

cb

Bibliotheek
Proefstation
Naaldwijk

A
2
L
31

PROEFSTATION VOOR TUINBOUW ONDER GLAS

Een spektrofotometrische bepaling van ureum in voedingsoplossing en in grond.

door: F.M. Leijn-van Dijk

Naaldwijk, september 1986

Intern verslag nr. 60

BIBLIOTHEEK
PROEFSTATION VOOR TUINBOUW
ONDER GLAS TE NAALDWIJK

02-10-86

INHOUDSOPGAVE

	<u>Pagina:</u>
1. Inleiding	1
2. Onderzoek	1
2.1 Optimalisatie van de golflengte	1
2.2 Gevoeligheid van de bepaling	1
2.3 Stabiliteit van de kleur	2
2.4 Helderheid kleurreagens	2
2.5 Testen van de spektrofotometrische ureum-bepaling volgens een standaardadditiemethode	2
2.6 Toepassing	4
3. Samenvatting	4
4. Literatuur	5
Bijlagen 1 t/m 5	

1. Inleiding

Ureum is een goedkope stikstofmeststof die gebruikt wordt in de tuinbouw. In de grond aanwezige micro-organismen zetten ureum om in nitraat. Deze omzetting verloopt via ammoniak en nitriet. Tot nu toe is in voorkomende gevallen voor onderzoekdoeleinden de ureumconcentratie indirect vastgesteld. Een stikstofbalans werd opgesteld. Hiertoe werden in het monster de ammoniak-, nitraat- en nitrietconcentraties bepaald. Uit deze gegevens werd de ureumconcentratie berekend. Vanuit het bemestingsonderzoek is behoefte ontstaan aan een directe methode voor het bepalen van ureum in voedingsoplossingen en in grond. Vanwege het incidentele karakter van het onderzoek is er geen uitgebreide literatuurstudie gedaan, maar is uitgegaan van een voorschrift opgenomen in een bulletin van het Engelse Ministerie van Landbouw (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1973). Enige aanpassing vooraf was noodzakelijk, omdat de in dit voorschrift beschreven spektrofotometrische ureumbepaling betrekking had op de analyse van ureum in voedingsstoffen. Het aangepaste voorschrift zijnde het werkvoorschrift tijdens het onderzoek is vermeld in bijlage 1. Er is vooral aandacht besteed aan optimalisatie van de meetcondities, aan het signaleren van eventuele storingen en aan standaardaddities in de te analyseren monsters. De bepalingsgrens is geschat op circa 100 mg ureum per liter. Aangezien de aangeboden voedingsoplossingen en gronden uit het bemestingsonderzoek maximaal 120 mg ureum per liter bevatten is het werkvoorschrift aangepast qua gevoeligheid. Tenslotte is op grond van de onderzoeksresultaten beschreven in dit verslag een nieuw voorschrift geschreven. Het nieuwe voorschrift is vermeld in bijlage 4.

2. Onderzoek

2.1 Optimalisatie van de golflengte

Van drie standaardoplossingen die 1.000, 2.000 en 4.000 mg ureum per liter bevatten, zijn volgens het werkvoorschrift de absorpties gemeten in het golflengtegebied van 390-480 nm. De resultaten van deze metingen zijn grafisch uitgezet in bijlage 2. De optimale golflengte, vastgesteld door aflezing uit de grafiek, is 421 nm.

2.2 Gevoeligheid van de bepaling

Van een reeks standaardoplossingen met concentraties van 0 tot en met 12.000 mg ureum per liter is de absorptie gemeten volgens het werkvoorschrift bij 421 nm. De resultaten van deze metingen zijn grafisch uitgezet in bijlage 3. Uit de grafiek blijkt dat de ijklijn lineair is tot een ureumconcentratie van 8.000 mg per liter. In dit lineaire gebied is de nauwkeurigheid niet groter dan $\pm 0,002$ absorptie wat overeenkomt met ± 11 mg ureum per liter voor oplossingen zonder enige andere componenten.

