

Stamboeknr.: 3495

~~1443~~
2510 + 6423 3

STICHTING PROEFSTATION VOOR TUINBOUW ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Een spektrofotometrische bepaling voor nitraat in gewas door
middel van Continuous-flow

Door:

C.W. van Elderen

P.A. van Dijk

Naaldwijk, september 1982

internverslag nr. 58

2235277

INHOUD

	pagina
1. Inleiding	1
2. Principe van de bepaling	1
3. Onderzoek	1
3.1 Apparatuur	1
3.2 Ontwikkeling van de meetmethode	2
3.3 Storingen	5
3.4 Bepalingsgrens	5
3.5 Dupliceerbaarheid	5
4. Samenvatting en konklusie	6
5. Literatuur	7
Bijlagen 1, 2 en 3	

Inleiding

In toenemende mate wordt het nitraatgehalte in groenten aan normen gebonden. Recentelijk is vastgesteld dat het nitraatgehalte in andijvie en spinazie niet hoger mag zijn dan 4000 mg per kg vers gewicht. Deze ontwikkeling zal zich nog verder voortzetten, zodat een belangrijke toename van het aantal monsters en een grote verscheidenheid aan groentegewassen te verwachten is. Door deze ontwikkeling is een snellere analysemethode gewenst. Het resarchlaboratorium heeft op het ogenblik twee verschillende analysemethoden tot zijn beschikking.

1. de o-Xylenol methode. Deze methode is echter zeer arbeidsintensief en tijdrovend. Wel staat deze methode bekend als betrouwbaar en is daarom geschikt als referentiemethode (lit. 1).
2. de ion-specifieke elektrode. Deze methode is snel en gemakkelijk uitvoerbaar. Nadeel van deze methode is dat de gevonden waarden ca 10% te hoog kunnen zijn. Eerder is gekonstateerd dat voor sommige gewassen de elektrode slecht voldoet (lit. 2).

Een volledig geautomatiseerde bepaling is mogelijk met de Skalar continuous-flow autoanalyser (lit. 3).

Met deze methode is een bepalingssnelheid van veertig monsters per uur haalbaar.

Het door de fabrikant gegeven meettraject loopt van 0-50 mmol NO₃⁻/l.

Door dit lange meettraject is de methode bruikbaar voor alle gewassen zonder dat er verdunningen toegepast moeten worden.

In dit verslag wordt de continous-flow methode vergeleken met de twee eerder genoemde methoden. Tevens is een bepalingvoorschrift opgesteld.

Voornoemde analysemethoden worden verder in dit verslag aangeduid als respectievelijk: o-Xy methode; ISE-methode en CF-methode.

2. Principe van de bepaling

Voor de bepaling van nitraat in water en waterige extracten met behulp van CF wordt gebruik gemaakt van de reductie van nitraat tot nitriet volgens reactievergelijking:



De reductie wordt uitgevoerd met behulp van een cadmium kolom. Om de reductiecapaciteit van deze kolom te vergroten zijn de cadmiumkorrels geactiveerd met koper. Het monster dient tijdens de reductiereactie vrij te zijn van organische verbindingen, wat wordt gerealiseerd door het monster door een dialysator te leiden. Uit bovenstaande reactievergelijking blijkt dat de reductie pH afhankelijk is, terwijl tevens rekening moet worden gehouden met de vorming van salpeterigzuur. Het pH gebied waarin gewerkt moet worden is dus zeer beperkt. De optimale pH ligt tussen de 8,0 en 9,3.

Dit pH-traject wordt gerealiseerd door het gebruik van 2,5% ammonium-chloride oplossing. Het gevormde nitriet wordt nu bepaald door diazotering van sulfanilamide. Het gediazoteerde sulfanilamide geeft met N-1-naphthyl-ethylenediamine een rood gekleurd aminoazo-kompleks dat geschikt is voor fotometrische bepaling (lit. 4).

3. Onderzoek

3.1. Apparatuur

De apparatuur bestaat uit een Skalar-autoanalyser voorzien van een nitraat-nitriet module. Het flowschema is opgenomen als bijlage 2.

