

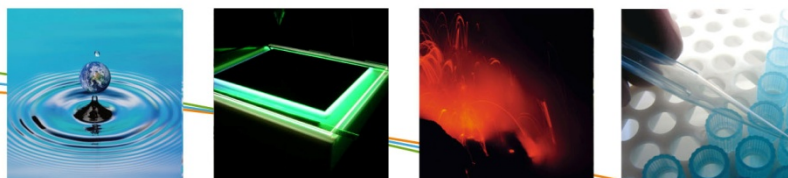
Eindrapport

Validatie meetmethodiek voor bepaling van plantbeschikbare P in ammoniumlactaat

L. Goetelen, Groep AN, C. Vanhoof en K. Tirez

Studie uitgevoerd in opdracht van de Vlaamse Landmaatschappij
2011/MANT/R/017

Februari 2011



VITO NV

Boeretang 200 – 2400 MOL – BELGIE
Tel. + 32 14 33 55 11 – Fax + 32 14 33 55 99
vito@vito.be – www.vito.be

BTW BE-0244.195.916 RPR (Turnhout)
Bank 435-4508191-02 KBC (Brussel)
BE32 4354 5081 9102 (IBAN) KREDBEBB (BIC)

Alle rechten, waaronder het auteursrecht, op de informatie vermeld in dit document berusten bij de Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek NV ("VITO"), Boeretang 200, BE-2400 Mol, RPR Turnhout BTW BE 0244.195.916. De informatie zoals verstrekt in dit document is vertrouwelijke informatie van VITO. Zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van VITO mag dit document niet worden gereproduceerd of verspreid worden noch geheel of gedeeltelijk gebruikt worden voor het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin aangewend worden

SAMENVATTING

Momenteel is voor de bepaling van de parameter plantbeschikbaar P in ammoniumlactaat extractie een ontwerpversie in het BAM compendium ter beschikking. Echter voor deze nieuw toegevoegde parameter (in het kader van mestadviezen) is het nodig een validatie onderzoek uit te voeren binnen het Vito laboratorium. Vertrekkende vanuit een literatuurstudie en in combinatie met informatie/vragen verkregen van de erkende laboratoria werd een validatieprogramma uitgevoerd, waarbij de invloed van interferenties en keuze recipiënten werd onderzocht, alsook de mogelijkheid tot meting met ICP-AES werd nagegaan.

Tijdens dit onderzoek werden 10 bodems met verschillende bodem-pH (pH<7) gebruikt om de bepaling van de plantbeschikbare P te valideren met een spectrofotometrische bepaling na een ammoniumlactaatextractie (P-AL).

Tijdens het validatie onderzoek werden volgende factoren nagegaan:

- De herhaalbaarheid van de P-AL extractie volgens de referentiemethode (§ 2.5.1). Onder referentiemethode wordt verstaan dat de procedure zoals beschreven in het BAM compendium (NEN 5793), wordt gevolgd. Indien de parameter niet werd gespecificeerd werd deze ingevuld op basis van literatuur of eigen expertise;
- De invloed van de bewaringscondities van de geconcentreerde extractievloeistof (§ 2.5.2);
- De invloed van licht en het type recipiënt (glas/plastic) bij de extractie (§2.5.4);
- De invloed van centrifugatie ipv filtratie na de extractie (§ 2.5.5);
- De invloed van de afgewogen hoeveelheid monster bij de extractie met behoud van dezelfde ratio bodem: extractievloeistof (§ 2.5.5);
- de invloed van de pH van de extractievloeistof bij de extractie (§ 2.5.6)
- Bepaling van P met ICP-AES na zuurdestructie in vergelijking met de spectrofotometrische bepaling (§ 2.5.7).

Een overzicht van de geteste invloedsfactoren wordt gegeven in Tabel 1. De in het groen gemarkeerde velden geven de "referentie" of aanbevolen methode aan. De oranje gemarkeerde velden duiden de verschillen aan tov deze referentiemethode.

reeks	Materiaal	pH	Bewaring	Extractie	Centrifugatie	Concentratie
			stockopl. Licht/donker	Licht/donker	/filtratie	g/ml
1	plastic	3,75	L, 25°C	L	F	2,5/50
2	plastic	3,75	D, 25°C	L	F	2,5/50
3.1.1	glas	3,75	D, 4°C	L	F	2,5/50
3.1.2	plastic	3,75	D, 4°C	L	F	2,5/50
3.1.3	glas	3,75	D, 4°C	D	F	2,5/50
3.1.4	glas	3,75	D, 4°C	L	C	2,5/50
3.1.5	glas	3,75	D, 4°C	L	F	5/100
3.2	glas	3,6	D, 4°C	L	F	2,5/50
3.3	glas	3,9	D, 4°C	L	F	2,5/50