2.3 Stabiliteit van de kleur

Van een standaardoplossing bevattende 2000 mg ureum per liter is het kleurcomplex ontwikkeld volgens het werkvoorschrift.

Nadat is aangevuld tot 50,0 ml is de oplossing direct in een cuvet overgebracht. De absorptie is direct gemeten en na 4, 8, 13, 60 en 90 minuten, bij 421 nm. In tabel 1 zijn de gemeten absorpties vermeld.

Tabel 1: De absorptie van een standaardoplossing van 2000 mg ureum per liter, gemeten op verschillende tijden.

Tijd (min.)	Absorptie
0	0,380
4	0,387
8	0,385
13	0,385
60	0,382
90	0,390

Uit tabel 1 blijkt dat de kleur van de meetoplossing na 5 minuten stabiel is en gedurende 90 minuten stabiel blijft. Vervolgens is van een reeks ureumstandaardoplossingen de absorptie volgens het werkvoorschrift gemeten bij 421 nm. Nadat de meetoplossingen 24 uur bewaard zijn bij kamertemperatuur is nogmaals de absorptie gemeten. Uit de resultaten van deze metingen is vastgesteld dat de kleur van de ureumstandaardoplossingen 24 uur stabiel blijft.

2.4 Helderheid kleurreagens

Het kleurreagens is voor gebruik gecentrifugeerd, omdat het zwevende deeltjes bevatte. Het gecentrifugeerde kleurreagens is volgens het werkvoorschrift toegevoegd aan de ureumstandaarden.

De absorpties van de standaardoplossingen zijn gemeten bij 421 nm en vergeleken met de absorpties van standaardoplossingen waaraan volgens voorschrift niet gecentrifugeerd kleurreagens is toegevoegd. Uit de resultaten van de metingen is vastgesteld dat het niet nodig is het kleurreagens voor gebruik te centrifugeren.

2.5 Testen van de spektrofotometrische ureumbepaling volgens een standaard additiemethode

De standaardadditiemethode is toegepast op een voedingsoplossing, twee grondsoorten en een standaardoplossing die 200 mg ureum per liter bevatte. Van de gronden zijn 1:2 volume-extracten gemaakt. Van ieder monster is telkens 25 ml gepipetteerd en hieraan is respectievelijk 0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 ml van een standaardoplossing die 5.000 mg ureum per liter bevat, toegevoegd. De bepaling van de ureumconcentratie in deze oplossingen is uitgevoerd volgens het werkvoorschrift, waarbij de absorptie is gemeten bij 421 nm. Een blanco is meegenomen, deze bestaat uit 25 ml monster waaraan alle reagentia zijn toegevoegd behalve het 4-dimethylaminobenzaldehyde, dat de gele kleur veroorzaakt. De resultaten van de standaardadditie van ureum zijn vermeld in tabel 2.

Tabel 2: Resultaten van standaardadditie van ureum aan een voedingsoplossing, grondextracten en een ureumstandaardoplossing

Monster	Kenmerk	mg ureum per liter toegevoegd	mg ureum per liter teruggevonden	Procentage ureum teruggevonden	Monster	Kenmerk	mg ureum per liter toegevoegd	mg ureum per liter teruggevonden	procentage ureum teruggevonden
voedingsoplossing	kleurloos	0	90		grondextract II	zavellichtgeel	0	100	
		1.000	1080	99,0			1.000	1120	102,0
		2.000	2060	98,5			2.000	2180	104,0
		3.000	3020	97,7			3.000	3120	100,7
		4.000	4000	97,8			4.000	4100	100,0
		5.000	4900	96,2			5.000	5130	100,6
		blanco	53*				blanco	86*	
grondextract I	donkergeel	0	0		ureumstandaardoplossing 200 mg/l.	kleurloos	0	110	
		1.000	940	94,0			1.000	1200	109,0
		2.000	1960	98,0			2.000	2200	104,5
		3.000	2960	98,7			3.000	3260	105,0
		4.000	3960	99,0			4.000	4290	104,5
		5.000	4990	99,8			5.000	5280	103,4
		blanco	130*				blanco	130*	

* De ureumconcentraties van de blanco-oplossingen zijn berekend met lineaire regressie.