Voor de dataverwerking is gebruik gemaakt van de labtech LT 100 P piekhoogte detector.

3.2. Ontwikkeling van de meetmethode

Naar aanleiding van het opgegeven meettraject is een standaardlijn van 5-50 mmol NO₃⁻/l gemeten. Deze ijkcurve is gekonstrueerd in figuur 1. De standaard van 50 mmol NO₃⁻/l geeft weliswaar een zeer hoge extinktie (E = 1,72) maar gezien de lineariteit en de goede correlatiecoëfficiënt (r = 0,99991) zal dit in praktijk weinig problemen geven. Om de CF-methode te kunnen vergelijken met de ISE- en de o-Xg-methode zijn 25 luchtdroge gewasmonsters van een tiental verschillende gewassen volgens de drie methoden geanalyseerd. Voor de bepaling met CF is de extractie methode overgenomen van de bepaling met de ISE. In bijlage 3 zijn de analyseresultaten in tabelvorm vermeld. Uit deze gegevens is figuur 2 gekonstrueerd. De relaties tussen de methoden zijn weergegeven in tabel 1.

Relatie	r
CF = 0,958 ISE - 34	0,9978
CF = 1,074 O-Xy + 29	0,9774

Tabel 1. Regressievergelijkingen tussen de CF-, ISE- en o-Xy-methoden met bijbehorende correlatiecoëfficiënt.

methode	\bar{m} (mmol NO ₃ ⁻ /kg)	S (mmol NO ₃ ⁻ /kg)	V.C.
CF	900	34	3,7%
ISE	973	68	7,0%
o-Xy	846	56	6,7%

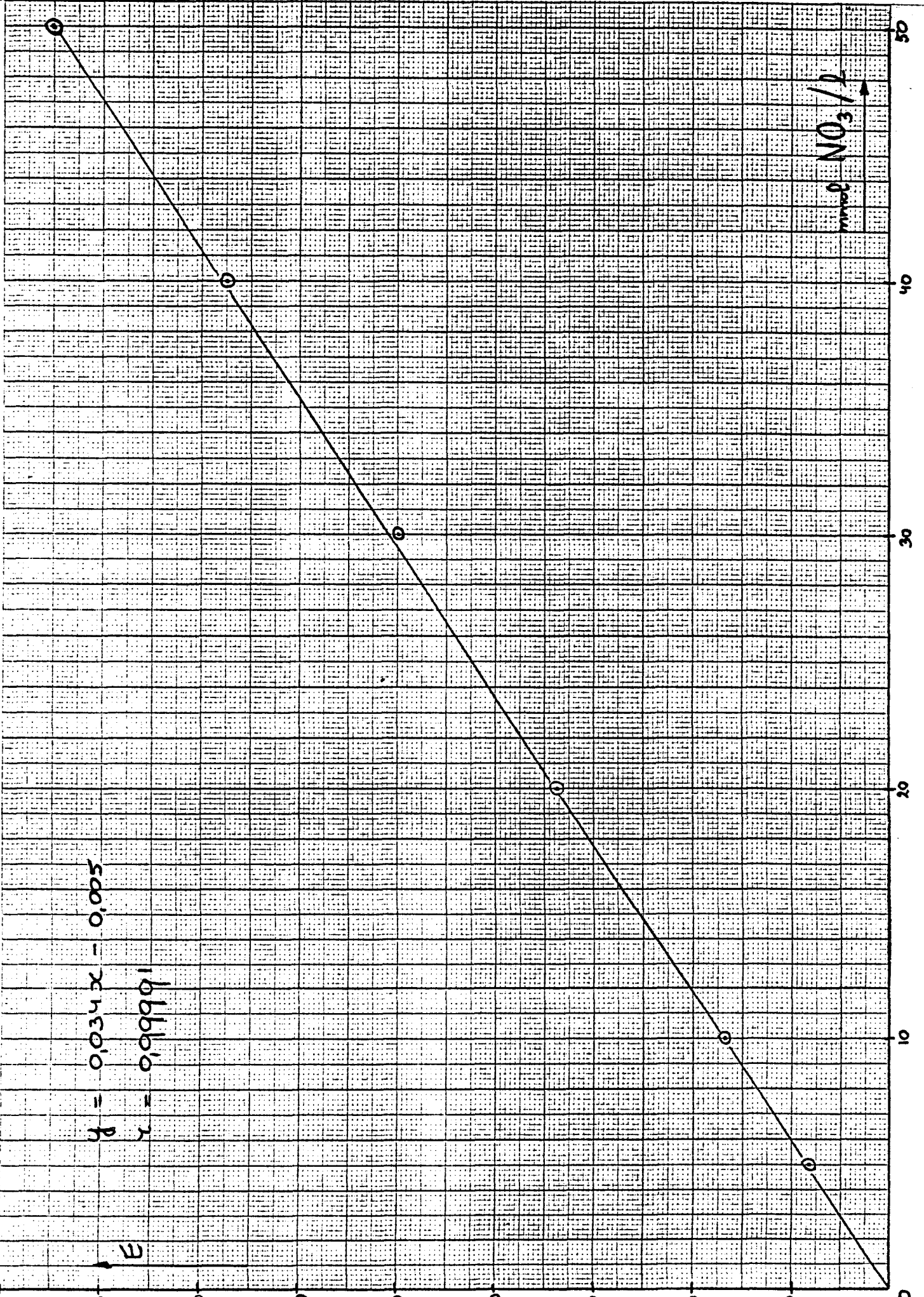
Tabel 2. Gemiddelde, standaardafwijking en variatiecoëfficiënt berekend uit de waarnemingen van bijlage 3.

