Afdeling OCON 1984-04-05

RAPPORT 84.31 Pr.nr. 404.0301

Onderwerp: Ontwikkelen van een methode voor de bepaling van een tracerverbinding voor inwerkingstechnieken in grond.

Verzendlijst: direkteur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. OCON (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (Tuinstra), Werkgroep Verbetering Bodemapplicatietechnieken (12x).

Afdeling Organische Contaminanten en Bestrijdingsmiddelen 1984-04-05

RAPPORT 84.31 Pr.nr. 404.0301

Projekt: Het bevorderen van optimaal gebruik en het terugdringen van gebruik en emissie van bestrijdingsmiddelen
Onderwerp: Ontwikkelen van een methode voor de bepaling van een tracerverbinding voor inwerkingstechnieken in grond

Bijlage: Intern Analysevoorschrift nr. 325

Doel:
1. Het vinden van een geschikte tracer, welke het mogelijk moet maken op een snelle en dus goedkope manier na te gaan hoe de inbreng van pesticide in de grond met behulp van een daartoe geschikte machine verloopt.
2. Het vinden van een snelle en eenvoudige analysemethode voor deze tracer.

Samenvatting:
Er zijn verschillende grondsoorten onderzocht in combinatie met diverse tracers (nl. fluoride c.q. diverse kleurstoffen) en extractievloeistoffen.

Conclusie:
- Fluoride als tracer is niet geschikt. De opwerking is tijdrovend. Belangrijker is dat de toe te passen hoeveelheid fluoride erg groot moet zijn voor een bruikbaar resultaat (250-2500 kg per hectare).

- Het isoleren van kleurstoffen met behulp van kolomchromatografie is niet praktisch toepasbaar.

- Het gehalte aan organische stof is van grote invloed gebleken. Over het algemeen geldt hoe hoger het aandeel organische stof in de grond is, hoe sterker de kleurstof geadsorbeerd wordt. Lissamine Rhodamine B blijkt het best extraheerbaar.

- Als meest universele extractiemiddel is methanol het best toepasbaar.

- Een verhouding van 1 µg kleurstof per gram grond blijkt in de praktijk goed te voldoen.
  Resulterende hectarebelasting: ca. 10 kg kleurstof.

- Klaren met calciumchloride heeft geen zin: eenmaal geadsorbeerde kleurstof wordt met de grond mee neergeslagen. Het is tevens een tijdrovend proces (ca. 1 nacht).

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Medewerkers/Samenstellers: J.M.P. van Trijp, W.A. Traag
Projektleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Inleiding

Door een intensiever gebruik van de grond gepaard met een gespecialiseerde teelt neemt de kans toe op allerlei bodemziekten. Deze kunnen bestaan uit insecten, schimmels en aaltjes. Het is dus noodzakelijk voor een goed produkt deze ziekten afdoende te bestrijden.

Er staan hiervoor diverse technieken ter beschikking.
Stomen (milieuvriendelijk, doch slechts toepasbaar op beperkte oppervlakken - kasteelt, door hoge energiekosten zeer duur).
Chemische middelen: fumigantia (als gas in de bodem werkzaam - b.v. methylbromide) en middelen die door middel van contact met het organisme hun werking uitvoeren (fungistatica). Deze laatste groep moet ingewerkt worden in de bodem. Dit kan gebeuren in de vorm van pellets (strooien) of als vloeistof (spuiten, vernevelen).
Het is voor deze laatste groep vooral belangrijk te weten hoe de verdeling (concentratie) in de bodem is. Voor het bepalen van deze concentraties zijn verschillende suggesties gedaan: insecticide zelf bepalen, werken met radioaktief gemerkte stoffen en het gebruik van kleurstoffen en/of zouten.
Insecticides en radioaktieve tracers vallen al snel op wegens het intrinsiek gevaarlijk zijn van deze stoffen, alsmede het moeten toepassen van geavanceerde apparatuur met de bijbehorende arbeidsintensieve opwerking.

In de praktijk blijken de kleurstoffen het meest toegepast te worden (4, 6).
Het doel van dit onderzoek is uit te zoeken voor welke grond welke kleurstof het meest geschikt is, en welk extractievloeistof het best geëigend is voor deze combinatie.
Het is de bedoeling dat de testgegevens gebruikt worden bij een simulatieproef voor inwerking van insecticiden in grond, in het bijzonder de toplaag (ca. 10 cm). Als randvoorwaarden gelden dat de opwerking zo simpel en zo snel mogelijk moet zijn zodat een groot monsteraanbod in korte tijd verwerkt kan worden, zonder gebruik te hoeven maken van hoog gekwalificeerd personeel.

Het monstermateriaal is verkregen van het Instituut voor Onderzoek van Bestrijdingsmiddelen (IOB) te Wageningen. Door het IOB is tevens een literatuurstudie gedaan omtrent het gedrag en toepasbaarheid van kleurstoffen en zouten (Fluoride) als tracer. Deze studie is als basis genomen voor dit onderzoek.

