

2513 + 2516

PROEFSTATION VOOR TUINBOUW ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Stam boek nr.

1824

De bepaling van calcium in water en waterige grondextrakten
door middel van een semi-automatische complexometrische titratie.

door:

S.S. de Bes

P.A. van Dijk

Naaldwijk, december 1979

intern rapport.nr.56

222 1526

INHOUD:

	Pag.
1.0 Inleiding	1
2.0 Principe	1
3.0 Onderzoek	
3.1. Keuze monstervolume	2
3.2. Keuze ijkstandaard(en)	4
3.3. Invloed zwevende deeltjes	4
3.4. Storingen	5
3.5. Vergelijking met AAS	7
3.6. Reagentia	7
4.0 Samenvatting	8
5.0 Literatuur	9
6.0 Bedieningsvoorschrift Calcette	Bijlage
7.0 Voorschrift Ca-bepaling in water en extracten	Bijlage

1.0 Inleiding

Sinds 1974 is de calciumbepaling door middel van AAS (atoomabsorptie-spectrofotometrie) in gebruik op het researchlaboratorium (De Bes en Van Dijk, 1974). Deze methode gaf wat lagere uitkomsten dan de tot dan gebruikte complexometrische, titratie met EDTA. Met name de talrijke storingen van metaalionen met EDTA en de "moeilijke" kleur-omslag van het als indikator gebruikte murexide, leidden ertoe dat er met de AAS-methode een betere duplicerbaarheid en een versnelling van de analyseduur werd bereikt.

Niettemin kleven er aan de AAS-methode ook enige bezwaren. Hiervan zijn de storingen van vooral SO_4^{--} en P, de niet onbelangrijke signaalruis en de steeds noodzakelijke grote verdunningen het belangrijkste..

In de eerste plaats is er behoefte aan een goede referentiemethode om de juistheid van bestaande analysemethoden permanent te kunnen controleren en om incidenteel aangeboden monsters snel en adequaat te kunnen analyseren.

Bovendien was er in 1978 veel belangstelling voor invoering van de Ca-bepaling bij het routine grondonderzoek. Deze bepaling is inmiddels reeds ingevoerd. Het aantal Ca-analyses zal derhalve sterk toenemen. Zelfs wanneer het routine grondonderzoek volledig zal zijn geautomatiseerd blijft er daar de behoefte aan één of meerdere alternatieve Ca-bepalingsmethoden.

Na oriëntering op hetgeen de instrumentenmarkt te bieden heeft, leek een semi-automatische Ca-titrator de beste perspectieven te bieden. Het onderzoek dat hiernaar is ingesteld, alsmede de resultaten hiervan worden in dit rapport beschreven.

2.0 Principe

De titrator waarmee het onderzoek is verricht is een "Calcette type 4008" van het fabrikaat Precision Systems, Inc.

De werking ervan berust op het volgende principe:

In een reaktiecel die tevens als cuvet dient wordt in alkalisch milieu een hoeveelheid calceïne-indikator (2,7-Bis [bis (carboxymethyl) aminomethyl] -fluoresceïne), $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{13}$ opgelost, Wanneer hieraan Ca^{++} -ionen worden toegevoegd (te analyseren oplossing) ontstaat er een

calcium-calceïnekomplex. Een halogeenlamp is continu op de reaktiecel gericht. Hierdoor gaat het calcium-calceïnekomplex extra fluoresceren. Dit licht wordt opgevangen op een fotocel. Een op deze wijze opgewekt elektrisch stroompje stuurt een buretmotor welke zoveel titratievloeistof toegevoegd aan de reaktiecel totdat het extra fluorescentiesignaal weer is genivelleerd. Als titratievloeistof wordt EGTA gebruikt. Het calcium-EGTA-komplex is sterker dan het calcium-calceïne-komplex. Bovendien is EGTA een specifiekere complexvormer voor calcium dan bijvoorbeeld EDTA. Hierdoor wordt storing door magnesium voorkomen. De titratie geschiedt in sterk alkalisch milieu.