Uit tabel 1 kan gekonkludeerd worden dat de CF-methode redelijk overeenkomt met zowel de ISE- als de o-Xy-methode. De cijfers gevonden met CF liggen gemiddeld 8% lager dan de cijfers gevonden met ISE en 6% hoger dan de cijfers gevonden met o-Xy.

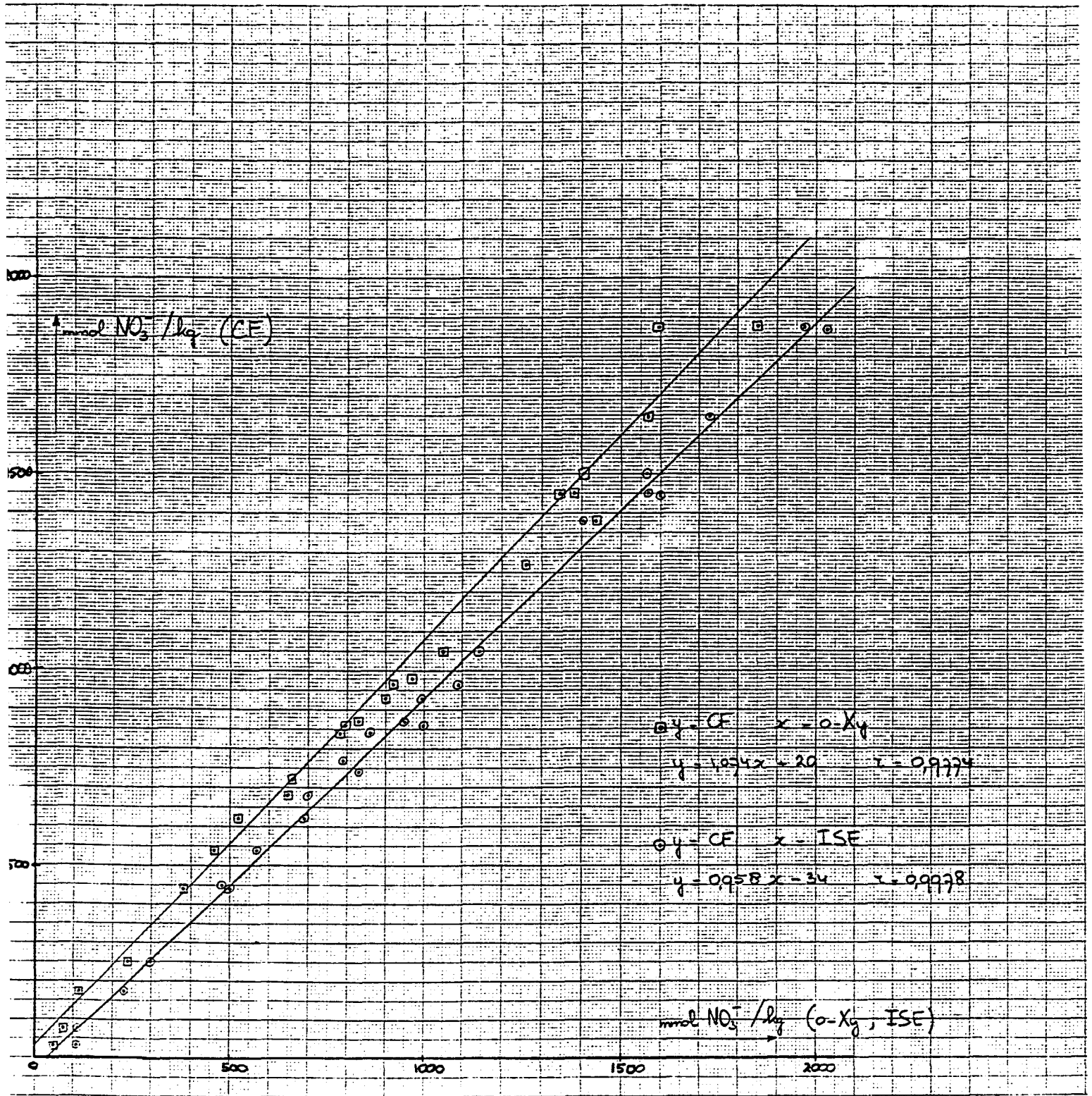
Uit tabel 2 blijkt dat de standaardafwijking en variatiecoëfficiënt van CF gunstiger zijn dan van ISE en o-Xy. Uit het een en ander volgt dat CF betrouwbaar is over het gehele meettraject en toepasbaar is voor alle gewassen.