Monstermateriaal en apparatuur

Voor het onderzoek stonden 10 monsters grond ter beschikking, zie tabel 1.

Als mogelijke tracer werden de volgende stoffen onderzocht.

Rhodamine WT	Du Pont
Lissamine PE	Chroma Gesellschaft Schmid und Co, Stuttgart
Rhodamine B	Aldrich/Janssen Chimica
Lissamine Rhodamine B	Koch Light Laboratories Ltd.

Natriumfluoride van pro analyse kwaliteit.

Apparatuur:

Schudapparaat	: DESAGA.
Fluorescentiespectrofotometer	: Perkin Elmer MPF-2A met 1 cm cuvetten.
Ion selectieve electrode	: ORION 94-09 (Mettler), gekoppeld aan een digitale pH-meter, gethermostateerd op 25°C.

Overzicht en eigenschappen diverse kleurstoffen en fluoride

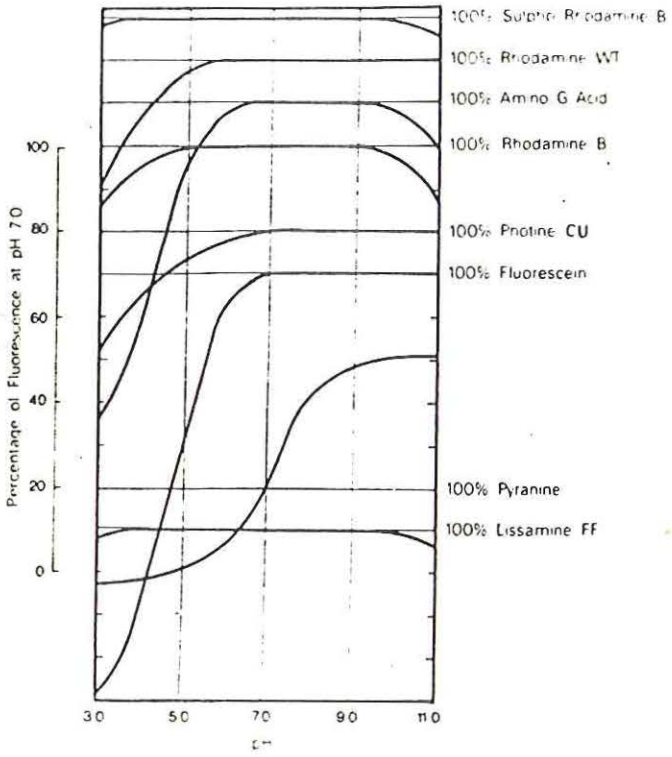
De diverse eigenschappen van de kleurstoffen zijn door het IOB aan de hand van een literatuurstudie samengebracht in een overzicht, zie tabel 2.

Een belangrijke eigenschap, fluorescentie, kan gebruikt worden om zeer specifiek de kleurstof te meten. Bij het gebruik van deze grootheid spelen een aantal factoren een rol die de mate van fluorescentie sterk kunnen beinvloeden.

Voor het bepalen van de fluorideconcentratie is gebruik gemaakt van een ion selectieve electrode. Hier is de temperatuur van significante invloed op de te meten waarde.

Fluorescentie

De fluorescentie van de kleurstoffen wordt voornamelijk beïnvloed door de temperatuur en de pH. Dit wordt voor de pH duidelijk aan de hand van grafiek 1.



Effect of *p*H on fluorescence of the tracer dyes.

Grafiek 1.

Bij pH variaties tussen pH 4,0 en pH 10,0 worden geen significante problemen ondervonden voor Lissamine FF en Sulpho Rhodamine B. Rhodamine B en Rhodamine WT fluorescentie wordt sterk beinvloed indien de pH 5,0 of lager is (4). Generaliserend kan gezegd worden dat het pH traject 7,0 - 9,0 geen effect heeft op de mate van fluoresceren (uitz. pyranine).

De fluorescentie-intensiteit varieert ook met de temperatuur. Deze variatie is echter van kleurstof tot kleurstof verschillend. De kleurstofafhankelijke correctie op de invloed van de temperatuur laat zich als volgt beschrijven (4).

