

A
3
K
60

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente
Vestiging Naaldwijk
Kruisbroekweg 5, Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk
Tel 0174-636700, fax 0174-636835

BSF-BEPALING IN WATERIGE EXTRACTEN VAN VERS BLADMATERIAAL

Project 3414

V.M.J. Korpel-Arkestijn

Naaldwijk, maart 1997

Intern verslag 89

22041145

INHOUD

1.	INLEIDING	5
2.	ONDERZOEK BSF-BEPALING IN WATER	5
2.1	Optimale golflengten	5
2.2	Lineariteit	6
2.3	Reproduceerbaarheid en juistheid	6
2.4	Bepalingsgrens	7
2.5	Voorschrift BSF-bepaling in water	7
3.	ONDERZOEK EXTRACTIE VAN BLADMATERIAAL	7
3.1	Extractiemethoden	7
3.2	Spreiding in storing	8
3.2.1	Chrysant	8
3.2.2	Tomaat	9
3.2.3	Paprika	9
3.2.4	Aanbeveling	9
3.3	Additietesten	10
3.3.1	Chrysant	10
3.3.2	Tomaat	10
3.3.3	Paprika	11
3.3.4	Aanbeveling	11
4.	CONCLUSIE	11
	LITERATUUR	12
	FIGUUR 1 t/m 6	13
	BIJLAGE 1 t/m 3	

SAMENVATTING

De meting van BSF⁷⁾ in water met behulp van fluorimetrie is geoptimaliseerd. De ijklijn is ingekort en loopt van 0 tot 300 µg BSF/l. Het optimale meetgebied ligt tussen 100 en 250 µg BSF/l, waar de meetfout minder dan 1% bedraagt. De bepalingsgrens is vastgesteld op 1 µg BSF/l.

Chrysanten- en tomatenblad zijn getest met zeven schudmethoden, twee verschillende inzetverhoudingen (1:10 en 1:50) en het extraheren van hele bladeren en versnipperd blad. Hieruit is gebleken dat bij de extractie van hele bladeren minder storing optreedt dan bij de extractie van versnipperde bladeren. Extracties met een inzetverhouding van 1:10 zijn praktisch niet goed uitvoerbaar door de geringe hoeveelheid toegevoegd water, en geven, met name bij tomatenblad, veel storing. Bij een inzetverhouding van 1:50 treedt veel minder storing op en zijn de extracties wel goed uitvoerbaar. De zeven geteste schudmethoden verschilden onderling niet in mate van storing door het bladmateriaal. Voor verder onderzoek is gekozen voor het extraheren van hele bladeren bij een inzetverhouding van 1:50, door middel van twee verschillende schudmethoden: Door middel van end-over-end schudden en 24 uur wegzetten met extractiemiddel in glazen potten.

Met deze twee geselecteerde extractiemethoden is nader onderzoek verricht naar het (storende) signaal dat afgegeven wordt door bladmateriaal van chrysant, tomaat en paprika. Chrysantenblad gaf bij deze extractiemethoden geen noemenswaardige storing. Tomatenblad gaf een storing die varieert in waarden overeenkomend met BSF-concentraties van 2 tot 10 µg/l. De ondergrens van de BSF-meting is hierom voor tomatenblad-extracten verhoogd naar 20 µg BSF/l. Paprikablaf gaf een storing overeenkomend met BSF-concentraties van 0,5 tot 2 µg/l. De ondergrens voor paprikablaf-extracten is hierom verhoogd naar 5 µg BSF/l. Tussen de twee geteste extractiemethoden waren bij chrysant en tomaat, evenals in de voorgaande proef, geen duidelijke verschillen te vinden. Paprika is alleen getest met de passieve extractiemethode (24 uur wegzetten), omdat door de grootte van de bladeren de andere extractiemethode praktisch niet goed uitvoerbaar was.

Bij additietesten is gebleken dat bekende hoeveelheden BSF volledig en dupliceerbaar teruggevonden werden. Er was bij chrysant en tomaat geen duidelijk verschil in recovery te zien bij toepassen van de twee schudmethoden. Beide voldeden goed en zouden eventueel naast elkaar gebruikt kunnen worden.

Bovenstaande proeven zijn op beperkte schaal gedaan. Het is aan te bevelen om bij proeven, die in de toekomst gedaan worden, ter controle altijd een of twee blanco-extracties mee te nemen, alsook een of twee monsters bladmateriaal met een bekende hoeveelheid BSF. Hierdoor zal in de toekomst een steeds beter beeld ontstaan van het gedrag van bladmateriaal tijdens extractie met water.

*) BSF = Brilliant Sulfoflavine

1. INLEIDING

In het kader van het programma emissiebeperkende toedieningstechnieken (EBTT) wordt onderzoek gedaan naar de verdeling van spuitvloeistof over het gewas en de omgeving, waarbij gestreefd wordt naar een zo hoog mogelijk rendement bij een zo laag mogelijke concentratie van de actieve stof. Voor dit onderzoek is de fluorescerende stof BSF gekozen. Het voordeel van BSF is dat het, in tegenstelling tot bestrijdingsmiddelen, weinig milieubelastend is en vrij gemakkelijk te meten (Bor, 1991). In de periode 1991-1995 zijn op het PBG proeven gedaan om de gronddepositie te bepalen bij chrysant en tomaat. Tussen het te spuiten gewas werd filtreerpapier gelegd, dat na een spuitbeurt enige dagen in een vaste hoeveelheid water werd weggezet. Hierdoor loste het BSF op het filtreerpapier op, waarna de BSF-concentratie werd bepaald door middel van fluorimetrie (Tak, 1997).

Een volgende stap in het onderzoek is het vergelijken van verschillende toedieningstechnieken met betrekking tot de verdeling van spuitvloeistof over het gewas. Het onderzoek gaat zich toespitsen op chrysant, tomaat en paprika. Voor deze drie gewassen is een extractiemethode voor BSF op bladmateriaal ontwikkeld. Onderzocht zijn verschillende extractiemethoden op de afgifte van storende stoffen door het bladmateriaal, de effectiviteit en de praktische mogelijkheden. Voor een vlot verloop van de metingen is ook de meetmethode voor BSF in water verder uitgewerkt en geoptimaliseerd.

2. ONDERZOEK BSF-BEPALING IN WATER

Om een beter inzicht te verkrijgen in de mogelijkheden van de fluorimeter voor de BSF-meting zijn enkele proeven gedaan.

2.1 OPTIMALE GOLFLENGTEN

Voor meting met de fluorimeter moeten twee verschillende golflengten ingesteld worden: De excitatiegolflengte dient om de te meten moleculen in de oplossing te activeren, de emissiegolflengte is de golflengte van het licht dat door de geactiveerde moleculen uitgezonden wordt bij terugval naar de stabiele toestand (anoniem, 1988). Het optimaliseren van deze twee golflengten is een iteratief proces en wordt als volgt uitgevoerd:

- 1 - De excitatiegolflengte wordt ingesteld op een vaste waarde, waarna een emissiespectrum wordt gemeten.
- 2 - De emissiegolflengte wordt ingesteld op het maximum van het in stap 1 gemaakte spectrum, waarna een excitatiespectrum wordt gemeten.
- 3 - De excitatiegolflengte wordt ingesteld op het maximum van het in stap 2 gemaakte spectrum, waarna een emissiespectrum wordt gemeten.
- 4 - De emissiegolflengte wordt ingesteld op het maximum van het in stap 3 gemaakte spectrum, waarna een excitatiespectrum wordt gemeten.
- 5 - De stappen 3 en 4 worden herhaald tot de golflengten niet meer veranderen.