De gewasmonsters zijn tevens onderzocht op nitriet, welke verbinding niet kon worden aangetoond. Dit was te verwachten omdat het luchtdroog materiaal betrof. In vers materiaal zal nog enig onderzoek naar het voorkomen van nitriet gewenst zijn.

Figuur 1. Standaardlijn nitraatbepaling in gewas met behulp van de CF-methode.



Figuur 2. Vergelijking van de CF-methode met de I.S.E.- en de o-Xy-methode.



3.3. Storingen

De bij de CF-methode toegepaste colorimetrische bepaling is in de literatuur bekend als vrijwel storingsvrij (lit. 5). De enige storingen die kunnen optreden worden veroorzaakt door een troebeling of de eigen kleur van het monster. Deze storingen worden vermeden door het gebruik van een dialysator. Wanneer een monster nitriet bevat, wordt dit mee-paasd.

3.4. Bepalingsgrens

Teneinde de bepalingsgrens vast te stellen zijn acht standaardoplossingen tienmaal gemeten. De verhouding van de opeenvolgende standaarden bedroeg telkens 1:2. De gemeten waarden moeten in overeenstemming zijn met deze verhouding. Wanneer dit niet het geval is, dan moeten standaardoplossingen met hogere gehalten gekozen worden. De bepalingsgrens is vastgesteld volgens: $\text{bepalingsgrens} = \frac{\text{konc. standaard} \times \text{standaardafw.} \times 2}{\text{gemeten konc.}}$

mmol NO ₃ ⁻ /l	\bar{m}	s	v.c.	bep. grens
0,4	0,14	0,0516	36,9%	-
0,8	0,53	0,0823	15,5%	0,25
1,6	1,4	0,0789	5,7%	0,18
3,2	3,1	0,160	5,2%	0,33
6,4	6,4	0,218	3,4%	0,44
12,8	12,8	0,217	1,7%	0,43

Tabel 3. Schatting van de bepalingsgrens van de nitraatbepaling met behulp van de CF-methode.