$$F_e = F_s \cdot e^{n(t_s - t)}$$

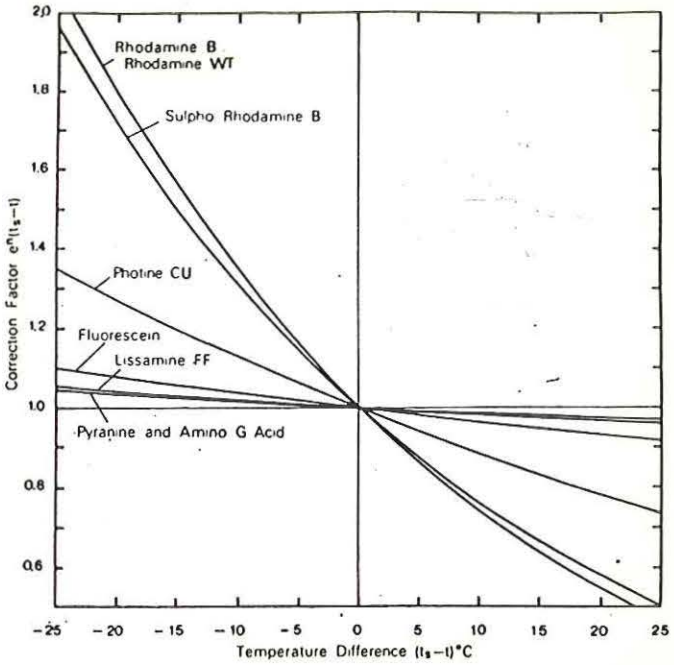
F_s = fluorescentie bij standaardtemperatuur t_s (0°C).
F_e = fluorescentie bij monstertemperatuur t
n = kleurstofafhankelijke exponent (zie tabel 3).

Grafisch worden verschillende correctiecurves in beeld gebracht in grafiek 2.

Tabel 3

Temperature Exponents for the Tracer Dyes

Dye	Temperature Exponent, °C^{-1}
Amino G acid	−0.0019
Photine CU	−0.012
Fluorescein	−0.0036
Lissamine FF	−0.0020
Pyranine	−0.0019
Rhodamine B	−0.027
Rhodamine WT	−0.027
Sulpho rhodamine B	−0.029



Temperature correction curves for the tracer dyes.

Grafiek 2

Fluorideconcentratie

De temperatuur is tevens van significante invloed op de resultaten van de meting. Bij gebruik van de ORION fluoride electrode 94-09 of 96-09 wordt de fluorideconcentratie bepaald met de standaardcalibratiemethode, dat wil zeggen grafisch met behulp van een ijklijn. Dit vereist echter wel dat de temperatuur tussen standaarden en monsters niet meer dan 1 à 2 graden mag verschillen (12).

De concentratie wordt beschreven door:

$$C_X = C_S \times 10^{\Delta E/S}$$

C_X = concentratie onbekende oplossing

C_S = concentratie standaardoplossing

ΔE = het verschil tussen de potentiaal in de onbekende oplossing en de potentiaal in de standaardoplossing

S = electrode slope - de verandering in electrodepotentiaal per 10-voudige verandering in concentratie.

S in deze formule is sterk afhankelijk van de temperatuur. Het zal nu duidelijk zijn dat een kleine verandering in S een grote verandering van C_x teweeg zal brengen. Om dit te voorkomen moet de temperatuur van de te meten oplossingen dus constant gehouden worden (thermostaat).