Uit tabel 2 blijkt dat na standaardadditie van ureum aan een voedingsoplossing gemiddeld 97,8 procent van de toegevoegde ureum is teruggevonden. Voor grondextract I is dit gemiddeld 97,9 procent, voor grondextract II 101,5 procent en voor de ureumstandaardoplossing van 200 mg per liter 105,3 procent. De ureumconcentraties van de monsters zonder toevoeging van ureum en van de blanco-oplossingen variëren van 0 tot 130 mg per liter. Deze concentraties liggen in de buurt van de bepalingsgrens, die geschat is op circa 100 mg ureum per liter, aangezien een meetsignaal $\leq 2\%$ van de absorptie van de hoogste ureumstandaardoplossing als niet reproduceerbaar is te beschouwen. Het feit dat de ureumconcentraties in de monsters zonder toevoeging dicht bij deze bepalingsgrens liggen kan de juistheid van de teruggevonden percentages aan geaddieerd ureum in enige mate hebben beïnvloed. De kleur van de grondextracten beïnvloedt de bepaling van ureum niet. In tabel 3 zijn de regressie-vergelijkingen vermeld die berekend zijn uit de resultaten van de additie van ureum aan een voedingsoplossing, aan grondextracten en aan een ureum standaardoplossing van 200 mg per liter.

Tabel 3: Regressie-vergelijkingen berekend uit de resultaten van additie van ureum aan een voedingsoplossing, grondextracten en een ureumstandaardoplossing.

Monster	Regressie-vergelijking $y = AX + B$	Correlatie- coëfficiënt r
voedingsoplossing	A = 0,0020 B = 0,036	1,00
grondextract I	A = 0,0019 B = 0,008	1,00
grondextract II	A = 0,0019 B = 0,052	1,00
ureumstandaard- oplossing 200 mg per liter	A = 0,0020 B = 0,052	1,00

Uit tabel 3 blijkt dat de correlatie tussen absorptie en concentratie van de vier monsters lineair is en dat de regressie-vergelijkingen van de voedingsoplossing en de grondextracten overeenkomen met de regressie-vergelijking van de ureumstandaardoplossing. Hieruit blijkt dat de voedingsoplossing en de grondextracten de ureumbepaling niet storen.

2.6 Toepassing

De aangeboden voedingsoplossingen uit het bemestingsonderzoek bevatten volgens het proefschem van het onderzoek maximaal 120 mg ureum per liter. De ureumconcentratie in de grond is naar verwachting lager. De ureumconcentraties in de aangeboden monsters liggen dicht bij de bepalingsgrens van de ureumbepaling volgens het werkvoorschrift, die geschat is op circa 100 mg ureum per liter. Daarom zijn de standaardoplossingen aangepast, dit is grafisch weergegeven in bijlage 5 en is de hoeveelheid in bewerking genomen monster aangepast, 150 ml in plaats van 25 ml. Een nieuw voorschrift is geschreven en vermeld in bijlage 4.

3. Samenvatting

Een spektrofotometrische ureumbepaling voor voedingsstoffen is na aanpassing vooraf, zie werkvoorschrift in bijlage 1, geoptimaliseerd en getest volgens een standaardadditiemethode toegepast op een voedingsoplossing, grondextracten en een ureumstandaardoplossing. Vastgesteld is dat in de voedingsoplossing en in de grondextracten, met name door de gele kleur van de grondextracten, geen storing van de ureumbepaling optreedt. De bepalingsgrens is geschat op circa 100 mg ureum per liter. Aangezien de ureumconcentraties in de aangeboden voedingsoplossingen en gronden uit het bemestingsonderzoek in de buurt van de bepalingsgrens liggen is het werkvoorschrift hieraan verder aangepast.