Toevoeging van KOH vindt plaats totdat de zuurgraad een waarde van pH 13 bereikt. Beneden deze pH is de fluorescentie van het calceïne zelf te sterk en kan er bovendien toch nog magnesium worden meegetitreerd. Zowel Ba^{++} als Sr^{++} worden evenwel meebepaald.

De ijking vindt plaats door titratie van een bekende standaardoplossing. De resultaten kunnen naar keuze rechtstreeks in mmol Ca per liter of in meq Ca per liter worden afgelezen.

Het monsterverbruik kan worden gekozen uit drie volumina te weten: 20, 40 en 80 ul.

3.0 Onderzoek

3.1. Keuze monstervolume

Nagegaan is welke invloed het monstervolume heeft op de resultaten en op de reproduceerbaarheid.

Een standaardoplossing welke 5 meq Ca per liter bevat, is hiertoe 11 maal achtereen geanalyseerd bij gebruik van 80, 40 en 20 ul monstervolume. De resultaten hiervan zijn opgenomen in tabel 1.

Monstervolume	80 ul	40 ul	20 ul
resultaten in meq Ca per liter			
1	4.99	5.01	4.57
2	5.18	4.97	5.79
3	4.96	5.33	4.59
4	5.10	4.96	5.68
5	4.86	4.88	4.40
6	5.08	4.99	4.95
7	4.93	5.36	4.88
8	5.12	4.61	6.12
9	5.01	5.04	4.72
10	4.98	5.14	5.70
11	4.95	5.07	4.40
m	5.01	5.03	5.07
s	0.097	0.205	0.629
v.c.	1.9%	4.1%	12.4%

Tabel 1. Invloed monstervolume op analyseresultaten

Uit tabel 1 blijkt dat de gemiddelde resultaten goed overeenstemmen, ongeacht het monstervolume. De reproduceerbaarheid is sterk afhankelijk van het monstervolume. Bij 80 ul is een lage variatiecoëfficiënt gevonden en bij 20 ul een zeer hoge. Wanneer een zeer grote precisie wordt verlangd, verdient de keuze van 80 ul de voorkeur. De keuze van 40 ul is evenwel niet slecht. De variatiecoëfficiënt blijft binnen aanvaardbare grenzen, de snelheid van analyseren is groter, doordat de cel minder snel is uitgeput en bij hogere Ca-koncentraties kan direkt in één titratie worden bepaald tot ongeveer 80 meq Ca per liter. Vooral voor grotere series van monsters met onbekende en sterk variërende Ca-koncentraties is de keuze van 40 ul verantwoord. Bij lage concentraties < 5 meq Ca per liter is de keuze van 80 ul te prefereren.

3.2. Keuze ijkstandaard(en)

Volgens de handleiding wordt aanbevolen om te ijken met een calciumstandaardoplossing welke 5 meq Ca per liter bevat. Het ijken met één standaard houdt vrijwel altijd een bepaald risico in. Om hierin enig inzicht te krijgen is een reeks van standaarden getitreerd. Tevens wordt hierbij nagegaan of de ijking lineair is.

In tabel 2 zijn de resultaten vermeld:

standaard	teruggevonden
5 meq Ca.l ⁻¹	5.05
10	10.03
20	20.18
50 (80 ul)	50.28
50 (40 ul)	50.06

Tabel 2. Ijkstandaarden voor titratie

Uit tabel 2 blijkt dat alle standaarden zeer goed worden teruggevonden. Dit geldt ook voor de standaard met 50 meq Ca per liter. Deze standaard moet met gebruik van een monstervolume van 80 ul in twee fasen worden getitreerd en met 40 ul kan dit in één keer. Het blijkt bovendien dat dit titratiesysteem over een groot concentratiegebied een lineair gedrag vertoont. Instellen met één standaardoplossing, mits deze nauwkeurig en betrouwbaar is bereid en bewaard, is afdoende.

3.3. Invloed zwevende deeltjes

Nagegaan is of er enige invloed op de analyseresultaten wordt uitgeoefend door eventueel zwevende deeltjes. Deze zwevende deeltjes zouden mogelijk verstrooiing van het opvallende of fluorescerende licht kunnen veroorzaken. Een tiental oppervlakte- en bronwatermonsters is op twee manieren geanalyseerd met behulp van de titrator.