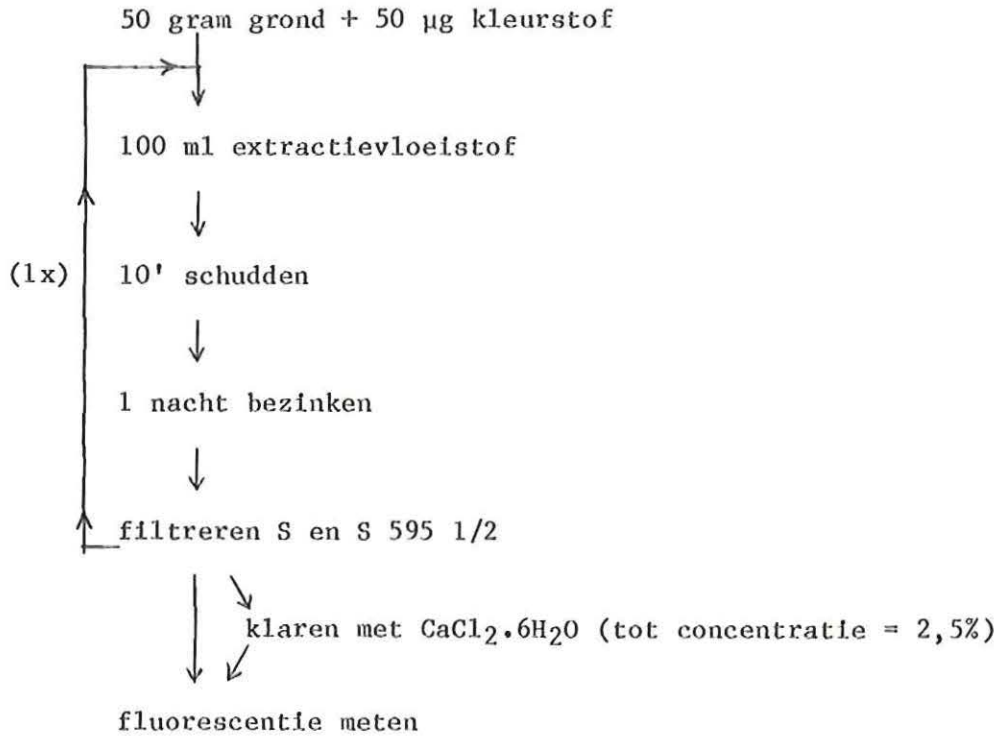
Principe en methode

Aan een zekere hoeveelheid grond wordt de tracer toegevoegd. Door toepassen van verschillende extractievloeistoffen wordt het extractierendement bepaald van de combinatie grond-tracer-extractievloeistof.
In eerste instantie is een mengsel van water/methanol, in de verhouding 80/20, toegepast.

Er is zoveel mogelijk een vaste verhouding grond/kleurstof gebruikt en wel op een niveau zodat de fluorescentie lineair met de concentratie verandert en welke in de praktijk goed bruikbaar is. Een acceptabel niveau leek 1 µg kleurstof/g grond te zijn. Dit komt overeen met ca. 10 kg kleurstof per hectare.

Teneinde na te gaan welke parameters van invloed zijn op het extractierendement zijn de volgende procedures gevolgd.

Procedure 1



Procedure 2

Naast de hiervoor beschreven procedure is ook eenmaal gewerkt met kolomchromatografie.
In een kolom met een lengte van 50 cm, een inwendige middellijn van 3 cm en voorzien van een uitloopkraan werd 100 g grond + 1000 µg Lissamine PE gebracht. De kolom werd geelueerd met 200 ml methanol, het eluaat werd in fracties van 25 ml opgevangen en fluorometrisch onderzocht.

Procedure 3

Tevens is geprobeerd of NaF als tracer geschikt is.
In de door McQuaker en Gurney (13) beschreven methode wordt het totaal fluor gemeten in de grond. Na ontsluiten wordt een pH traject doorlopen hetgeen resulteert in de verwijdering van de kationen.
Het ontsluiten van de grond is bij het gebruik van fluor als tracer niet noodzakelijk, echter wel de verwijdering van de interferende kationen (aluminium en ijzer). Voor de meting is gebruik gemaakt van een Orion-pF electrode (94-09-Mettler), aanwezig op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO). Deze electrode bleek lineair te zijn tussen 10^{-5} en 10^{-2} fluor, bij constante temperatuur (25°C). Door een TISAB-buffer (Total Ionic Strenght Adjustment Buffer) te gebruiken wordt d.m.v. complexvorming storingen van kationen voorkomen.

Resultaten/Discussie

Van de gebruikte kleurstoffen zijn in diverse extractievloeistoffen de optimale excitatie en emissiegolflengte bepaald. Zie tabel 4.
De resultaten verkregen met diverse toegepaste combinaties grond/tracer/extractievloeistof zijn ondergebracht in de tabellen 5 t/m 9.

- Het blijkt (zie tabel 5) dat bij toepassing van Rhodamine WT een hoog gehalte organische stof voor H_2O/MeOH een laag extractierendement oplevert. De beste resultaten worden verkregen met grond afkomstig van Espel en De Waag met zeer lichte en lichte zavel. De mate van de troebeling van het supernatant is door quenching (uitdoving) van de fluorescentie van invloed op het extractierendement. Methanolextractie geeft een tegengesteld beeld te zien: een hoger extractierendement naarmate het gehalte organische stof hoger is. Maximale rendementen met zware dalgrond en zand.

- Lissamine PE geeft voor zowel de H_2O/MeOH alswel de MeOH-extractie eenzelfde tendens (zie tabel 6). Voor beide extractiemiddelen geldt dat naarmate het aandeel organische stof in de grond lager is het extractierendement verbetert. MeOH extractie wordt echter minder beinvloed door het organisch stofgehalte, dit in tegenstelling tot H_2O/MeOH extractie.

- De zandgrond van Droevendaal is gebruikt voor verdere experimenten (zie tabel 7).
  Een tweevoudige extractie met MeOH verbetert het rendement aanzienlijk. Nadelig is echter de grote variatiecoefficient waardoor de gevonden gehalten aan nauwkeurigheid inboeten.
  Andere extractievloeistoffen blijken voor deze grond en Lissamine PE niet toepasbaar. Enerzijds een laag extractierendement (acetonitril, 2-propanol en aceton) anderzijds een zeer hoge "background"-fluorescentie (cyclohexaan en ethylacetaat). Tetra en chloroform blijken niet in staat Lissamine PE uit de vochtige grond te extraheren.