Tabel 1: Overzicht van geteste parameters

Uit de bekomen resultaten valt af te leiden dat de geconcentreerde extractievloeistof bij voorkeur in het donker bij 4°C wordt bewaard. De extractie dient uitgevoerd te worden in glazen recipiënten.

Gebruik van plastic recipiënten resulteert in lagere meetwaarden voor P. Het uitvoeren van de extractie in het licht of donker bij gebruik van glazen recipiënten is geen kritische invloedsfactor. Bij dit onderzoek werd vastgesteld dat centrifugatie na de extractie resulteert in afwijkende resultaten tov filtratie, maar deze afwijking kan mogelijks gecorreleerd worden aan het gebruik van plastic recipiënten tijdens de centrifugatie. Wijziging in de hoeveelheid bodem voor het uitvoeren van de extractie heeft geen invloed zolang de verhouding bodem:extractievloeistof wordt gerespecteerd. De pH waarde van de extractievloeistof heeft een invloed op het extractierendement, echter dit is monsterafhankelijk.

Daarnaast is uit dit onderzoek gebleken dat de resultaten bekomen met ICP-AES en spectrofotometrie vergelijkbaar zijn.

De procedure zoals beschreven in BAM/deel 1/11 *Bepaling van fosfaat in grond extraheerbaar met een ammoniumlactaat-azijnzuurbuffer (P-AL)* kan behouden blijven mits volgende aanvullingen/wijzigingen:

- De stock oplossing van de extractievloeistof dient bij voorkeur in het donker bij 4°C bewaard te worden;
- De extractie moet uitgevoerd worden in GLAZEN recipiënten;
- De aanmaak van de hydrolyse oplossing is kritisch en dient exact te worden uitgevoerd zoals beschreven in de BAM methode.

INHOUD

Samenvatting	I
Inhoud	III
Lijst van tabellen	IV
Lijst van figuren	V
HOOFDSTUK 1. Inleiding	1
HOOFDSTUK 2. Validatie onderzoek	2
2.1. <i>Introductie</i>	2
2.2. <i>Stalen en staalname</i>	2
2.3. <i>Bepaling van P in een ammoniumlactaat extract (BAM/deel 1/11 versie 3.1 juni 2010)</i>	3
2.3.1. Aanmaak oplossingen	3
2.3.2. Extractie	4
2.3.3. Spectrofotometrische meting met doorstroomanalyse	4
2.4. <i>Proefopzet</i>	5
2.5. <i>Experimenten</i>	7
2.5.1. Herhaalbaarheid van de standaard methode (cfr. BAM/deel 1/11 versie 3.1 juni 2010).	7
2.5.2. Invloed van temperatuur, recipiënt en licht op de geconcentreerde extractievloeistof	7
2.5.3. Invloed van temperatuur tijdens de extractie	10
2.5.4. Invloed van type recipiënt en licht tijdens de extractie	10
2.5.5. Invloed van centrifugatie ipv filtratie en hoeveelheid monster bij de extractie	14
2.5.6. Invloed van pH van de extractievloeistof tijdens de extractie	16
2.5.7. Vergelijking met ICP-AES-AES metingen	19
HOOFDSTUK 3. Besluit	21
Bijlage 1	22

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1: Overzicht van geteste parameters	1
Tabel 2: Onderzochte bodemstalen	3
Tabel 3 Overzicht van de onderzochte parameter instellingen	5
Tabel 4: Herhaalbaarheid van de standaardmethode	7
Tabel 5: Invloed van temperatuur, recipiënt en licht tijdens de bewaring van de extractievloeistof	8
Tabel 6: Invloed van het recipiënt tijdens de extractie	10
Tabel 7: Herhaalbaarheid van de meting tijdens debepaling van de invloed van plastic	11
Tabel 8: Invloed van licht/donker tijdens de extractie	12
Tabel 9: herhaalbaarheid van de meting tijdens de bepaling van de invloed van licht	13
Tabel 10: Invloed van centrifugatie versus filtratie na de extractie	14
Tabel 11: Invloed van de afgewogen hoeveelheid bodem	15
Tabel 12: Invloed van de pH van de extractievloeistof tijdens de extractie	17
Tabel 13: invloed van de pH (3.75 versus 3.9) van de extractievloeistof tijdens de extractie	18
Tabel 14: Algemeen overzicht van de bekomen resultaten uitgedrukt in mg P/kg luchtdroge grond	22