Na uitvoering hiervan zijn voor BSF een optimale excitatiegolflengte van 420 nm en een optimale emissiegolflengte van 500 nm gevonden.

2.2 LINEARITEIT

Om een inzicht te verkrijgen in de mate van lineariteit van de BSF-meting is een standaardlijn gemaakt, zoals beschreven door Fierens (1995). Deze is in drievoud gemeten ten opzichte van demiwater bij een excitatiegolflengte van 420 nm en een emissiegolflengte van 500 nm. Deze metingen kwamen onderling goed overeen. De gemiddelde resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 1, waaruit blijkt dat de ijklijn over het gehele gebied lineair is.

Het kost veel tijd om de fluorimeter met 13 standaarden te calibreren. Tevens treedt bij hoge BSF-concentraties vervuiling op van de aanvoerslang en de cuvet. Dit geeft een storing bij de volgende meting, zodat er extra gespoeld moet worden. Om de calibratietijd in te korten en het storende effect te verminderen, worden alleen standaarden gebruikt van 0 - 50 - 100 - 200 - 300 µg BSF/l.

2.3 REPRODUCEERBAARHEID EN JUISTHEID

Om de reproduceerbaarheid en juistheid van de BSF-meting te bepalen, zijn oplossingen met concentraties van respectievelijk 0,1 - 1 - 5 -10 - 25 - 50 - 150 en 250 µg BSF/l in 10-voud gemeten. In tabel 1 is de statistische verwerking van de meetresultaten samengevat. Uit de gemiddeld teruggevonden meetwaarden in tabel 1 blijkt dat de theoretische BSF-concentraties allen goed teruggevonden worden.

Om een beeld te krijgen van de nauwkeurigheid van de meting, is in figuur 2 de variatiecoëfficiënt uitgezet tegen de BSF-concentratie. Hieruit blijkt dat bij concentraties kleiner dan 10 µg BSF/l rekening moet worden gehouden met een snel groeiende meetfout. Het optimale meetgebied ligt tussen 100 en 250 µg BSF/l, waar de meetfout minder dan 1% bedraagt.

Tabel 1 - Nauwkeurigheid BSF-metingen, gebaseerd op 10 herhalingen

theoretisch (µg/l)	0,1	1,0	5,0	10,0	25,0	50,0	150	250
gemiddeld (µg/l)	0,1	1,1	5,0	10,2	24,8	50,3	147	248
gemiddeld (%)	120	109	99	102	99	101	98	99
min (µg/l)	0,1	1,0	4,3	9,9	24,2	49,4	146	245
max (µg/l)	0,2	1,4	5,5	11,1	26,3	52,9	148	251
std-afwijking (µg/l)	0,04	0,1	0,4	0,4	0,7	1,1	0,5	1,5
variatiecoëfficiënt (%)	35,1	11,8	8,7	3,9	2,6	2,1	0,3	0,6

Tabel 2 - Meetwaarden standaarden voor bepalingsgrens

$\mu\text{g BSF/l}$	fluorescentie
0,013	0,0
0,025	0,0
0,05	0,1
0,10	0,2
0,20	0,4
0,40	0,8
0,80	1,6
1,60	3,2

2.4 BEPALINGSGRENS

Voor het vaststellen van de bepalingsgrens zijn standaarden van 0,013 - 0,025 - 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,40 - 0,80 $\mu\text{g BSF/l}$ in tienvoud gemeten ten opzichte van demiwater. De gemiddelde fluorescentiewaarden zijn in tabel 2 weergegeven en in figuur 3 uitgezet tegen de BSF-concentratie. Uit figuur 3 blijkt dat het signaal zich vrijwel direct lineair ontwikkelt. De beperkende factor is uitdrukking van de fluorescentie in 1 decimaal. Uit 2.3 blijkt echter dat bij 0,1 $\mu\text{g BSF/l}$ de meetfout 35 % bedraagt. Een tweede decimaal toevoegen aan de meetwaarde zou hierom niet zinvol zijn.

Als criterium voor de ondergrens wordt de in 2.3 bepaalde nauwkeurigheid van de BSF-meting genomen: Deze is bij 1 $\mu\text{g/l}$ nog acceptabel (12 %); daaronder wordt deze snel groter. Als ondergrens wordt daarom 1 $\mu\text{g BSF/l}$ aangehouden.

2.5 VOORSCHRIFT BSF-BEPALING IN WATER

Aan de hand van voorgaande gegevens is een concept voorschrift voor de meting van BSF in watermonsters opgesteld, dat weergegeven is in bijlage 1. Dit voorschrift is voor alle in dit verslag vermelde BSF-metingen toegepast.

3. ONDERZOEK EXTRACTIE VAN BLADMATERIAAL

3.1 EXTRACTIEMETHODEN

Tijdens extractie van BSF op bladmateriaal kunnen uit het bladmateriaal stoffen vrijkomen, die de BSF-meting storen. Om de invloed van de manier van extraheren hierop te onderzoeken, zijn chrysanten- en tomatenbladeren op zeven verschillende manieren geschud, met twee verschillende inzetverhoudingen en het gebruik van hele bladeren en versnipperde bladeren. Een tomatenblad bestaat uit een vertakking van kleinere deelbladeren. Voor extractie van hele bladeren zijn deze kleinere bladeren gebruikt. Een overzicht van de verschillende extractiemethoden is weergegeven in figuur 4.

Voor het extraheren is de volgende procedure gevolgd:

De bladeren of stukjes blad zijn gewogen, waarna respectievelijk 10 en 50 maal het gewicht aan water is toegevoegd. Na schudden volgens de methoden uit figuur 3 is een gedeelte van het extract gefiltreerd over een 0,45 µm persfilter. Van het filtraat is de fluorescentie gemeten ten opzichte van demiwater. Alle extracties zijn in tweevoud uitgevoerd.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 5 a t/m h, waaruit opgemaakt kan worden dat:

- hele bladeren lagere fluorescentiewaarden geven dan versnipperde bladeren
- inzetverhouding 1:50 lagere fluorescentiewaarden geeft dan inzetverhouding 1:10
- chrysant lagere fluorescentiewaarden geeft dan tomaat
- de verschillende extractiemethoden geen duidelijke verschillen geven in fluorescentiewaarden
- metingen in tweevoud niet altijd overeenkomen; de bladeren geven een variabele hoeveelheid storende stoffen af

Tijdens de uitvoering van deze proef is gebleken dat extraheren met inzetverhouding 1:10 niet afdoende werkt bij de schudmethoden 3 t/m 7: Er is te weinig vloeistof om het hele blad in onder te dompelen waardoor het contact tussen blad en vloeistof niet volledig is. Op deze manier kan geen goede extractie plaatsvinden. De schudmethoden 1 en 2 kunnen door het verticaal schudden bij een inzetverhouding van 1:10 misschien wel voldoende contact tussen blad en vloeistof bewerkstellingen, maar tomatenbladeren geven bij deze inzetverhouding een hoog signaal.

Op grond van bovenstaande gegevens is voor het vervolgonderzoek gekozen voor de schudmethoden 1 en 7. Methode 1 is qua tijdsduur en manier van schudden het meest efficiënt; een monster kan na toevoegen van het extractiemiddel al na 30 minuten gemeten worden. De beperkende factor is, dat slechts 16 monsters tegelijk geschud kunnen worden, terwijl het laboratorium in de praktijk geconfronteerd zal gaan worden met veel monsters, die tegelijkertijd in bewerking moeten worden genomen. Hiervoor is schudmethode 7 efficiënter: De monsters kunnen de dag na inzetten pas gemeten worden, maar de extractie op zichzelf kost geen arbeid.