- Met de lichte zavel van De Waag zijn dezelfde experimenten uitgevoerd (zie tabel 8) als met de Droevendaal-zandgrond. Een tweevoudige MeOH extractie is slechts in simplo uitgevoerd, zodat omtrent de reproduceerbaarheid niets gezegd kan worden.
  Verder kan voor deze grond een analoog beeld geschetst worden. Het extractierendement van acetonitril en 2-propanol ligt wel op een hoger peil. Dit is echter een onvoldoende verbetering.

- Omdat uit de metingen blijkt dat ethylacetaat een grote hoeveelheid fluorescerende stoffen extraheert, is geprobeerd of Lissamine PE geextraheerd kan worden met water uit de ethylacetaat. De kleurstof blijkt voor 100% met water geextraheerd te kunnen worden. De extractierendementen bleken echter bij zowel de grond uit de Waag als wel Droevendaal $< 1,5\%$ te zijn. Het vocht van de grond voorkomt waarschijnlijk de eerste extractie van de kleurstof met ethylacetaat. Een extractie met aan water verzadigde ethylacetaat gaf ook geen verbetering te zien (rendement $< 1\%$). Ethylacetaat is dus niet geschikt gebleken.

- Kolomextractie van Lissamine PE
  Procedure 2. het extractierendement bedraagt ongeveer 50%. Hiervan wordt de bulk (ca. 30%) in de eerste 25 ml geextraheerd. De totale elutie met 200 ml methanol duurt ca. 1 nacht.
  Het lage rendement gepaard aan een lange elutietijd maken deze methode ongeschikt voor verder onderzoek. In de verdere loop van het onderzoek is hier dan ook geen aandacht meer aan besteed.

- De grond uit Assen is gebruikt om het gedrag van Rhodamine B, Lissamine Rhodamine B en NaF te bepalen (zie tabel 9).
  Het blijkt dat Rhodamine B een hoge graad van adsorbtie vertoont. Volgens Smart en Laidlaw (4) vindt dit een verklaring in het feit dat Rhodamine B van kationische aard is. De andere onderzochte kleurstoffen zijn van anionische aard, hetgeen een hogere weerstand geeft tegen adsorbtie aan humusachtige gronden.
  De recovery van Rhodamine B wordt nauwelijks verbeterd indien $CaCl_2.6H_2O$ wordt toegevoegd (uiteindelijke concentratie 2,5%). Dit is een verdere aanwijzing voor het feit dat we met adsorbtie te maken hebben.
  In tegenstelling tot Rhodamine B verbetert het rendement van de H_2O/MeOH extractie bij Lissamine Rhodamine B wel aanzienlijk bij toepassing van $CaCl_2$. De adsorbtie speelt hier duidelijk een kleinere rol. Als nadeel moet vermeld worden dat het klaren met $CaCl_2$ een nacht duurt.
  De extractie met methanol geeft ook nu het hoogste rendement. Indien de pH van de grond constant wordt gehouden (pH 5,5) dan kan er met heldere supernatanten gewerkt worden. Verhoging van de pH (tot pH 9) heeft tot resultaat dat het supernatant bruin blijft, met quenching van de fluorescentie tot gevolg.
  De methode (procedure 3) waarbij NaF als tracer is toegepast bleek goede reproduceerbare resultaten te geven (gem. 67%, stand. dev. 1%, var. coeff. 0,02%, n = 4). Als nadelen gelden echter de enigszins bewerkelijke opwerkingen. Gezien de lineariteit van de bepaling (10^{-2} - 10^{-5} M F) is het noodzakelijk dat het te meten extract een eindconcentratie heeft van 10^{-3} tot 10^{-4} M F. Per gram grond moet daarom 25-250 µg NaF toegevoegd worden. Dit komt neer op een belasting per hectare van 250-2500 kg. Dit is in de praktijk niet zinvol, nog afgezien van eventuele fluoride effecten op het gewas.

Conclusie

- Fluoride als tracer is niet geschikt. De opwerking is tijdrovend. Belangrijker is dat de toe te passen hoeveelheid fluoride erg groot moet zijn voor een bruikbaar resultaat (250-2500 kg per hectare).

- Het isoleren van kleurstoffen met behulp van kolomchromatografie is niet praktisch toepasbaar.

- Het gehalte aan organische stof is van grote invloed gebleken. Over het algemeen geldt hoe hoger het aandeel organische stof in de grond is, hoe sterker de kleurstof geadsorbeerd wordt. Lissamine Rhodamine B blijkt het best extraheerbaar.

- Als meest universele extractiemiddel is methanol het best toepasbaar.

- Een verhouding van 1 µg kleurstof per gram grond blijkt in de praktijk goed te voldoen.
  Resulterende hectarebelasting: ca. 10 kg kleurstof.

- Klaren met calciumchloride heeft geen zin: eenmaal geadsorbeerde kleurstof wordt met de grond mee neergeslagen. Het is tevens een tijdrovend proces (ca. 1 nacht).