Uit tabel 3 blijkt dat na 0,8 mmol NO₃⁻/l de meetsignalen evenredig met de standaardconcentratie toenemen. Bij de schatting van de bepalingsgrens zijn de waarden kleiner dan 0,8 mmol NO₃⁻/l buiten beschouwing gelaten. De gemiddelde standaardafwijking zal ongeveer 0,2 mmol NO₃⁻/l bedragen. De bepalingsgrens kan gesteld worden op 0,3 mmol NO₃⁻/l. Daar de variatiecoëfficiënt bij lage gehalten hoog is, kunnen de gehalten lager dan 1,0 mmol NO₃⁻/l in praktijk niet voldoende nauwkeurig worden bepaald. Voor monsters met lage nitraat gehalten kan een lage standaardlijn gebruikt worden. Hiervoor is wel een kleine verandering in de monster-reagens verhouding op de module nodig. Op deze manier wordt de bepalingsgrens verlaagd.

3.5. Duplicerbaarheid

In een aantal monsters is het nitraatgehalte in duplo bepaald volgens het voorschrift. Uit deze gegevens is de duplicerbaarheid berekend. De gevonden cijfers zijn hiertoe in drie klassen verdeeld, te weten 50 - 500 mmol NO₃⁻/kg; 500 - 1250 mmol NO₃⁻/kg en 1250 - 2500 mmol NO₃⁻/kg. Bij de berekening van de duplicerbaarheid is gevonden:

50 - 500 mmol NO ₃ ⁻ /kg	S = 6 mmol NO ₃ ⁻ /kg
	V.C. = 6,1%
500 - 1250 mmol NO ₃ ⁻ /kg	S = 26 mmol NO ₃ ⁻ /kg
	V.C. = 3,5%
1250 - 2500 mmol NO ₃ ⁻ /kg	S = 28 mmol NO ₃ ⁻ /kg
	V.C. = 2,0%

De waarnemingen zijn opgenomen in tabel 4.

Tabel 4. Waarnemingen voor de bepaling van de dupliceerbaarheid van de nitraatbepaling met behulp van de CF-methode.

50 - 500		500 - 1250		1250 - 2500	
e	d	e	d	e	d
90	85	1050 *	1135	1595	1590
95	85	750	710	1610	1560
60	55	540	600	1640	1600
75	70	990 *	1150	1310	1340
70	60	860	895	1875	1860
80	75	525	535	1690	1640
60	55	1195	1130	1260	1220
70	60	950	885	1665	1630
70	55	800	780	2170 *	2080
95	85	865	600	1965	1945
80	65	515	560	1545	1420
80	70	395	425	1370	1420
100	95	1105	1050	1445	1390
85	80	1035	1000	1305	1355
90	80	1045	1020	1380	1405
55	50	1030	1020	1355	1315
80	80	780	720	1475 *	1340
90	85	885	825	1335	1265
105	100	655	675	1240	1250
125	120	750	780	1270	1290
135	125	620	605	1285	1235
110	105	600	500	1300	1320
100	95	580	585	1445	1375
55	60	780	775	1370	1380
95	100	860	840	1330	1360
100	110	695	670	2010 *	1900
285	295	670	665	1340	1300
90	90	530	545	1310	1365

De getallen met * zijn beschouwd als significant en derhalve niet in de berekening opgenomen. Als norm hiervoor is de 3s-grens gehanteerd. De gevonden standaardafwijkingen en variatiecoëfficiënten zijn dermate laag, dat gesproken kan worden van een goede dupliceerbaarheid. De variatiecoëfficiënt voor de lage monsters is wat hoger. In praktijk zal dit weinig consequenties hebben, omdat de nitraat-koncentraties in de aangeboden monsters veelal boven de 750 mmol NO₃⁻/kg zullen liggen.

4. Samenvattingen konklusies

De bepaling van nitraat in gedroogde gewasmonsters met behulp van de CF-methode is snel en eenvoudig uit te voeren. In gedroogd gewas komt geen nitriet voor. In verse monsters is nog onderzoek op het voor komen van nitriet gewenst.