Voor de schudmethoden 1 en 7 zullen hele bladeren in bewerking worden genomen bij een inzetverhouding van 1:50, omdat deze combinatie het laagste signaal, dus het minste storing geeft. De extracties met de schudmethoden 1 en 7 zijn uitgewerkt in bijlage 2.

3.2 SPREIDING IN STORING

In 3.1 is gebleken dat bladeren een variabele hoeveelheid storende stoffen afgeven. Om hiervan een beter beeld te krijgen, zijn een aantal bladmonsters geëxtraheerd volgens de twee methoden uit bijlage 2 en vervolgens gemeten. Tijdens uitvoering van dit onderzoek is naar voren gekomen dat in 1997 ook experimenten met paprika gepland zijn. Daarom zijn, naast chrysant en tomaat, ook bladeren van dit gewas getest.

3.2.1 Chrysant

De resultaten van de metingen zijn weergegeven in tabel 3 en figuur 6a en 6b, waaruit blijkt dat bij schudmethode 1 de bladeren iets minder storing geven dan bij schudmethode 7. In het algemeen moet rekening gehouden worden met variabele storings tot een fluorescentie van 2 met enkele uitschieters tot een fluorescentie van 4. Dit komt overeen met BSF-concentraties van ongeveer 2 respectievelijk 4 µg/l. De in 2.4 gestelde bepalingsgrens van 1 µg BSF/l is haalbaar, maar bij meting van BSF-concentraties nabij 1 µg/l moet rekening gehouden worden met een grote meetfout.

Tabel 3 - Spreiding in storing door bladmateriaal, gebaseerd op 14 - 16 herhalingen

	chrysant		tomaat		paprika
schudmethode	1	7	1	7	7
gemiddelde luminescentie	0,5	1,2	8,5	6,8	2,4
min	0,2	0,4	4,3	4,4	1,1
max	1,3	4,1	18,7	10,9	3,7
std-afwijking	0,3	1,2	4,0	1,9	0,8
variatiecoëfficiënt (%)	56	102	47	28	35

3.2.2 Tomaat

De resultaten van de metingen zijn weergegeven in tabel 3 en figuur 6c en 6d, waaruit blijkt dat bij schudmethode 1 de bladeren een wat diversere storing geven dan bij schudmethode 7. In het algemeen moet rekening gehouden worden met een variabele storing van een luminescentie van 4 tot 20. Dit komt overeen met een BSF-concentratie van 2 tot 10 µg/l. De in 2.4. gestelde bepalingsgrens van 1 µg BSF/l is hier niet zinvol. Beter is een ondergrens van 20 µg BSF/l te kiezen, om de storing niet groter te laten worden dan de BSF-concentratie. Ook bij metingen nabij 20 µg/l moet rekening gehouden worden met een zeer grote meetfout.

3.2.3 Paprika

Tijdens het extraheren van paprikabladeren is gebleken dat schudmethode 1 niet bruikbaar is. De opening van een plastic flesje is te klein om een paprikablade met weinig aanraken in de fles te krijgen. Methode 1 wordt hierdoor als niet toepasbaar beschouwd; voor paprikablade is alleen schudmethode 7 getest. Een voorwaarde voor het toepassen van schudmethode 7 is dat de bladeren zo min mogelijk water mogen verdampen: Als de bladeren te slap in de pot gedaan worden, gaan zij zich, door wateropname tijdens de extractie, strekken, zodat zij mogelijk niet meer geheel onder water blijven. Hierdoor is de extractie niet meer volledig. Het is bij grote paprikabladeren tevens nodig om de bladeren te knakken om ze goed onder water te houden. Dit heeft invloed op het signaal dat de bladeren afgeven.

De resultaten van de metingen zijn weergegeven in tabel 3 en figuur 6e, waaruit blijkt dat het stukprikken van de bladeren niet voor een grote storing zorgt. In het algemeen moet rekening gehouden worden met een storing van een luminescentie van 1 tot 4. Dit komt overeen met een BSF-concentratie van 0,5 tot 2 µg/l. De in 2.4 gestelde bepalingsgrens van 1 µg BSF/l is niet haalbaar. Beter is een ondergrens van 5 µg BSF/l te kiezen, om de storing niet groter te laten worden dan de BSF-concentratie. Ook bij metingen nabij 5 µg/l moet rekening gehouden worden met een zeer grote meetfout.

3.2.4. Aanbeveling

De voorgaande gegevens zijn gebaseerd op 14 tot 16 metingen. Het is mogelijk dat er ook verschil in storing optreedt bij oud en jong blad, waar in dit onderzoek geen onderscheid tussen is gemaakt. Het is aan te bevelen om in de toekomst bij alle metingenseries blanco-extracties mee te nemen. Op deze manier zal het gedrag van bladmateriaal tijdens extractie steeds duidelijker worden en zal blijken of de gegevens uit tabel 2 voldoende representatief zijn.

3.3 ADDITIETESTEN

Om de effectiviteit van de twee extractiemethoden uit bijlage 2 te testen, zijn aan bladmonsters met een bekend gewicht hoeveelheden geconcentreerde BSF-oplossing aangebracht, die overeenkwamen met respectievelijk 5 - 50 - 150 µg BSF/l in de meetoplossing. Na opdrogen van de BSF-oplossingen op de bladeren werd geëxtraheerd volgens de extractiemethoden uit bijlage 2. Van het filtraat is de fluorescentie gemeten. De extracties zijn in tweevoud uitgevoerd.

3.3.1. Chrysant

De resultaten zijn weergegeven in tabel 4, waaruit blijkt dat de teruggevonden hoeveelheden BSF per extractiemethode weinig van elkaar verschillen. De hoeveelheden BSF worden dupliceerbaar teruggevonden met een recoverypercentage van 97 tot 101% bij 50 en 150 µg BSF/l en 94 tot 112 % bij 5 µg BSF/l. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met de conclusies uit 3.2.1. over de laagst haalbare meetwaarde voor chrysantenbladextracten: Bij 5 µg BSF/l is de invloed van het bladmateriaal nog niet zodanig, dat zeer grote meetfouten optreden. Bij 50 µg BSF/l is de invloed van het bladmateriaal nauwelijks meer merkbaar.

3.3.2. Tomaat

De resultaten zijn weergegeven in tabel 4, waaruit blijkt dat de teruggevonden hoeveelheden BSF per extractiemethode weinig van elkaar verschillen. De hoeveelheden BSF worden dupliceerbaar teruggevonden met een recoverypercentage van 98 tot 107% bij 50 en 150 µg BSF/l en 146 tot 204% bij 5 µg BSF/l. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met de conclusies uit 3.2.2. over de laagst haalbare meetwaarde voor tomatenbladextracten: Bij 5 µg BSF/l kan de invloed van het bladmateriaal groter zijn dan de BSF-concentratie in de meetoplossing. Ook bij 50 µg BSF/l is de invloed van het bladmateriaal nog duidelijk merkbaar en wordt nog een verhoogde BSF-concentratie gemeten.