Aanbevelingen

Aangezien Lissamine Rhodamine B nog het best extraheerbaar is van een "moeilijke" grond (hoog organische stofgehalte) lijkt het de meest ideale tracer voor gronden met een zeer laag percentage organische stof. In aanmerking komen dan de (zeer) lichte zavels.

Te Lisse bevindt zich een proefgebied met lichte zavel. Het voorstel is nu Lissamine Rhodamine B uitvoerig met deze grond te testen volgens procedure 1.

Literatuuropgave

1) Reynolds, E.R.C. (1966), Journal of Soil Science 17,1: 127-132.

2) Corey, J.C. (1968), Soil Science.

3) André, J.C. et Molinardi J. (1976), Journal of Hydrology 30: 257-285.

4) Smart, P.L. and Laidlaw I.M.S. (1977), Water Resources Research vol. 13 (1): 15-33.

5) Omotis, U. and Wild A. (1979), Soil Science 128 (1): 28-33.

6) McLaughlin, M.J. (1982), Water SA vol. 8, 4: 196-201.

7) Behrens, H. (1982), GSF Bericht R 290.

8) Collier, J.A.; Garnes T.H.; Burrows P.M. (1981), Transactions of the ASAE: 814-820.

9) Ford, D.E. and Thornton K.W. (1983), Journal of Environmental Engineering 109 (4): 952-955.

10) Williford, J.R., Wooten O.B. and Barrentine W.L. (1968), Weeds 16 (3): 372-373.

11) McWhorter, C.G. and Wooten O.B., Weeds 9: 42-49.

12) ORION - Guide to Ion Analysis.

13) McQuaker, N.R. and Gurney M. (1977), An. Chem. vol. 49, 1: 53-56.

Tabel 1 Overzicht gronden

Plaats	Soort	RIKILT-nr(s)	Opmerkingen
Bergentheim	zware dalgrond	42759/54600	20% organische stof
Emmercompascuum	dalgrond	42756/54597	12% organische stof
Amen (HR)	zand	42764/54601	6% organische stof
Droevendaal	zand	42763/54596	4% organische stof
Espel	zeer lichte zavel	42761	
De Waag	lichte zavel	42762/54599	1,7% organische stof, 6% lutum*
Dronten	zavel	42760	
West Maas	zavel	42757/54598	25% lutum*
Dollard	klei	42758	
Assen	niet bekend	4/4/528	grond van een maisveld ca. 6% organische stof

* lutum = deeltjes < 2 µm.

Tabel 2

Naam van de stof	Alternatieve naam	Type stof	Adsorbtie aan grond uit water	Invloed op fluorescentie door pH	temp.	"background"	Algemene opmerkingen	Referenties
Fluorescein	CI Acid Yellow 73 Fluorescein LT Uranine Nafluorescein	g.f.	++ (4)	++++ (4,5)	+	+++ (4)	Verschillende (2) moleculstructuren bij pH verschuivingen ionisatie. Relatief sterke absorbtie aan humus	3, 4, 5, 7
Pyranine	CI Solvent Green 7 D en C Green 8	g.f.	-/+ (4) ++ (1)	+++++ (4,5)	-/+	+++ (4)	Excitatiespectrum verschuift rood pH 7. Geen vlak stuk in pH range 3-11 (4) Stabiel in zure grond (1), onstabiel in basische grond (5)	1, 4, 5
Lissamine PE	CI Acid Yellow 7 Lissamine Yellow FF Brillant Sulfo Flavine FF Brillant Acid Yellow 8G	g.f.	-/+ (4)	- (4)	-/+	+++ (4)	Groot effect van chloride (1-5 mg/l) Na 2 weken in grondsuspensie weinig verlies van fluorescentie	4, 9
Rhodamine WT	-	r.f.	++	++ (4)	++++	+ (4)	pH effect op fluorescentie afhankelijk van soort buffer (4)	3, 4, 9
Sulfo Rhodamine B	CI Acid Red 52 Pontacyl Brillant pink B Lissamine Red 4B Kiton Rhodamine B Acid Rhodamine B Lissamine Rhodamine B	r.f.	-/+ ++ (4)	- (4)	++++	+ (4)	Sterke adsorpbtie aan kaolinite (4) Zwakke adsorbtie aan humus	3, 4, 7, 10
Rhodamine B	CI Basic Violet 10	r.f.	++++	+++ (4)	++++	+ (4)	Adsorbtie aan humus relatief minder sterk dan aan kleideeltjes (4)	3, 4, 10
Photine CV	CI fluorescent brightener 15	b.f.	+++	++ (4)	++	++++ (4)		4
Amino G Acid	-	b.f.	-/+ (4)	+++ (4)	-/+	++++ (4)		4
Erico Floxine 2G Supra	CI Acid Red 1	kleurstof	+ (8)	?	?	?	Relatief grote hoeveelheden stof nodig, geen kwantitatieve gegevens (8)	8
Dayglo GT	-	r.f.	n.v.t.	n.v.t.	?			
Dayglo GT 15 N	Elaze Orange	r.f.	n.v.t.	n.v.t.	?	+++	Hoge concentraties nodig 100-1000 µg/g/grond (stof in harsdeeltjes)	2, 4
Tinopal 2BP Zink ortho silicate compound 2282	Fluorescent brightener	b.f.		?	?	+++		1 11