Eerst werd de bovenstaande heldere vloeistof genomen. Daarna is het monster flink geschud en is er opnieuw een portie genomen.

Beide porties zijn steeds direkt voor het titreren nog eens flink geschud. De resultaten van deze titraties zijn in duplo vermeld in tabel 3.

Merk	heldere vloeistof			gemengd ongefiltreerd		
	e	d	m	e	d	m
1493	4.89	4.78	4.84	4.94	4.79	4.89
1494	9.26	9.36	9.31	9.15	9.39	9.27
1495	6.61	6.72	6.66	6.51	6.51	6.51
1496	5.18	5.30	5.24	5.51	5.36	5.44
1497	9.02	9.09	9.06	9.12	9.21	9.17
1498	5.49	5.52	5.50	5.46	5.44	5.45
1499	19.79	20.20	19.90	20.02	19.96	19.99
1500	12.74	12.64	12.69	12.68	12.83	12.76
1501	21.56	21.47	21.52	21.47	21.28	21.38
1502	6.08	5.97	6.07	6.00	6.19	6.10
—						
m	-	-	10.07	-	-	10.09
s	-	-	0.083	-	-	0.102
v.c.	-	-	0.8%	-	-	1.0%

Tabel 3. Invloed zwevende deeltjes

Uit tabel 3 blijkt dat er nauwelijks verschillen worden gevonden in zowel Ca-koncentraties alsmede in dupliceerbaarheid tussen de analyses van de heldere bovenstaande vloeistof en de analyses van ongefiltreerde en goed gemengde porties in één en hetzelfde watermonster. De verontreinigingen in het ongefiltreerde deel waren evenwel niet zodanig dat er veel grove deeltjes aanwezig waren. Bovendien wordt er voor elke titratie slechts zeer kleine hoeveelheden monsters gebruikt. Toch is het raadzaam om alle te analyseren monsters op gelijke wijze voor te behandelen. Filtratie over Whatman no. 540 is inmiddels als standaard filtratiemethode, bij het wateronderzoek ingevoerd.

3.4. Storingen

Hoewel er weinig storingen bekend zijn, slechts Ba^{++} en Sr^{++} worden meegetitreerd, kan het nuttig zijn om onverdachte invloeden van andere in de monsters aanwezige componenten na te gaan.

Het gehele systeem is speciaal ontwikkeld voor analyses in de medische laboratoria.

De toepassing bij het onderzoek van water en grond levert mogelijk ongekende invloeden op. Deze zijn getracht na te gaan door middel van standaardadditie. Aan een drietal watermonsters zijn bekende hoeveelheden standaardoplossing toegevoegd en geanalyseerd met behulp van de titrator en door middel van AAS. In tabel 4 zijn de resultaten van deze additie vermeld.

Merk	toegevoegd		AAS		Calcette			
		meq.l ⁻¹	meq.l ⁻¹	%	meq.l ⁻¹	%	%	
1493		0	3.66	-	-	3.91	-	-
1493	+	2.50	6.17	2.51	100.4	6.30	2.39	95.6
1493	+	4.99	8.63	4.97	99.6	8.78	4.87	97.6
1493	+	7.49	11.09	7.43	99.2	11.36	7.45	99.5
\bar{m}		4.99	7.39	4.97	99.6	7.59	4.90	98.3
1497		0	5.42	-	-	5.50	-	-
1497	+	2.50	8.00	2.58	103.2	7.86	2.36	94.4
1497	+	4.99	10.31	4.99	100.0	10.51	5.01	100.4
1497	+	9.98	15.28	9.86	98.8	15.38	9.88	99.0
\bar{m}		5.82	9.75	5.81	99.8	9.81	5.75	98.8
1499		0	11.45	-	-	11.73	-	-
1499	+	7.49	19.00	7.55	100.8	19.36	7.63	101.9
1499	+	12.48	23.62	12.17	97.5	24.15	12.42	99.5
1499	+	17.47	28.23	16.78	96.1	29.30	17.57	100.6
\bar{m}		12.48	20.58	12.16	97.5	21.14	12.54	100.5
\bar{m}		7.76	12.57	7.65	98.6	12.85	7.73	99.6

Tabel 4. Standaardadditie bij AAS en titrator.