Tabel 4 - Gemiddelde resultaten en opbrengstpercentages van de verschillende BSF-gehalten na extractie

theor µg/l	chrysant		tomaat				paprika			
	schudmeth 1 µg/l	schudmeth 7 %	schudmeth 1 µg/l	schudmeth 7 %	schudmeth 1 µg/l	schudmeth 7 %	schudmeth 7 µg/l	schudmeth 7 %		
5,0	4.7	94	5.6	112	10.2	204	7.3	146	8.2	164
	5.1	102	5.3	106	10.2	204	8.5	170	7.1	142
50,0	49.9	100	50.4	101	51.9	104	52.4	105	52.3	105
	49.0	98	50.4	101	51.7	103	53.4	107	52.0	104
150	147.4	98	150.7	100	148.5	99	149.8	100	150.7	100
	146.1	97	151.5	101	147.2	98	152.2	101	151.8	101

3.3.3. Paprika

De resultaten zijn weergegeven in tabel 4, waaruit blijkt dat de hoeveelheden BSF dupliceerbaar teruggevonden worden met een recoverypercentage van 100 tot 105% bij 50 en 150 µg BSF/l en 142 en 164% bij 5 µg BSF/l. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met de conclusies uit 3.2.3. over de laagst haalbare meetwaarde voor paprikabladextracten: Bij 5 µg BSF/l is de invloed van het bladmateriaal al zeer groot. Ook bij 50 µg BSF/l wordt nog een wat verhoogde BSF-concentratie gemeten.

3.3.4 Aanbeveling

Bovenstaande gegevens zijn gebaseerd op metingen in tweevoud. Het is aan te bevelen om in de toekomst bij alle metingenseries bladeren met een bekende hoeveelheid BSF mee te nemen. Op deze manier zal het gedrag van het bladmateriaal tijdens extractie steeds duidelijker worden en zal blijken of de gegevens uit tabel 3 representatief zijn.

4. CONCLUSIE

Uit de gedane proeven blijkt dat BSF op chrysantenblad dupliceerbaar en volledig teruggevonden wordt. Storing van het bladmateriaal speelt bij de meting alleen een rol bij zeer lage concentraties. In het algemeen kunnen BSF-concentraties in chrysantenblad-extracten gemeten worden vanaf 1 µg BSF/l, waarbij wel in het lage gebied rekening moet worden gehouden met grote meetfouten.

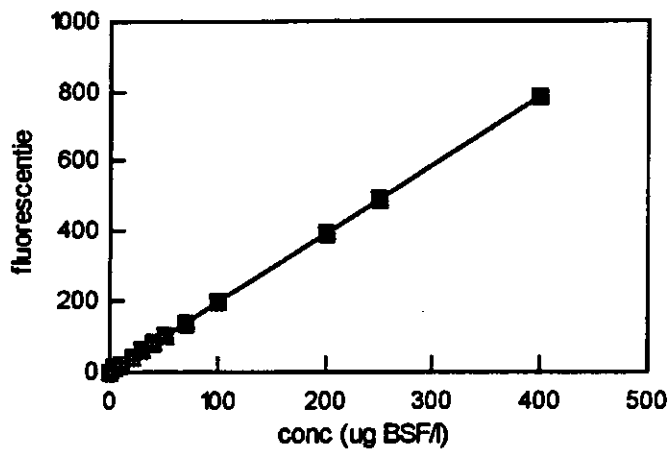
BSF op tomatenblad wordt eveneens dupliceerbaar en volledig teruggevonden. Storing van het bladmateriaal speelt bij de meting echter een grote rol: In het algemeen kunnen BSF-concentraties in tomatenblad-extracten gemeten worden vanaf 20 µg BSF/l. Ook nabij deze grens moet rekening worden gehouden met zeer grote meetfouten.

Ook BSF op paprikablاد wordt dupliceerbaar en volledig teruggevonden. In het algemeen kunnen BSF-concentraties in paprikablاد-extracten gemeten worden vanaf 5 µg BSF/l. Nabij deze grens moet echter ook rekening worden gehouden met zeer grote meetfouten.

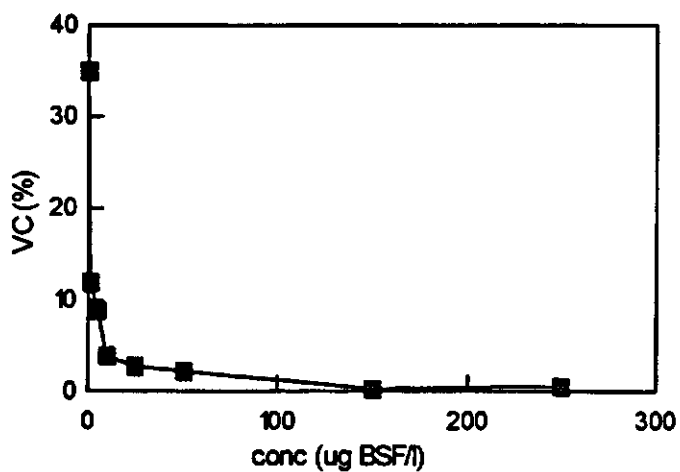
Omdat nog weinig ervaring is opgedaan met de BSF-metingen op bladmateriaal, moet in de toekomst bij iedere monsterserie een aantal bladmonsters zonder BSF geëxtraheerd worden. Ook moet een aantal bladmonsters met een exact bekende hoeveelheid BSF meegeëxtraheerd worden. Hierdoor zal een steeds nauwkeuriger beeld gaan ontstaan over het gedrag van bladmateriaal met betrekking tot de BSF-meting.

LITERATUUR

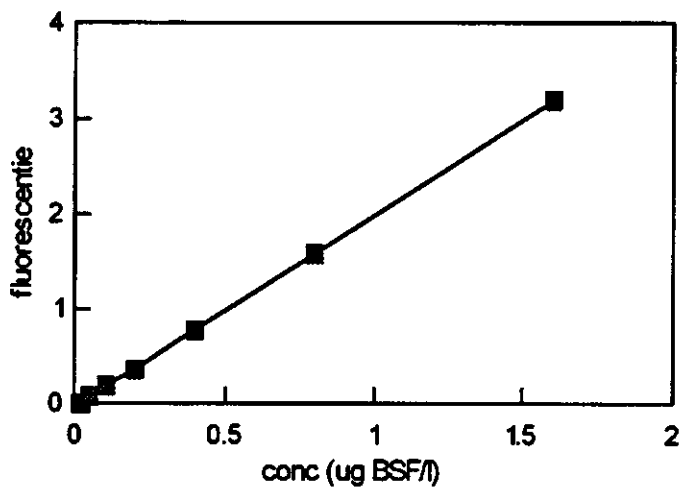
- Anoniem, 1988. The model LS 30 luminescence spectrometer user's manual. Perkin Elmer LTD Beaconsfield, Buckinghamshire, England.
- Bor, G., 1991. Het gebruik van kleurstoffen bij depositiemetingen voor bestrijdingsmiddelen: fysisch-chemische en toxicologische eigenschappen. DLO-Staring Centrum, interne mededeling 182.
- Fierens, F.E., 1995. Onderzoek naar de emissie van spuitvloeistof na bespuiting van gewas met verschillende soorten spuitapparatuur. Proefstation voor Tuinbouw onder Glas, Naaldwijk stageverslag.
- Tak, F., 1997. Invloed van spuitapparatuur op de depositie van bestrijdingsmiddelen op de grond bij een tomatengewas. Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroenten, Naaldwijk. Rapport nr 51 (in bewerking).