De CF-methode is vergeleken met de ISE- en de o-Xy-methode. De overeenkomst tussen deze methoden is goed. De correlatiecoëfficiënten bedragen respectievelijk 0,9978 en 0,9774. De waarden gevonden met de CF-methode liggen wat lager dan die met de ISE-methode en wat hoger dan die met de o-Xy-methode. De betrouwbaarheid van de CF-methode is goed. De gemiddelde variatiecoëfficiënt

bedraagt ongeveer 3,5% bij een bepalingsgrens van 1,0 mmol NO₃⁻/l.
Aan de hand van de opgedane ervaringen is een bepalingsvoorschrift opgesteld.
Dit voorschrift is opgenomen als bijlage 1.

5. Literatuur

1. Schouwenbrug, Ir. J.Ch. van. Methods of Analysis of plant material.
2. Solingen, W.H. van den Berg, P.A. van Dijk, 1977. Toepassing van de ion-selektieve elektrode voor de bepaling van nitraat in gewas.
Proefstation voor Tuinbouw onder Glas te Naaldwijk. Intern verslag nr. 20.
3. Skalar Analytical, 1981. Handleiding nitraat-nitriet module.
4. Nydahl, F, 1976.
On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite bij cadmium.
Talanta. Vol 23. pp 349 - 357.
5. Standard Methods for the examination of water and wastewater.
14 th. Edition. 1975.

Bijlage 1.1

Voorschrift voor de automatisch bepaling van nitraat in water, grondextrakten en gewas.

Apparatuur Skalar continuous-flow systeem:

Monsterwisselaar

Slangenpomp

Nitraat/nitriet module; zie bijlage 2 voor flowschema

Fotometer

Rekorder; Kipp & Zn, type BD 40/41

Piekhoogte detector; labtech, type LT 100 P

Reagentia

Ammoniumchlorideoplossing

los 25 g NH_4Cl pa op in 1 liter ged. H_2O voeg voor gebruik 2 ml brij 35 toe.

Kleurreagens

voeg 150 ml H_3PO_4 85% gek.pa.toe aan ca 700 ml ged. H_2O in een maatkolf van 1,0 l. voeg toe 10 g sulphaniïamide en roer tot alles opgelost.

voeg toe 0,5 g naphthylethylene-diamine-dihydro-chloride en vul aan tot 1,0 l met ged. H_2O voeg voor gebruik 2 ml brij 35 toe.

Zoutzuur; 4 N

vul 333 ml HCl 37 % gek.pa aan tot 1 liter met ged. H_2O

Kopersulfaatoplossing

- los 20 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ pa op in 1 liter ged. H_2O .

Standaardoplossingen

Nitraat hoofdstandaardoplossing 500 mmol $\text{NO}_3^-/1$

los 12,6388 g KNO_3 pa. (minstens 1 uur gedroogd bij 105 °C) op in 250,0 ml ged. H_2O .

Tussenstandaardoplossing, 100 mmol $\text{NO}_3^-/1$

50,0 ml hoofdstandaardoplossing aanvullen tot 250,0 ml met ged. H_2O .

Standaardreeks; 5 - 50 mmol $\text{NO}_3^-/1$

50 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	50,0 ml	tussenstandaardoplossing aanvullen tot 100,0 ml met ged. H_2O .
40 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	40,0 ml	Idem
30 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	30,0 ml	Idem
20 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	20,0 ml	Idem
10 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	10,0 ml	Idem
5 mmol $\text{NO}_3^-/1$:	5,0 ml	Idem.

Nitrietstandaardoplossing; 50 mmol $\text{NO}_2^-/1$

los 0,345 g NaNO_2 pa. op in 100,0 ml ged. H_2O .

Uitvoering van de analyse

Water

Alle watermonsters filtreren over Whatman nr. 40. In het filtraat direkt nitraat bepalen met behulp van de CF, volgens het bedieningsvoorschrift.

De resultaten staan direkt uitgedrukt in mmol $\text{NO}_3^-/1$.

Grond

In grondextrakten direct nitraat bepalen met behulp van de CF, volgens bedieningsvoorschrift.

De resultaten staan direkt uitgedrukt in mmol NO₃⁻/l extract.