Uit tabel 4 blijkt dat er gemiddeld de toegevoegde hoeveelheden calcium bij beide methoden goed wordt terug gevonden. Incidenteel vindt er wel eens een afwijking plaats, deze zijn niet systematisch.

Het blijkt dat er met de titrator iets hogere concentraties worden gevonden dan met behulp van AAS. Hier staat tegenover dat de via AAS-verkregen resultaten iets minder nauwkeurig zijn vanwege de sterke verdunningen die noodzakelijkerwijs hebben plaatsgevonden. Grote verschillen zijn uit dit onderzoek niet gebleken.

3.5. Vergelijking met AAS

De resultaten verkregen met behulp van de "Calcette" zijn vergeleken met de resultaten door middel van AAS verkregen. Voedingsoplossingen en watermonsters zijn volgens beide methoden in duplo geanalyseerd. In totaal zijn er 83 monsters vergeleken. De gevonden Ca-koncentraties varieerden van ± 0.5 tot ± 15 meq Ca per liter.

Er is een zeer goede overeenstemming gevonden, te weten:

$$\begin{aligned} \bar{y} &= 0.991 \bar{x} - 0.03; & r &= 0.998 \\ y &= \text{Ca via Calcette} & x &= \text{Ca via AAS} \end{aligned}$$

In het algemeen blijken de resultaten door titreren verkregen een fraktie lager te liggen dan de door AAS verkregen resultaten.

Wat betreft de dupliceerbaarheid is het volgende gevonden.

methode met behulp van Calcette:	$s = 0.098$	$v.c. = 1.07\%$	$\bar{m} = 9.04$
methode via AAS:	$s = 0.127$	$v.c. = 1.41\%$	$\bar{m} = 9.15$

De dupliceerbaarheid van de Calcette-methode blijkt iets beter dan die van de AAS-methode. Beide methoden blijken evenwel voldoende dupliceerbaar voor toepassing bij grond- en wateronderzoek op het research-laboratorium.

3.6. Reagentia

Hoewel alle benodigde chemikalien via de leverancier gebruiksklaar kunnen worden geleverd, is het vooral economisch aantrekkelijker om de reagentia zelf te bereiden.

Dit is voor wat betreft de 0.001 m EGTA-oplossing, de ijkstandaard-oplossing en de 1 m KOH-oplossing geen enkel probleem. Zelfs de EGTA-oplossing behoeft niet gesteld te worden, mits de concentratie van de calciumstandaardoplossing exakt bekend is. De titrator wordt dan op deze concentratie ingesteld.

Iets moeilijker is het om de juiste calceïnekoncentratie in de titratiecel te verkrijgen. Ook deze celvulling is direkt leverbaar. De vulling bestaat uit een mengsel van KCl en calceïne.

Na enig experimenteren met zelf gemaakte KCl-calceïne-mengsels is gebleken dat 100 mg van een KCl-calceïne-mengsel in de verhouding van 500:1 gewichtsdeel goede overeenstemming vertoont met de door de fabrikant geleverde standaardcelvulling.

Bij het afwegen dient er alleen op te worden gelet dat er niet te veel calceïne, via de wand van de container waarin het droge voorraadmengsel wordt bewaard, in de cel wordt gebracht. Het duurt dan namelijk enige tijd voordat de cel in voldoende mate een basis fluorescentie vertoont. (Vele malen een standaardoplossing aan de cel toevoegen, voordat de buretmotor door het gefluoresceerde licht wordt gestart).

4.0 Samenvatting

De toepasbaarheid van een semiautomatische titrator voor de bepaling van calcium in waterig milieu is nagegaan. Vergelijking is gemaakt met de bestaande methode door middel van atoomabsorptiespektrometrie.