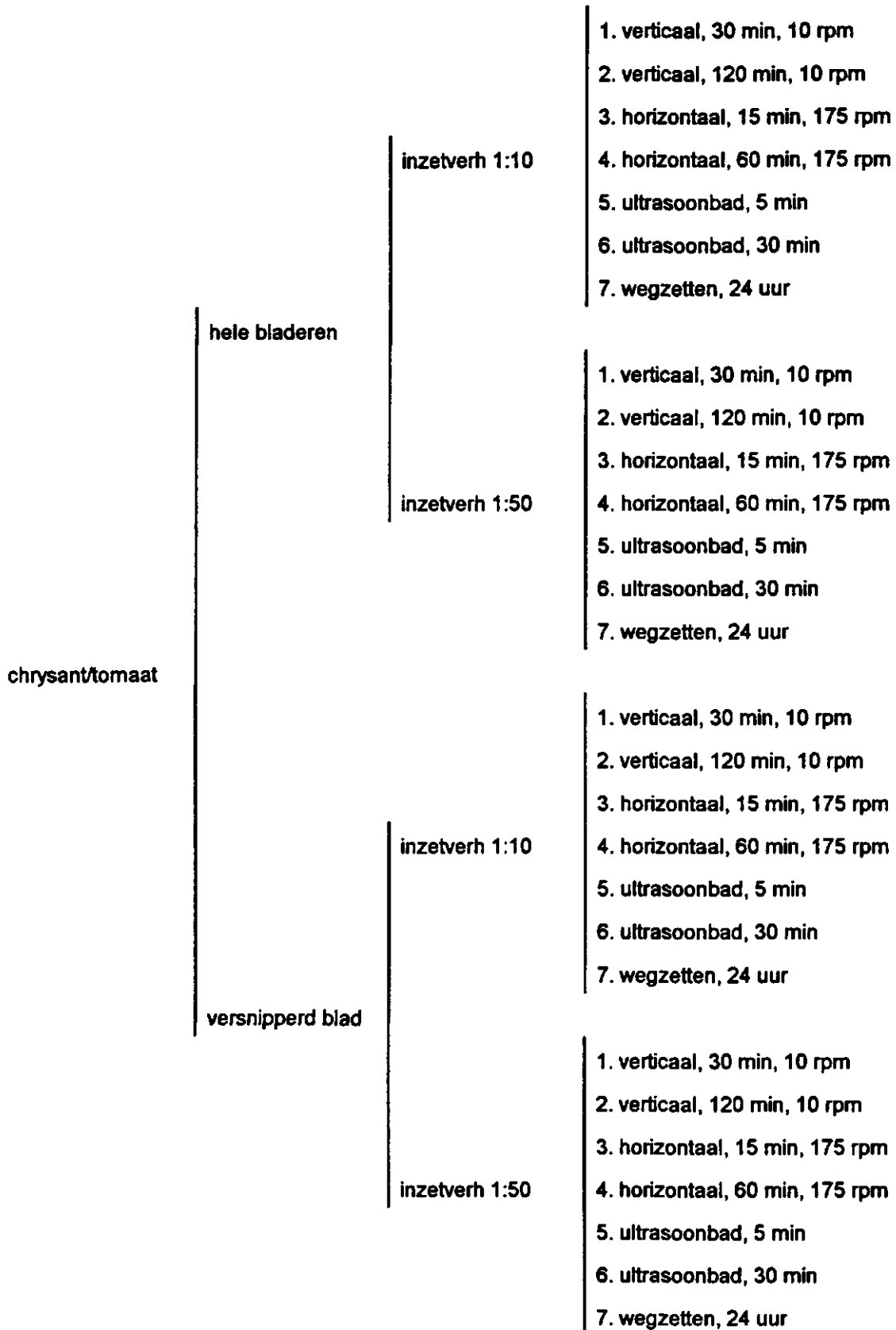
Figuur 1- IJklijn volgens Fierens



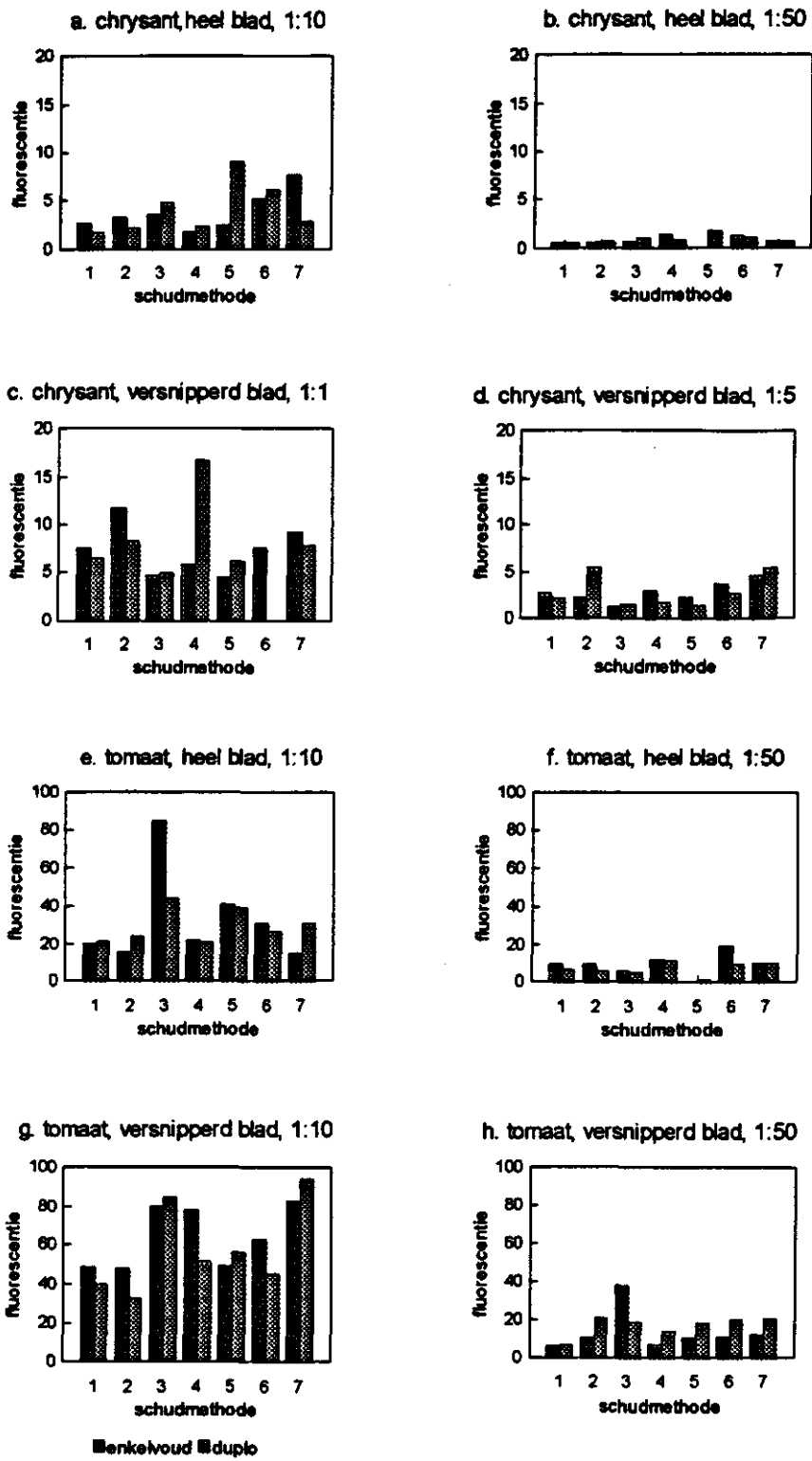
Figuur 2 - Variatiecoëfficiënt, uitgezet tegen de gemeten BSF-concentratie in µg/l (n=10)