Op grond van de onderzoeksresultaten beschreven in dit verslag is een nieuw voorschrift geschreven, vermeld in bijlage 4. Een directe methode voor het bepalen van ureum in voedingsoplossingen en in grond is nu voorhande.

Nadelen van deze methode zijn:

de grote hoeveelheid monster die nodig is voor een analyse en de bewerkelijkheid van de methode. Het tussentijds raadplegen van literatuur heeft een aantal publicaties opgeleverd betreffende de ureumbepaling. Deze kunnen dienen als uitgangspunt voor een mogelijk vervolg van het onderzoek, indien wenselijk.

Het gaat hierbij voornamelijk om methoden die minder bewerkelijk en/of gevoeliger zijn en om een methode met behulp van HPLC (zie literatuur 2, 3 en 4).

4. Literatuur

1. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1973.
Technical Bulletin 27, The Analysis of Agricultural Materials
2. Houba, V.J.G., et al, 1985 Soil Analysis, Part 2: Procedures, 9-12
3. Douglas, L.A., Bremner, J.M., 1970 Analytical Letters, 3 (2), 79-87.
4. Grossenbacher, H., Cook, A.M., Hütter, R., 1985. Journal of Chromatography, 331, 161-167.

De bepaling van ureum in voedingsoplossing en in grond (werkvoorschrift)

Ureum reageert met 4-dimethylaminobenzaldehyde tot een geel complex. Kleurcorrectie is nodig. De stikstofbestanddelen worden neergeslagen met zinkferrocyanide.

Reagentia:

4-dimethylaminobenzaldehyde oplossing: 4 gram oplossen in 20 ml HCl 38% p.a. en verdunnen tot 200 ml met 2-propanol.

zoutzuur: 0,6 M.

Verdun 50 ml HCl 38% tot 1 liter met demi-water.

kaliumferrocyanide-oplossing: 53 gram oplossen in 500 ml demi-water

natriumacetaatoplossing: 68 gram oplossen in 500 ml demi-water

zincacetaatoplossing: 219 gram oplossen in demi-water, voeg 30 ml ijsazijn 100% toe en verdun tot 1 liter met demi-water.

ureumstandaardoplossing: 5.000 mg per liter

5,000 gram ureum p.a. oplossen in 1 liter demi-water.

Uitvoering van de analyse

Pipetteer 0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 en 25,0 ml ureumstandaardoplossing maatkolven van 250 ml. Dit komt overeen met respectievelijk 25 - 50 - 75 - 100 en 125 mg ureum. Pipetteer van de monsters 25 ml (eventueel meer of minder) in maatkolven van 250 ml.

Breng het volume op 150 ml. met demi-water. Voeg toe 5 ml zoutzuur 0,6 M. Laat 30 minuten staan en schud regelmatig om. Voeg toe 10 ml natriumacetaatoplossing en laat 15 minuten staan. Voeg toe 5 ml zincacetaatoplossing en meng. Voeg toe 5 ml kaliumferrocyanide-oplossing, meng en vul aan tot 250,0 ml met demi-water. Filtreer over Whatman 540.

Pipetteer 10 ml van het filtraat in maatkolven van 50 ml. Voeg toe 10 ml 4-dimethylaminobenzaldehyde-oplossing en vul aan tot 50,0 ml met demi-water.

Na 10 minuten de absorptie meten in een 5 cm cuvet bij 435 nm met behulp van een spektrofotometer. Absorptie A.