Gewas

Luchtdroog gemalen gewas en ged. H₂O in de verhouding 1:50 (1 g gewas : 50 ml water) gedurende 30 minuten schudden met behulp van de schudmachine.

Filtreer over Whatman nr. 40. In de filtraten direkt nitraat bepalen met behulp van de CF, volgens het bedieningsvoorschrift. De resultaten staan uitgedrukt in mmol NO₃⁻/l.

Berekening in mmol NO₃⁻/kg luchtdroog gewas:
aflezing x 50

Resultaten opgeven in gehele getallen.

Instelling Skalar CF-autoanalyser

0.1 Nitraat/nitriet module

0.2 Ged. H₂O

0.6 Ammoniumchloride en kleurreagens

1.1 kuvet : 10 mm; ø 1,8 mm; opvulstuk : 40 mm

1.2 540 nm ; 340 -650 nm

2.2 5 mm/min

2.4 100 mV - VAR. De hoogste standaardoplossing op 90-95% van de rekorderuitslag draaien met knop "VAR".

3.1 44 sec.

3.2 44 sec.

3.3 2 sec.

4.2 a. 1; b. 60%; c. 40; d. Off; e. off; f. 5; g. pas.

4.6 De standaardwaarden zijn gelijk aan de concentratie van de standaarden.

4.8 Na instelling van de hoogste standaardwaarde mogen de volgende standaarden geen groter verschil dan ± 0,5 geven.

Regeneren van de cadmium-kolom

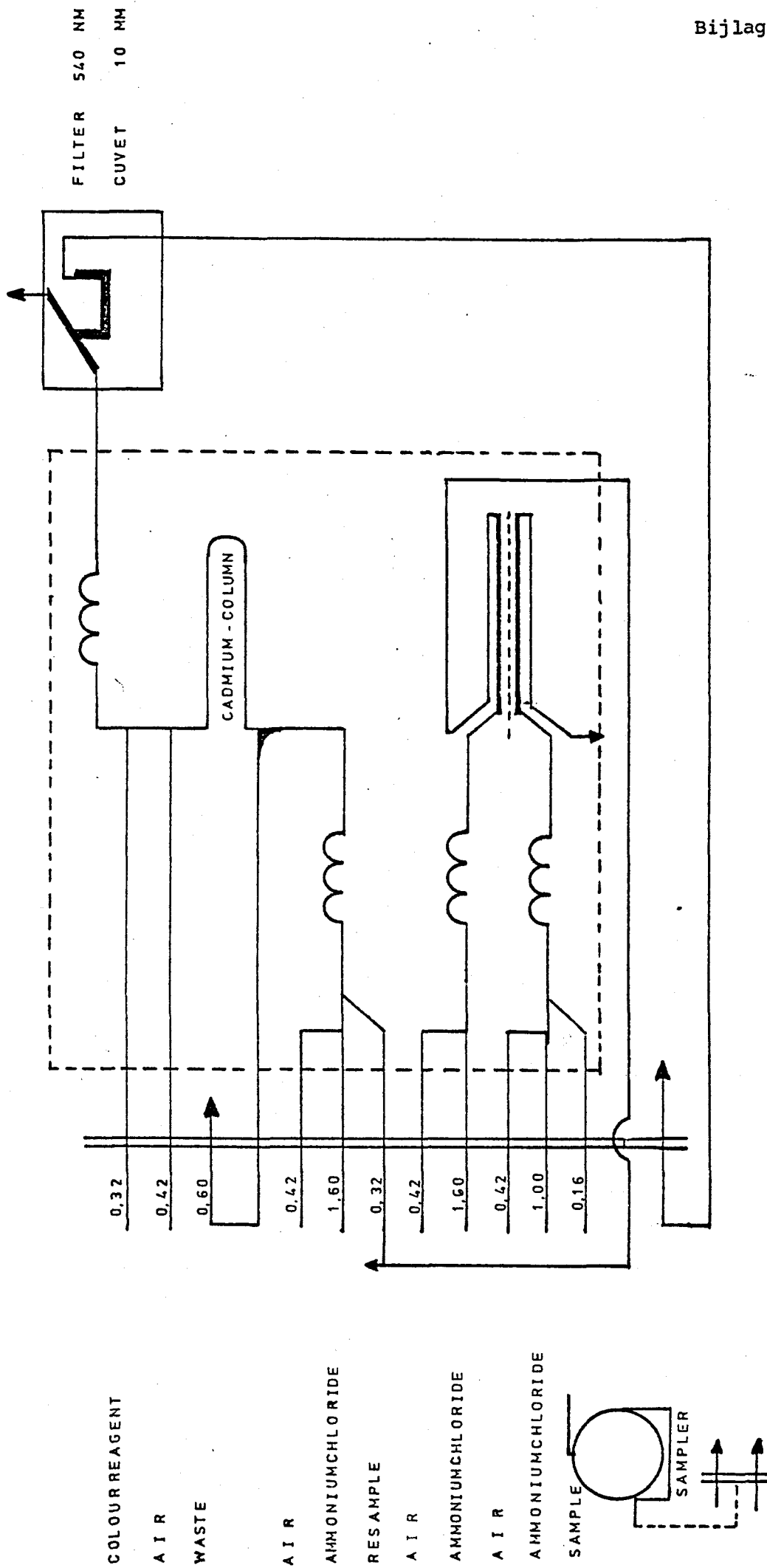
De cadmiumkorrels voorzichtig uit de kolom verwijderen door tikken met een potlood. De korrels opvangen in een bekersglasje en 30 ml HCl 4N toevoegen. Een klein schepje cadmium korrels (Merck art nr. 2001) toevoegen om enig verlies te compenseren. Een kwartier roeren. De korrels af spoelen met ged. H₂O .