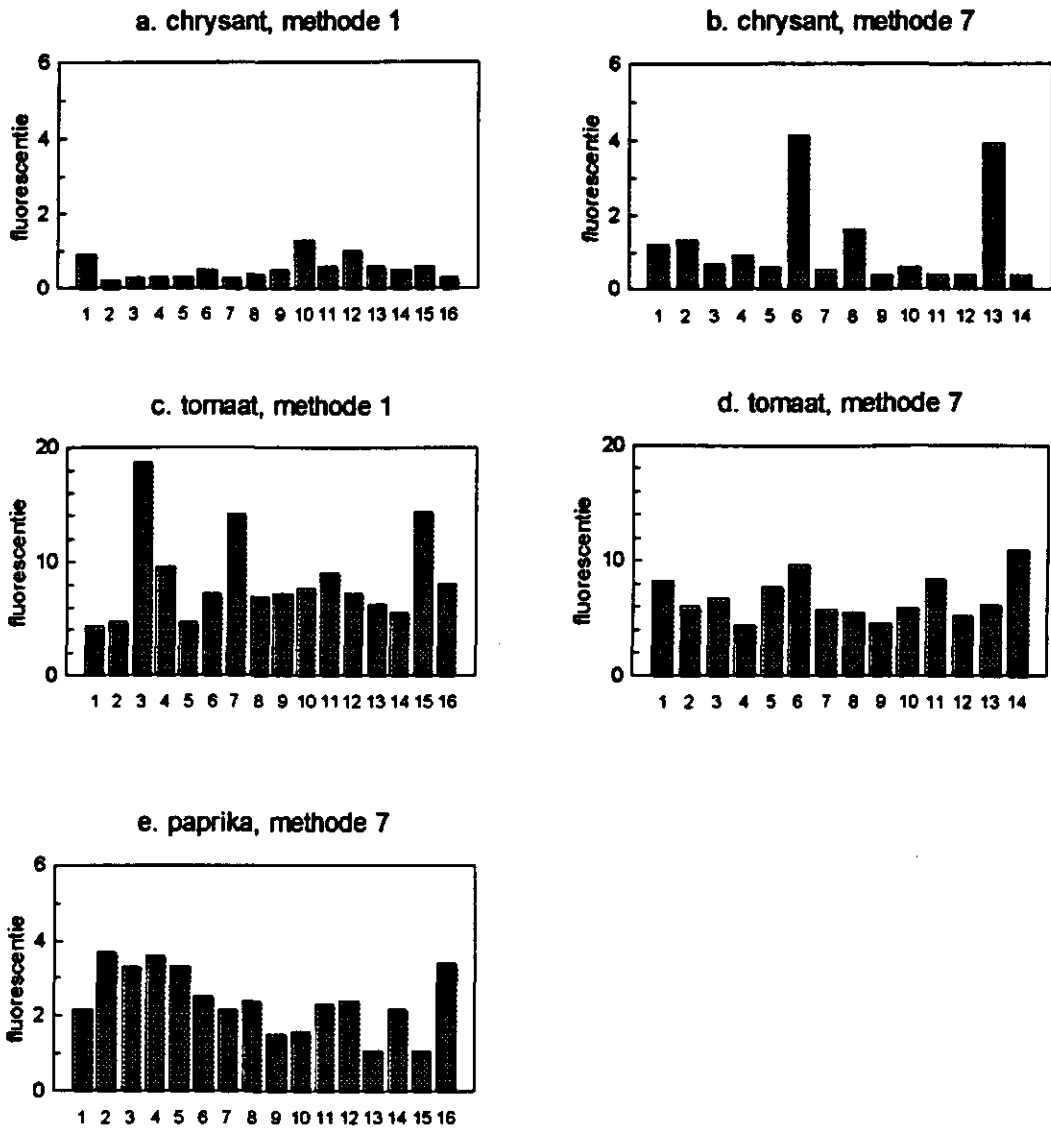
Figuur 3 - Bepalingsgrens BSF in water (n=10)



Figuur 4 - Schematische weergave van de verschillende extractiemethoden



Figuur 5 - Resultaten verschillende extractiemethoden



Figuur 6 - Schematische weergave van de variatie in storing bij chrysant, tomaat en paprika na toepassen van de geselecteerde extractiemethoden

BIJLAGE 1. BSF-bepaling in water

Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft een methode voor de bepaling van het BSF-gehalte van waterige oplossingen en extracten met behulp van fluorimetrie.

Toepassing

Dit voorschrift is van toepassing op waterige oplossingen en extracten. In het algemeen kunnen BSF-gehalten vanaf 1 µg/l gemeten worden.

Principe

BSF (brilliant sulpho flavine) is een fluorescerende stof die geëxciteerd wordt bij 420 nm. Het bij terugval door BSF uitgezonden licht wordt gemeten bij een golflengte van 500 nm.

Reagentia

Hoofdstandaardoplossing BSF, 50 mg/l BSF

- Weeg 0,0250 g BSF af en spoel over in een maatkolf van 500 ml. Vul aan met water en roer totdat alle BSF opgelost is.
- Bewaren in een donkere fles.

Standaardreeks : 0 - 50 - 100 - 200 - 300 µg/l BSF

- De reeks als volgt bereiden:
 - 0 µg/l: pipetteer 0,0 µl hoofdstandaardoplossing in een maatkolf van 100 ml.
 - 50 µg/l: pipetteer 100 µl idem
 - 100 µg/l: pipetteer 200 µl idem
 - 200 µg/l: pipetteer 400 µl idem
 - 300 µg/l: pipetteer 600 µl idem
- Vul aan tot 100,0 ml met water.
- Bewaar op een donkere plek.

Apparatuur

Fluorescentiespectrometer Perkin-Elmer LS 30

Monsterwisselaar Perkin Elmer Autosampling System

Meetmethode

- Volg het bedieningsvoorschrift van de fluorimeter.
- Calibreer de fluorimeter volgens het bedieningsvoorschrift.
- Meet de monsters.
- Controleer tussen de metingen door regelmatig het signaal met een blanco en een standaard. Corrigeer indien nodig of calibreer opnieuw.
- Zorg ervoor dat het laatste monster uit een reeks altijd water is.
- De BSFconcentratie wordt uitgedrukt in $\mu\text{g/l}$ in de meetoplossing.
- Spoel na het meten de cuvet met 96% alcohol.
- Zorg ervoor dat bij het uitzetten van het apparaat de cuvet gevuld is met 96% alcohol.

Berekening

$$x = c \times F$$

x : concentratie BSF $\mu\text{g/l}$.

F : verdunningsfactor (=1)

- Corrigeer voor eventuele verdunningen.
- De BSF-concentraties weergeven in hele getallen.

Bijlage 2: Voorschriften extractie vers bladmateriaal voor BSF-bepaling

1. Schudmethode 1

Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft een extractie van vers bladmateriaal voor de bepaling van de hoeveelheid hierop aangebracht BSF.

Toepassing

Dit voorschrift is van toepassing op bladeren van chrysant en tomaat.

Principe

Aan vers bladmateriaal wordt een hoeveelheid water toegevoegd, waarna door schudden, het op het bladmateriaal aanwezige BSF in oplossing wordt gebracht.