g.f. = geel/groen fluor
r.f. = rood fluor
b.f. = blauw fluor

- = geen adsorbtie
+ = veel adsorbtie

- = geen effect
+ = wel effect
n.v.t. = niet van toepassing

Tabel 4 Overzicht extinctie- en emissiemaxima van kleurstoffen in verschillende vloeistoffen (in nm)

	Rhodamine WT	Rhodamine B	Lissamine Rhodamine B	Lissamine PE
water/methanol 80/20	514-582	520-578	530-578	452-515
methanol	514-566	520-568	524-572	420-515
acetonitril				420-504
cyclohexaan				420-477
2-propanol				438-510
ethylacetaat				420-504

Tabel 5 Rhodamine WT

Procedure 1, niet geklaard met $CaCl_2$, eenmaal geextraheerd

	H_2O/MeOH 80/20		MeOH	
	% rendement	helderheid supernatant	% rendement	helderheid supernatant
Bergentheim	6	-	19	+
Emmercompascuum	9	-	n.b.	
Amer	3	--	19	+
Droevendaal	44	□	n.b.	
Espel	58	+	2	+
De Waag	56	+	4	+
Dronten	38	+	2	+
West Maas	37	+	2	+
Dollard	39	□	2	+

\+ = helder
\- = bruin
-- = donkerbruin
□ = mistig
n.b.= niet bepaald

Tabel 6 Lissamine PE

Procedure 1, niet geklaard met $CaCl_2$, eenmaal geextraheerd

	H_2O/MeOH 80/20		MeOH	
	% rendement	helderheid supernatant	% rendement	helderheid supernatant
Bergentheim	0	-	28	+
Emmercompascuum	6	▢	34	+
Amer	0	-	54	+
Droevendaal	36	▢	60	+
Espel	n.b.		n.b.	
De Waag	36	▢	64	+
Dronten	n.b.		n.b.	
West Maas	50	+	52	+
Dollard	n.b.		n.b.	

\+ = helder
\- = bruin
▢ = mistig
n.b.= niet bepaald

Tabel 7 Lissamine PE

Procedure 1, niet geklaard met $CaCl_2$, eenmaal geextraheerd.

Grond: Droevendaal.

	% rendement		
Methanol, tweemaal geextraheerd	66-86%	gemiddeld	73%
		st. afw.	5,4%
		var. coef.	7,4%
		n = 10	
Tetra	1)		
Chloroform	1)		
Acetonitril	16		
Cyclohexaan	2)		
2-Propanol	10		
Ethylacetaat	2)		
Aceton	16-20		

1) Kleurstof blijft in waterige fase, niet extraheerbaar.

2) Rendement >> 100%; veel fluorescerende stoffen meegeextraheerd.

Tabel 8 Lissamine PE

Procedure 1, niet geklaard met $CaCl_2$, eenmaal geextraheerd.

Grond: De Waag.

	% rendement
Methanol, tweemaal geextraheerd	76
Tetra	1)
Chloroform	1)
Acetonitril	32
Cyclohexaan	2)
2-Propanol	12
Ethylacetaat	2)

1) Kleurstof blijft in waterige fase, niet extraheerbaar.
2) Rendement >> 100%; veel fluorescerende stoffen meegeextraheerd.

Tabel 9

Grond: Assen 6% organische stof (4/4/528)

	% recovery	% recovery incl. $2^1/2\%$ $CaCl_2.6H_2O$	% recovery na 2x extraheren	Opmerkingen
Rhodamine B 1 µg/g grond				
H_2O/MeOH (80/20)	0	2,5	n.v.t.	supernatant zonder $CaCl_2$ is donkerbruin - pH ≈ 5,5
MeOH	35-36	n.v.t.	n.v.t.	supernatant helder
MeOH, standaard in blanco	39-45	n.v.t.	n.v.t.	
Lissamine Rhodamine B 1 µg/g grond				
H_2O/MeOH (80/20)	0-2,5	46-48	n.v.t.	supernatant zonder $CaCl_2$ is donkerbruin - pH ≈ 5,5
MeOH	60	n.v.t.	73-74	supernatant helder
MeOH + 0,6 M NaOH tot pH 9	38-57	n.v.t.	n.v.t.	supernatant is bruin tot lichtbruin
Natriumfluoride NaF 168 µg/g grond				
6M NaOH	66-68	n.v.t.	n.v.t.	gemeten als pF blanco waarde < 10% van monsterwaarde

n.v.t. = niet van toepassing.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 325
1e oplage (1984-04-18)

Lichte tot zeer lichte zavel - De bepaling van de kleurstof Lissamine Rhodamine B met behulp van fluorescentie detectie

---

1. Toepassingsgebied

Lissamine Rhodamine B is een fluorescerende kleurstof die geschikt is om in (zeer) lichte zavels (grond met een laag tot zeer laag percentage organisch materiaal) toepassing te vinden als tracer. De tracer simuleert het gedrag van bestrijdingsmiddelen in de grond.