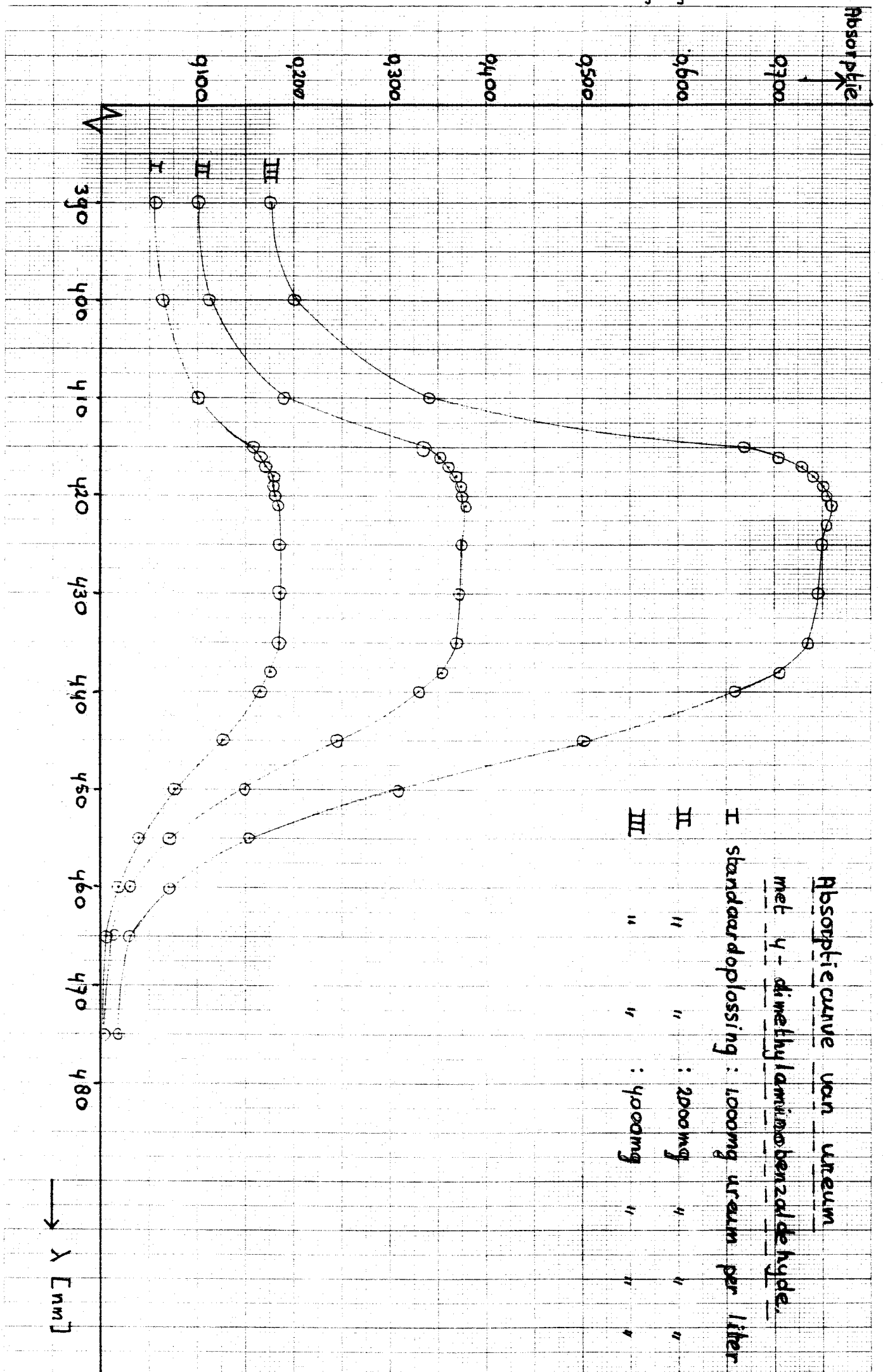
Voer een kleurcorrectie uit door 10 ml filtraat vijf maal te verdunnen en te meten onder dezelfde condities. Absorptie B.

Berekening:

Aflezing ijkcurve in mg ureum in bewerking

mg ureum per liter: $\frac{\text{aflezing} * 1.000}{x}$

x = ml monster gepipetteerd.