Vervolgens 30 ml kopersulfaatoplossing toevoegen om de korrels te aktiveren.

Na enige tijd zal de oplossing koperdeeltjes vertonen. De korrels zijn nu donker gekleurd. Was de korrels met ged. H₂O tot er geen koperdeeltjes meer aanwezig zijn. Zet een trechter op de kolom en vul deze met ged. H₂O.

Breng de korrels in kleine hoeveelheden over in de kolom, zorg ervoor dat de korrels ten alle tijde onder vloeistof gehouden worden, wegens oxidatie met lucht. Zorg voor een goede aaneensluiting in de kolom door tikken met een potlood. Sluit de kolom af met stukjes slang en plaats de kolom in het CF systeem zonder dat er luchtbellens komen. Het CF systeem is nu klaar voor gebruik. Voordat met de analyses begonnen wordt, de reductiecapaciteit van de kolom controleren. Meet hiertoe nitriet en nitraat-standaarden van gelijke concentratie. De gevonden concentratie bij nitraat moet minimaal 95 % zijn van de gevonden concentratie bij nitriet.

NITRITE + NITRATE



Bijlage 3.

Gewassoort	mmol NO ₃ ⁻ /kg						
	CF		ISE		o-Xy		
	e	d	e	d	e	d	
sla	810	865	860	865	806	757	
	1365	1390	1430	1380	1491	1376	
	1495	1505	1590	1540	1451	1361	
raapstelen	685	680	725	680	671	637	
	895	825	1100	900	771	815	
	1915	1835	2000	1935	1693	1497	
ijpegels - knol	760	775	830	745	748	772	
	loof	620	625	725	660	586	459
radijs - loof	730	750	865	800	683	637	
	knol	555	520	600	535	421	497
	loof	200	150	270	195	94	139
knol	275	220	345	250	174	301	
	spinazie	1000	930	1150	1035	932	905
amaranthus	445	435	520	475	375	388	
	postelein	1005	920	1155	1010	872	960
paksoi	1480	1415	1610	1530	1332	1354	
	875	860	985	915	825	829	
	1465	1425	1665	1540	1380	1378	
chinesekool	1895	1850	2095	1960	1842	1859	
	960	895	1065	925	840	957	
	1650	1640	1685	1765	1595	1539	
selderij	1095	1010	1250	1060	984	1117	
	475	430	495	470	440	504	
	bloemkool	90	60	125	110	64	88
m	55	10	140	85	28	80	
	924	876	1019	927	844	848	