Bij het gebruik van lichte zavel gelden de volgende parameters:
De absolute detectiegrens bedraagt 2,5 µg Lissamine Rhodamine B per 100 ml extractiemiddel (methanol). De relatieve detectiegrens bedraagt ca. 50 µg/kg grond. De gemiddelde recovery op 20 maal de relatieve detectiegrens bedraagt ca. 83%. De fluorescentie verandert lineair met de concentratie tussen 50-10.000 µg Lissamine Rhodamine B per kg grond.

2. Principe

Lissamine Rhodamine B wordt uit de grond geextraheerd met methanol. Na bezinken van de grond wordt het supernatant gefiltreerd. De fluorescentie van het filtraat wordt gemeten met een fluorescentiespectrofotometer.

3. Reagentia

3.1 Lissamine Rhodamine B (Koch-Light Laboratories Ltd).

3.2 Methanol.

3.3 Standaardoplossing Lissamine Rhodamine B, te gebruiken om aan grond toe te voegen.

3.3.1 Los 0,500 g Lissamine Rhodamine B op in 1 liter water.

3.3.2 Verdun de oplossing van 3.3.1 5x met methanol tot een concentratie van 100 mg/l.

3.4 Standaardoplossing Lissamine Rhodamine B, te gebruiken als externe standaard bij de fluorescentiedetectie.

3.4.1 Verdun de oplossing van 3.3.2 tot de concentratie 0,5 mg/l met methanol (5 ml 3.3.2 tot 1000 ml).

4. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

4.1 Medicijnflessen van 100 ml met schroefdop.

4.2 Medicijnflessen van 250 ml met schroefdop.

4.3 Bovenweger.

4.4 Schudapparaat (DESAGA).

4.5 Maatcylinder 100 ml.

4.6 Trechters, ø 7-10 cm.

4.7 Vouwfilters, Schleicher und Schüll, 595^{1}/2, ø 150 mm.

4.8 Vultrechter, passend voor 4.2.

4.9 Variabele doseerpipet, 1000 µl.

4.10 Perkin Elmer MPF-2A fluorescentiespectrofotometer met 1 cm cuvetten en recorder (of gelijkwaardig).
Excitatiegolflengte: 524 nm, slit: 8 nm.
Emissiegolflengte : 572 nm, slit: 8 nm.
De versterking moet zodanig ingesteld zijn dat met de standaard (3.4.1) een 90% schaaluitslag verkregen wordt.

5. Werkwijze

5.1 Weeg 50 g grond af in een 250 ml medicijnfles (4.2).

5.2 Voeg 100 ml methanol (3.2) toe.

5.3 Schud na sluiten van de flessen 30 minuten in een schudapparaat (4.4).

5.4 Laat de grond 3-4 uur bezinken tot helder supernatant.

5.5 Filtreer door een vouwfilter (4.7) in een 100 ml medicijnflesje (4.1).

5.6 Meet de fluorescentie (4.10) van de verkregen oplossing (5.5).

5.7 Meet tevens een blanco, 50 g grond zonder Lissamine Rhodamine B. Opwerking conform 5.1 t/m 5.6.

5.8 Meet een standaard Lissamine Rhodamine B (3.4).

5.9 Bepaal de recovery door aan 50 g grond 0,5 ml standaard (3.3.2) = 50 µg Lissamine Rhodamine B toe te voegen. Opwerking conform 5.1 t/m 5.6.

6. Berekening

Het gehalte aan Lissamine Rhodamine B in µg/kg grond wordt bepaald met de volgende formule:

$$\left(\frac{M - B}{S}\right) \cdot \left(\frac{V \cdot T}{G}\right) = x \text{ µg/kg}$$

S = fluorescentie intensiteit Lissamine Rhodamine B standaard (3.4.1)
M = fluorescentie intensiteit monster
B = fluorescentie intensiteit blanco (5.7)
T = µg/l Lissamine Rhodamine T in standaard (3.4.1)
G = afgewogen hoeveelheid grond (gram)
V = ml extractiemiddel

S, M en B gemeten onder exact dezelfde condities (4.10).

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Samensteller : J.M.P. van Trijp