Apparatuur

Schudmachine Gerhardt RA 24/2
- 'end over end' roterend

Werkwijze

- Bepaal het gewicht van een 250 ml polyethyleen fles in g en noteer dit (G1).
- Verzamel een of meerdere bladeren in de fles. Zorg ervoor dat het gewicht niet meer dan 4 g bedraagt.
- Bepaal het gewicht van de fles met het monster in g en noteer dit (G2).
- Bereken het gewicht van het bladmonster in g (G1 - G2).
- Voeg 50 maal het gewicht van het monster aan water toe en meng goed.
- Plaats een dop op de fles en schud 30 min bij 10 omwentelingen per minuut.
- Filtreer een gedeelte van het extract over een 0,45 µm-filter.
- Bepaal het BSF-gehalte in het extract volgens het voorschrift in bijlage 1.

2. Schudmethode 7

Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft een extractie van vers bladmateriaal voor de bepaling van de hoeveelheid hierop aangebracht BSF.

Toepassing

Dit voorschrift is van toepassing op bladeren van chrysant en tomaat.

Principe

Aan vers bladmateriaal wordt een hoeveelheid water toegevoegd, waarna, door het 24 uur op een donkere plaats weg te zetten, het op het bladmateriaal aanwezige BSF in oplossing wordt gebracht.

Werkwijze

- Bepaal het gewicht van een glazen 600 ml pot in g en noteer dit (G1).
- Verzamel een of meerdere bladeren in de pot. Zorg ervoor dat het gewicht niet meer dan 10 g bedraagt.
- Bepaal het gewicht van de pot met het monster in g en noteer dit (G2).
- Bereken het gewicht van het bladmonster in g (G1 - G2).
- Voeg 50 maal het gewicht van het monster aan water toe.
- Meng eenmaal goed en zorg er vervolgens met behulp van een roerstaaf voor dat het bladmateriaal geheel ondergedompeld is.
- Plaats een deksel op de pot en plaats deze 24 uur in een donkere ruimte.
- Meng nogmaals goed en filtreer een gedeelte van het extract over een 0,45 µm-filter.
- Bepaal het BSF-gehalte in het extract volgens het voorschrift in bijlage 1.

BIJLAGE 3: Meetresultaten

Validatie

Controlemeting ijdijn volgens Fierens:

conc ug/l	fluoresc				gem	Y=A*X+B	
0	0	0	0	0	0.0	A	1.96
5	10.4	10.3	10.2	10.3	10.3	B	1.27
10	20.4	20.4	20.3	20.4	20.4	corrcoeff	1.0000
20	41	40.8	40.6	40.8	40.8		
30	61.9	61.7	61.4	61.7	61.7		
40	82.7	82.7	81.9	82.4	82.4		
50	98.4	98.4	97.9	98.2	98.2		
70	138.3	137.8	137.4	137.8	137.8		
100	188	197.7	187.1	197.6	197.6		
200	380.5	390.8	386.9	393.4	393.4		
250	484	492.8	491.3	492.7	492.7		
400	787.5	785.7	784.5	785.9	785.9		

Juistheid/reproduceerbaarheid:

nummer	gemeten concentratie							
	0.1 ug/l	1 ug/l	5 ug/l	10 ug/l	25 ug/l	50 ug/l	150 ug/l	250 ug/l
1	0.1	1.0	4.9	10.6	25.6	50.4	147.2	249.2
2	0.1	1.4	5.0	9.9	24.7	50.2	146.9	248.3
3	0.1	1.1	4.5	10.4	26.3	49.6	147.1	245.4
4	0.1	1.0	5.5	10.1	24.4	49.6	146.7	247.9
5	0.2	1.0	4.3	9.9	24.5	51.2	148.3	248.0
6	0.1	1.0	5.1	9.9	24.7	49.9	146.9	246.8
7	0.2	1.1	5.4	11.1	24.8	49.4	146.9	247.9
8	0.1	1.1	4.4	10.1	24.3	52.9	147.0	251.0
9	0.1	1.2	5.3	9.9	24.2	49.6	146.3	247.0
10	0.1	1.0	5.3	10.0	24.7	50.1	147.1	246.6
gemidd	0.1	1.1	5.0	10.2	24.8	50.3	147.0	247.8
mediaan	0.1	1.1	5.1	10.1	24.7	50.0	147.0	247.9
min	0.1	1.0	4.3	9.9	24.2	49.4	146.3	245.4
max	0.2	1.4	5.5	11.1	26.3	52.9	148.3	251.0
spreiding	0.1	0.4	1.2	1.2	2.1	3.5	2.0	5.6
spreid%	83	37	24	12	8	7	1	2
st dev	0.04	0.13	0.43	0.40	0.65	1.06	0.51	1.54
varcoeff	35.1	11.8	8.7	3.9	2.6	2.1	0.3	0.6

teruggevonden percentage

	0.1 ug/l	1 ug/l	5 ug/l	10 ug/l	25 ug/l	50 ug/l	150 ug/l	250 ug/l
	100	100	98	106	102	101	98	100
	100	140	100	99	99	100	98	99
	100	110	90	104	105	99	98	98

bepalingsgrens:

conc ug/l	fluoresc										gemiddeld
0.012	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.05	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2
0.2	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4
0.4	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8
0.8	1.6	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6
1.6	3.4	3	3.1	3.2	3.2	3.1	3.1	3.1	3.4	3.4	3.2
3.2	6.6	6.1	6.4	6.3	6.4	6.3	6.3	6.3	6.7	6.4	6.4

Extractiemethoden

Bewerking hele bladeren

- 1 = end-over-end, 30 min, 10 rpm
- 2 = end-over-end, 120 min, 10 rpm
- 3 = horizontaal, 175 rpm, 15 min
- 4 = horizontaal, 175 rpm, 60 min
- 5 = ultrasoonbad, 5 min
- 6 = ultrasoonbad, 30 min
- 7 = 24 uur wegzetten

1. Chrysant, inzetverhouding 1:10

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.94	1.65	19	17	2.7	1.8
2	0.86	1.81	9	18	3.3	2.1
3	1.29	2.28	13	23	3.5	4.8
4	2.14	1.39	21	14	1.8	2.3
5	1.82	2.30	18	23	2.4	9.1
6	1.55	1.50	16	15	5.2	6.1
7	1.60	1.90	16	19	7.6	2.8

2. Chrysant, inzetverhouding 1:50

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.86	1.45	93	73	0.5	0.5
2	2.03	1.03	102	52	0.5	0.7
3	1.72	2.08	86	104	0.7	1.0
4	1.57	1.72	79	86	1.3	0.8
5	0.86	1.07	43	54	xxx	1.7
6	1.38	1.19	69	60	1.2	1.1
7	2.09	1.89	104	95	0.7	0.7

3. Tomaat, inzetverhouding 1:10

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.56	1.27	16	13	19.8	21.0
2	2.21	1.64	22	16	15.6	24.2
3	1.72	0.95	17	10	85.1	43.6
4	2.31	1.35	23	13	21.8	21.2
5	1.07	1.08	11	11	40.4	38.9
6	1.71	1.57	17	16	30.7	26.6
7	1.52	1.40	15	14	15.1	30.6

4. Tomaat, inzetverhouding 1:50

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.23	1.34	61	67	9.5	6.5
2	0.90	1.07	45	53	9.2	5.6
3	1.30	0.85	65	43	5.8	5.2
4	1.19	1.08	60	54	12.4	11.3
5	1.74	0.93	87	47	0.5	0.7
6	1.40	0.84	70	42	18.7	9.1
7	1.55	1.12	77	56	10.0	9.8

