microelementos.—Disolver 1 g de muestra bien molida en 5 ml de ácido perclórico y 5 ml de ácido fluorhídrico. Calentar a ebullición hasta aparición de humos densos de ácido perclórico, diluir cuidadosamente con agua destilada, filtrar y proceder como en 29.4.1.

Alternativamente también se puede disolver la muestra en 10 ml de ácido clorhídrico, 5 ml de ácido fluorhídrico y 10 ml de metanol. Evaporar a sequedad. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico y evaporar. Repetir la adición de ácido clorhídrico y la evaporación. Disolver el residuo como en 29.4.1.

## 29.5. Cálculos.

$$\% Zn = \frac{L \cdot F}{P} \cdot 10^{-4}$$

Siendo:

L = valor, en ppm, obtenido en la curva patrón.

P = peso, en g, de la muestra.

F = ml de la dilución original  $\times$  ml de la dilución final/ml de alícuota. Este factor se aplicará en caso de que se diluya el volumen original de 100 ml.

## 29.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. Ed. 1975, páginas 22-23.

## 30. COBRE

## 30.1. Principio.

Solubilizar el Cu de la muestra con diferentes ácidos, según el tipo de fertilizante, y medir su absorción a 324,7 nm refiriéndola a la correspondiente curva patrón.

## 30.2. Material y aparatos.

- 30.2.1. Vaso de precipitado de 150 ml de capacidad.  
30.2.2. Matraces aforados de 100 y 1.000 ml de capacidad.  
30.2.3. Espectrofotómetro de absorción atómica.

Longitud de onda: 324,7 nm.

Gases: aire-acetileno.

Rango: 2-20 ppm.

30.2.4. Cápsula o crisol de platino.

30.2.5. Cápsula o crisol de porcelana.

## 30.3. Reactivos.

30.3.1. Solución patrón de cobre de 1.000 ppm.—Disolver en la mínima cantidad posible de ácido nítrico concentrado 1.000 g de cobre metal y añadir 5 ml de ácido clorhídrico concentrado. Evaporar sin llegar a total sequedad y diluir a 1.000 ml con ácido clorhídrico 0,1 N.

30.3.2. Ácido clorhídrico.

30.3.3. Ácido nítrico.

30.3.4. Ácido clorhídrico 2 N.

30.3.5. Ácido clorhídrico 0,1 N.

30.3.6. Ácido clorhídrico 0,5 N.

30.3.7. Ácido fluorhídrico.

30.3.8. Ácido perclórico.

30.3.9. Metanol.

## 30.4. Procedimiento.

30.4.1. Materiales inorgánicos y fertilizantes compuestos (como en 29.4.1).

30.4.2. Fertilizantes conteniendo materia orgánica (como en 29.4.2).

30.4.3. Fertilizantes fritos que contengan microelementos (como en 29.4.3).

## 30.5. Cálculos.

$$\% \text{ Cu} = \frac{L \cdot F}{P} \cdot 10^{-4}$$

Siendo:

L = ppm leídos en la curva patrón.

P = peso, en g, de la muestra.

F = ml de la dilución original  $\times$  ml de la dilución final/ml de alicuota. Este factor se aplicará en caso de que se diluya el volumen original de 100 ml.

## 30.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. 49 Ed. 1975, páginas 22-23.

## 31. SODIO

## 31.1. Principio.

Determinación del sodio por fotometría de llama.

## 31.2. Material y aparatos.

31.2.1. Fotómetro de llama y accesorios.

31.2.2. Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1.000 ml de capacidad.

## 31.3. Reactivos.

31.3.1. Solución de oxalato amónico.—Añadir a 40 g de oxalato amónico agua destilada hasta 1.000 ml y disolver.

31.3.2. Indicador rojo de metilo.—Disolver 0,2 g de rojo de metilo en 100 ml de alcohol.

31.3.3. Cloruro sódico.—Desecar durante dos horas a 105° C.

31.3.4. Ácido nítrico al 1 por 100 (v/v).