Gebleken is dat beide methoden goed overeenstemmende resultaten geven. De dupliceerbaarheid is van beide methoden voldoende. De titratie-methode is storingsvrij gebleken. Vooral wanneer er slechts enkele Ca- analyses worden verlangd kan de titrimetrische methode enige tijdwinst opleveren, vooral als er vooraf geen inzicht is in het niveau van de Ca-koncentraties. Bij de AAS-methode moet er vaak tijdens de meting een keuze van de juiste verdunningsfaktor worden gemaakt.

Bij aanbod van grote series monsters kan de AAS-methode enige tijdwinst opleveren. Vooral als deze metingen kunnen worden verricht met een volautomatisch AAS-instrument.

Dit laatste kan met name een voordeel zijn bij het gewasonderzoek, zodat nader onderzoek in deze is aan te bevelen.

De Ca-bepaling in waterig milieu kan dus zowel titrimetrisch als atoomabsorptiespektrometrisch worden verricht. Invoering van de titrimetrische methode houdt geen vervanging, maar een aanvulling van methoden in. Wederzijdse controle van twee methoden volgens principieel verschillende technieken is hiermede gerealiseerd.

Een algemeen bedieningsvoorschrift voor het gebruik van de titrator alsmede een analysevoorschrift voor de Ca-bepaling in water en grond zijn bij dit rapport gevoegd onder de hoofdstukken 6.0 en 7.0.

Deze voorschriften zijn na aanschaf van de titrator min of meer routinematig in gebruik genomen vanaf november 1978.

5.0 Literatuur

Bes, S.S. de en P.A. van Dijk.

De bepaling van calcium door middel van atomaire absorptie in water en grond.

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas.

Intern Rapport, maart 1974 10 pp.

6.0 Bedieningsvoorschrift semi-automatische Ca-titrator,

"Calcette"

- 1) Zet schakelaar "POWER" op stand "ON".
- 2) Druk knop "PROBE" in.
Laat het instrument minstens 15 minuten opwarmen, in deze periode punt 3 uitvoeren.
- 3) Prepareer en aktiveer de titratiecel als volgt:
weeg 100 mg KCl-calceïne-mengsel in een schone en lege cel.
Voeg KOH 1 m toe, tot juist onder rode stippellijn.
Veeg eventuele druppels aan buitenkant af en sluit af met dekseltje en homogeniseer.
Verwijder dekseltje en plaats cel in de titrator.
Draai zwarte schijf aan onderzijde geheel uit, plaats cel in deze schijf en draai schijf weer in het instrument.
Licht deksel van instrument. Draai schijf zover vast, totdat roerder gaat werken.
Laat minstens 5 minuten aktiveren. Cel blijft 4 uur bruikbaar.
Herhaal punt 3 zodra tijdens de analyse de letters "REFILL" oplichten.
- 4) Vul het reservoir aan de achterzijde met 0.001 M EGTA.
- 5) Zet bekerglaasje onder de samplerpunt.
Zet knop "BURETTE" aan rechterzijde op stand "PRIME". Controleer de slangetjes in het instrument op de aanwezigheid van luchtbelletjes. Spoel door totdat alle belletjes zijn verdwenen. (eventueel tikken met vingertoppen).
Zet knop "BURETTE" op stand "OPERATE".
Sluit het deksel.
- 6) Kies het voorgeschreven monstervolume met knop "SAMPLE SIZE".
- 7) Kies de voorgeschreven eenheid met knop "UNITS".