Extractiemethoden

Bewerking versnipperde bladeren

- 1 = end-over-end, 30 min, 10 rpm
- 2 = end-over-end, 120 min, 10 rpm
- 3 = horizontaal, 175 rpm, 15 min
- 4 = horizontaal, 175 rpm, 60 min
- 5 = ultrasoonbad, 5 min
- 6 = ultrasoonbad, 30 min
- 7 = 24 uur wegzetten

5. Chrysant, inzetverhouding 1:10

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.89	1.88	19	19	7.6	6.4
2	1.83	2.13	18	21	11.6	8.2
3	1.95	1.89	20	19	4.6	4.9
4	1.82	1.79	18	18	5.7	16.8
5	1.83	1.67	18	17	4.5	6.1
6	1.90	1.96	19	20	7.5	xxx
7	1.85	2.10	18	21	9.2	7.8

6. Chrysant, inzetverhouding 1:50

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	2.02	1.88	101	94	2.7	2.1
2	1.99	2.04	100	102	2.3	5.4
3	1.80	1.89	90	95	1.3	1.6
4	1.82	1.98	91	99	3.0	1.7
5	1.80	1.90	90	95	2.3	1.5
6	1.85	1.96	92	98	3.7	2.7
7	2.24	2.02	112	101	4.5	5.4

7. Tomaat, inzetverhouding 1:10

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	2.09	1.96	21	20	48.6	40.1
2	1.88	2.00	19	20	48.1	32.7
3	1.84	1.93	18	19	79.9	84.4
4	2.02	2.08	20	21	78.0	51.7
5	1.91	1.95	19	20	49.4	55.9
6	1.94	1.72	19	17	62.9	45.1
7	2.04	1.98	20	20	82.4	94.2

8. Tomaat, inzetverhouding 1:50

	inweeg (g)		toegevoegd water (ml)		fluorescentie	
	enk	dup	enk	dup	enk	dup
1	1.83	1.80	91	90	6.1	6.9
2	2.14	2.05	107	103	10.5	20.6
3	2.10	2.39	105	120	37.9	19.1
4	1.95	2.02	98	101	6.9	13.7
5	1.79	1.84	90	92	10.6	18.4
6	1.90	1.64	95	82	11.1	20.1
7	1.81	1.90	91	95	12.3	21.0

Spreiding in storing

Schudmethode 1

nummer	chrysant			tomaat		
	inweeg (g)	water (ml)	fluoreac	inweeg (g)	water (ml)	fluoreac
1	1.30	65	0.9	0.92	46	4.3
2	2.18	109	0.2	1.00	50	4.7
3	1.07	53	0.3	0.64	32	18.7
4	1.54	77	0.3	1.82	91	9.6
5	1.20	60	0.3	1.63	82	4.8
6	1.17	59	0.5	1.39	69	7.2
7	2.25	113	0.3	1.93	96	14.2
8	1.07	54	0.4	2.08	104	6.9
9	2.14	107	0.5	1.93	96	7.3
10	0.93	46	1.3	0.87	43	7.6
11	1.56	78	0.6	1.89	95	9.1
12	1.56	78	1.0	1.91	96	7.3
13	1.75	88	0.6	0.71	36	6.2
14	2.62	131	0.5	2.61	130	5.6
15	1.36	68	0.6	2.00	100	14.3
16	1.20	60	0.3	1.73	87	8.1
gemiddeld:			0.54			8.49
min:			0.2			4.3
max			1.3			18.7
spreiding:			1.10			14.40
st dev:			0.30			3.99
varcoeff:			56			47

Schudmethode 7

nummer	chrysant			tomaat			paprika		
	inweeg (g)	water (ml)	fluoresesc	inweeg (g)	water (ml)	fluoreac	inweeg (g)	water (ml)	fluoreac
1	2.34	117	1.2	1.95	97	8.3	4.71	236	2.2
2	2.75	138	1.3	1.62	81	6.1	2.79	140	3.7
3	2.49	124	0.7	1.23	61	6.8	3.75	188	3.3
4	1.51	75	0.9	1.32	66	4.4	2.30	115	3.6
5	1.91	95	0.6	1.65	82	7.7	2.02	101	3.3
6	1.28	64	4.1	1.79	89	9.6	3.50	175	2.5
7	0.84	42	0.5	1.19	60	5.8	1.53	77	2.2
8	1.05	52	1.6	1.05	53	5.5	2.18	109	2.4
9	2.04	102	0.4	1.66	83	4.6	3.59	180	1.5
10	1.17	58	0.6	1.25	63	5.9	3.72	186	1.6
11	0.95	48	0.4	1.27	63	8.4	3.47	174	2.3
12	1.61	80	0.4	1.48	74	5.3	2.68	134	2.4
13	1.83	91	3.9	1.37	68	6.2	1.91	96	1.1
14	1.32	66	0.4	1.75	87	10.9	1.86	93	2.2
15							3.95	198	1.1
16							1.30	65	3.4
gemiddeld:			1.21			6.82			2.43
min:			0.4			4.4			1.1
max			4.1			10.9			3.7
spreiding:			3.70			6.50			2.60
st dev:			1.24			1.91			0.84
varcoeff:			102			28			35

Additietesten

formule: $y = (C2 \cdot 50 \cdot x) / C1$

y = hoeveelheid op het blad aan te brengen vloeistof (ul)

C2 = concentratie in de meetoplossing (ug/l)

50 = inzetverhouding (ml/g)

x = inwieg (g)

C1 = concentratie op te brengen vloeistof (50 mg/l)

schudmethode 1

chrysaant						tomaat				
C2 (ug/l)	x (g)	y (ul)	water (ml)	conc (ug/l)	% van theor	x (g)	y (ul)	water (ml)	conc (ug/l)	% van theor
0	1.81	0.0	90	0.3	--	1.24	0	62	3.6	--
0	1.63	0.0	81	0.4	--	1.39	0	70	4.4	--
5	1.44	7.2	72	4.7	94	1.50	7.5	75	10.2	204
5	1.50	7.5	75	5.1	102	1.74	8.7	87	10.2	204
50	0.95	47	47	49.9	100	2.20	110	110	51.9	104
50	1.42	71	71	49.0	98	2.44	122	122	51.7	103
150	1.98	298	99	147	98	2.01	301	100	149	99
150	1.84	277	92	146	97	1.83	274	91	147	98

schudmethode 7

chrysaant						tomaat				
C2 (ug/l)	x (g)	y (ul)	water (ml)	conc (ug/l)	% van theor	x (g)	y (ul)	water (ml)	conc (ug/l)	% van theor
0	1.50	0.0	75	0.4	--	1.26	0.0	63	2.5	--
0	1.49	0.0	75	0.3	--	1.51	0.0	76	3.1	--
5	1.30	6.5	65	5.6	112	1.55	7.7	77	7.3	146
5	1.84	9.2	92	5.3	106	2.09	10.5	105	8.5	170
50	1.22	61	61	50.4	101	1.55	77	77	52.4	105
50	1.25	62	62	50.4	101	1.12	56	56	53.4	107
150	1.38	208	69	151	100	1.53	230	77	150	100
150	2.39	358	119	152	101	0.76	114	38	152	101

paprika

C2 (ug/l)	x (g)	y (ul)	water (ml)	conc (ug/l)	% van theor
0	1.93	0.0	97	3.4	--
0	1.49	0.0	75	1.8	--
5	2.06	10.3	103	8.2	164
5	2.95	14.8	148	7.1	142
50	3.69	185	185	52.3	105
50	1.32	66	66	52.0	104
150	2.65	398	133	151	100
150	6.08	912	304	152	101