## 31.4. Procedimiento.

31.4.1. Preparación de la solución de la muestra de fertilizantes compuestos sulfato magnésico y sulfato potásico.

Pesar 2,5 g de muestra (para contenidos menores del 4 por 100 en sodio) o 1,25 g (para contenidos entre 4-20 por 100). Introducir en un matraz aforado de 150 ml de capacidad, añadir 125 ml de agua y 50 ml de la solución 31.3.1; llevar a continuación a ebullición durante treinta minutos, dejar enfriar y enrasar con agua, agitar y filtrar. Transferir a continuación 25 ml (para contenidos menores del 4 por 100 en sodio) o 10 ml (para contenidos comprendidos entre 4 y 20 por 100 en sodio) de dicha solución a un matraz aforado de 250 ml de capacidad, enrasar con agua y agitar. Medir a continuación refiriendo la lectura a la curva patrón 31.4.2.1 ó 31.4.2.2, representadas en emisión y concentraciones.

## 31.4.2. Preparación de la curva patrón.

31.4.2.1. Solución patrón para muestras con contenidos igual o superiores al 1 por 100 en sodio.—Disolver 1,2716 g de cloruro sódico en agua y enrasar a 500 ml; esta solución corresponde a 1.000 ppm de sodio. Tomar alicuotas de la solución patrón de manera que cubran un rango comprendido entre 0 y 40 ppm con intervalos de 5 ppm.

31.4.2.2. Solución patrón para muestras con contenidos inferiores al 1 por 100 de sodio.—Proceder como en 31.4.2.1, pero cubriendo un rango comprendido entre 0 y 10 ppm con intervalos de 2 ppm.

## 31.5. Cálculo.

Calcular el contenido en tanto por ciento de sodio.

31.5.1. Para muestras con contenidos comprendidos entre 0 y 4 por 100 en sodio.

$$\% \text{ Na} = \frac{A}{10}$$

A = valor obtenido en la curva patrón expresado en ppm

31.5.2. Para muestras con contenidos comprendidos entre 4 y 20 por 100 en sodio.

$$\% \text{ Na} = \frac{B}{2}$$

B = valor obtenido en la curva patrón expresado en ppm.

## 31.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. «Official Methods of Analysis». 1975. 50. 2.134, pág. 29.

## 32. HIERRO

## 32.1. Principio.

Solubilizar el Fe de la muestra con diferentes ácidos, según el tipo de fertilizante, y medir su absorción a 248,3 nm, refiriéndola a la correspondiente curva patrón.

## 32.2. Material y aparatos.

32.2.1. Vaso de precipitado de 150 ml de capacidad.

32.2.2. Matraz aforado de 100 ml de capacidad.

32.2.3. Espectrofotómetro de absorción atómica.

Longitud de onda: 248,3 nm.

Gases: aire-acetileno.

Rango: 2-20 ppm.

32.2.4. Cápsula o crisol de platino.

32.2.5. Cápsula o crisol de porcelana.

## 32.3. Reactivos.

32.3.1. Solución patrón de Fe de 1.000 ppm.—Disolver calentando a ebullición 1.000 g de Fe puro en 30 ml de ClH 6 N, agregado en sucesivas proporciones. Diluir hasta 1.000 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Diluir con ClH 0,5 N preparando cuatro patrones, a menos, dentro del rango de detección.

32.3.2. Ácido clorhídrico.

32.3.3. Ácido clorhídrico 6 N.

32.3.4. Ácido clorhídrico 2 N.

32.3.5. Ácido clorhídrico 0,5 N.

32.3.6. Ácido fluorhídrico.

32.3.7. Ácido perclórico.

32.3.8. Metanol.

## 32.4. Procedimiento.

32.4.1. Materiales inorgánicos y fertilizantes compuestos (como en 29.4.1).

32.4.2. Fertilizantes conteniendo materia orgánica (como en 29.4.2).

32.4.3. Fertilizantes fritos que contengan microelementos (como en 29.4.3).

## 32.5. Cálculos.

$$\% \text{ Fe} = \frac{L \cdot F}{P} \cdot 10^{-4}$$

Siendo:

L = ppm leídos en la curva patrón.

P = peso, en g, de la muestra.

F = ml de la dilución original  $\times$  ml de la dilución final/ml de alicuota. Este factor se aplicará en caso de que se diluya el volumen original de 100 ml.

## 32.6. Referencias.

1. Association of Official Agricultural Chemists. «Official Methods of Analysis». Ed. 1975. 42, págs. 22-23.

(Continuará.)