- 8) IJk het instrument als volgt:
Veeg samplerpunt af met tissue.
Houd de voorgeschreven standaardoplossing onder de sampler en zorg dat de tip in de vloeistof blijft steken.
Druk knop "SAMPLE" in. Verwijder de standaard pas als het lampje "SAMPLE" oplicht. Veeg de sampler opnieuw af.
Druk knop "TITRATE" in.
Zodra letters "READ" oplichten het resultaat aflezen.
N.B.: Bij een nieuwe cel gebeurt dit vaak pas nadat enige malen de standaardoplossing is opgezogen. Tussendoor moet dan knop "PROBE" worden ingedrukt.
- 9) Herhaal deze procedure enige malen, totdat de laatste twee aflezingen binnen de voorgeschreven grenzen liggen. Voorschrift vervolgen met punt 11.
Is dit na 8 aflezingen nog niet bereikt, dan achtereenvolgens de punten 5, 8 en 9 herhalen. Wordt hierna het gewenste resultaat nog niet bereikt, dan handelen volgens punt 10.
- 10) (Re)calibreer het instrument als volgt:
Bepaal de procentuele afwijking van het onder punt 9 gevonden gemiddelde resultaat ten opzichte van de gegeven concentratie van de standaardoplossing.
Open het deksel.
Draai knop "CALIBRATE" aan rechterzijde in de richting "INCREASE" in geval van een negatieve afwijking of in de richting "DECREASE" in geval van een positieve afwijking.
Elk schaaldeel corrigeert voor 1.0% afwijking.
Sluit het deksel.
Herhaal punten 8 en 9.
- 11) Verricht de titraties volgens punt 8.
Bij aflezing moet op het volgende worden gelet:
Bij elke monstervolume behoort een maximale afleeswaarde te weten:
bij 80 ul in één titratie maximaal ± 42 meq of ± 21 mmol Ca per l
bij 40 ul in één titratie maximaal ± 84 meq of ± 42 mmol Ca per l
bij 20 ul in één titratie maximaal 99.99 meq of ± 84 mmol Ca per l

Bij aflezing van deze waarden dient er een tweede titratie te worden uitgevoerd zonder opnieuw monster te laten opzuigen. Noteer de eerste aflezing en druk de knoppen "SAMPLE" en "TITRATE" in.

Tel het resultaat van de tweede aflezing op bij de eerste. Eventueel verdunnen is een goed alternatief.

- 12) Controleer om de circa 10 metingen en achteraf de standaardoplossing.
- 13) Zet na beëindiging van de analyses schakelaar "POWER" op stand "OFF".
- 14) Verwijder de gebruikte cel door de zwarte schijf aan de onderkant geheel uit te draaien.
Neem cel weg en draai de schijf los-vast.
- 15) Bij tijdelijke beëindiging van de analyses (maximaal 4 uur) dient er steeds vanaf punt 8 te worden gehandeld.

7.0 CALCIUMBEPALING - 01/03/04 (titrimetrisch)

Apparatuur:

flesjes, 30 ml

titrator; type Calcette 4008, fabrikaat; Precisions Systems Inc.

Reagentia:

KCl; p.a.

Calceïne; p.a.

KCl/Calceïne-mengsel; 500 delen KCl p.a. en 1 deel calceïne p.a.

goed mengen en droog bewaren.

KOH 1 M; 56 gram KOH p.a. oplossen tot 1.0 liter in ged. H₂O

EGTA 0.001 M; 0.380 gram EGTA p.a. en 10 ml KOH 1 M oplossen tot 1,0 liter in ged. H₂O.

Calcium hoofd standaardoplossing 1.000 ppm Ca;

Vul de inhoud van 1 ampul Titrisol nr. 9943 aan tot 1.0 liter met ged. H₂O.

Calcium ijkstandaard 2.45 mmol Ca per liter;

Vul 25.0 ml hoofdstandaardoplossing aan tot 250.0 ml met ged. H₂O.

Uitvoering van de analyse:

Filtreer de monsters over filtreerpapier Whatman no. 540.

In de heldere monsters Ca bepalen volgens het "Bedieningsvoorschrift semi-automatische Ca-titrator".

Voorgeschreven instel- en keuze mogelijkheden:

- 6) 40 ul
- 7) mmol per liter
- 8) 2.45 mmol Ca per liter
- 9) tussen 2.38 en 2.52.

Berekening:

De resultaten via de titrator verkregen staan rechtstreeks uitgedrukt in mmol Ca per liter. De gemiddelde resultaten opgeven in twee decimalen.

Maximaal toelaatbare verschillen tussen de duplowaarnemingen:

0.19 mmol Ca per liter.