Y-accurve van ureum met 4-dimethylaminobenzaldehyde

Absorptie

2,00

1,90

1,80

1,70

1,60

1,50

1,40

1,30

1,20

1,10

1,00

0,900

0,800

0,700

0,600

0,500

0,400

0,300

0,200

0,100

0

2000

4000

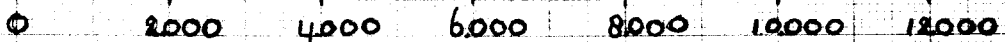
6000

8000

10000

12000

→ mg ureum per liter



UREUMBEPALING (in voedingsoplossing en in grond)

Apparatuur:

Spektrofotometer

Maatkolven: 50 en 250 ml

Reagentia:

Ureumstandaardoplossing: 2.500 mg per liter

Los op 2,5000 gram H_2NCONH_2 p.a. in 1 liter ged. H_2O

Zoutzuur: 0,6 M

50 ml HCl 38% p.a. aanvullen tot 1 liter met ged. H_2O

Natriumacetaat: 1 M

Los op 68,0 gram $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ p.a. in 500 ml ged. H_2O

Zinkacetaat: 1 M

Los op 54,8 gram $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a. in ged. H_2O , voeg toe 7,5 ml CH_3COOH 100% p.a. en vul aan tot 250 ml met ged. water.

Kaliumhexacyanoferraat (II): 0,2 M

Los op 26,5 gram $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ p.a. in 250 ml ged. H_2O

Kleurreagens:

Los op 10,0 gram 4-(Dimethylamino)benzaldehyde, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$ p.a. in 50 ml HCl 38% p.a. en vul aan tot 500 ml met 2-propanol p.a.

Zoutzuur - propanolmengsel:

50 ml HCl 38% p.a. aanvullen tot 500 ml met 2-propanol p.a.

Uitvoering van de analyse:

Pipetteer 0,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 ml van de ureumstandaardoplossing in maatkolven van 250 ml. Dit komt overeen met respectievelijk 0 - 12,5 - 25 - 37,5 - 50 mg ureum.

Neem van de voedingsoplossingen en van de 1:2 volume-extracten van grond A ml (150 ml of minder) monster in bewerking in een maatkolf van 250 ml. Breng het volume op ca. 150 ml met ged. H₂O. Voeg toe 5 ml zoutzuur 0,6 M en schud regelmatig om gedurende 30 minuten. Voeg toe 10 ml natrium-acetaat, meng en laat 15 minuten staan. Voeg toe 5 ml zinkacetaat, meng en voeg vervolgens 5 ml kaliumhexacyanoferraat (II) toe en meng. Vul aan tot 250,0 ml en filtreer over Watman 540.

Pipetteer 25 ml van het filtraat in een maatkolf van 50 ml.

Voeg toe 10 ml kleurreagens en vul aan tot 50,0 ml met ged. H₂O. Meet na 10 minuten de absorptie bij 421 nm in een 5 cm cuvet ten opzichte van ureumstandaard van 0 mg per liter met behulp van een spektrofotometer.

Absorptie A.

Voer een kleurcorrectie uit door opnieuw 25 ml van het filtraat in een maatkolf van 50 ml te pipetteren. Voeg toe 10 ml zoutzuur - propanol-mengsel en vul aan tot 50,0 ml met ged. H₂O. Meet na 10 minuten de absorptie bij 421 nm in een 5 cm cuvet ten opzichte van ged. H₂O met behulp van een spektrofotometer. Absorptie B.

Berekening:

Aflezingscurve in mg ureum in bewerking

mMol ureum per liter extract: $\frac{\text{aflezing} * 1.000}{A} * 60,06$

Waarin:

A = hoeveelheid in bewerking genomen monster (ml)

De resultaten opgeven in 2 decimalen.

CURVEN VAN WREUW MET 4-DIMETHYLA MINOBENZALDEHYDE

I WERKVOORSCHRIFT.

II NIEUW VOORSCHRIFT.