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1: Schematische weergave van de proefopzet	6
Figuur 2: Resultaten reeks 1 (licht, 25°C) vs referentie (donker, 4°C)	8
Figuur 3: Resultaten reeks 2 (donker, 25°C) vs referentie (donker, 4°C)	9
Figuur 4: Grafische vergelijking tussen de verschillende bewaarcondities	9
Figuur 5: Invloed van plastic tijdens extractie	11
Figuur 6: Invloed van licht/donker tijdens de extractie	12
Figuur 7: invloed van type recipiënt en licht bij de extractie	13
Figuur 8: Invloed van centrifugatie versus filtratie na de extractie	14
Figuur 9: Invloed van afgewogen hoeveelheid bodem	15
Figuur 10: invloed van centrifugatie/filtratie en hoeveelheidmonster	16
Figuur 11: Invloed van pH (3.75 versus 3.6) van de extractievloeistof tijdens de extractie	17
Figuur 12: Invloed van pH (3.75 versus 3.9) van de extractievloeistof tijdens de extractie	18
Figuur 13: invloed van pH van de extractievloeistof	19
Figuur 14: Vergelijking ICP-AES-AES met de spectrofotometrische bepaling	20

HOOFDSTUK 1. INLEIDING

In het kader van derogatie (artikel 12, §2, van het Derogatiebesluit) en voor het opbrengen van fosfaat uit kunstmest (artikel 6, §1, 4°, van het Tuinbouwbesluit) dient de plantbeschikbare in bodem gemeten te worden. In het BAM compendium¹ werd in 2009 een ontwerpversie voor de bepaling van de parameter plantbeschikbaar P in ammoniumlactaat extractie opgenomen volgens NEN 5793.

Uit de ringtestresultaten van mei 2009 en mei 2010 werd vastgesteld dat de meet spreiding tussen de verschillende laboratoria hoog ligt, resp. 23% en 15%, in vergelijking met andere fosfor parameters.

Voor deze nieuw toegevoegde parameter was het bijgevolg nodig een validatie onderzoek uit te voeren. Vertrekkende vanuit een literatuurstudie en in combinatie met informatie/vragen verkregen van de erkende laboratoria werd een validatieprogramma uitgevoerd, waarbij de invloed van interferenties en keuze recipiënten werd onderzocht, alsook de mogelijkheid tot meting met ICP-AES werd nagegaan.

¹ Bemonsterings- en analysemethodes voor mest, bodem en veevoeder in het kader van het mestdecreet (BAM)

HOOFDSTUK 2. VALIDATIE ONDERZOEK

2.1. INTRODUCTIE

De Nederlandse norm NEN 5793² werd als maatstaaf voor het hele onderzoek gebruikt. Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van het gehalte aan fosfaat in grond, extraheerbaar met een op pH=3.75 gebufferde oplossing van ammoniumlactaat-azijnzuur. De samenstelling van deze extractievloeistof werd ontwikkeld door Egner et al.³ In het artikel geven de onderzoekers mee dat er een aantal zaken cruciaal zijn in de samenstelling. De oplossing wordt gebufferd op pH 3.75 omdat een verandering in pH van de oplossing de oplosbaarheid van P verandert. Daarnaast wordt er zowel melkzuur als azijnzuur gebruikt omdat deze producten chelaterend werken en dus het rendement van de extractie verhogen. Voor het melkzuur is het belangrijk dat dit eerst gehydrolyseerd wordt aangezien dit product tot 20% lactides kan bevatten. De hydrolyse gebeurt bij 95°C gedurende 48 uur en het is van belang dat de hydrolyse volledig opgaat. Daarnaast wordt ook vermeld dat de gebruikte P-AL extractie enkel toepasbaar is op bodems met een pH<7 aangezien bij bodems met een hogere pH het CaCO₃ gehalte te hoog ligt en dit de meting kan storen. Bij bodems met een [CaCO₃] concentratie die hoger is dan 35% zal het rendement aan P dalen. Bij extracten die sterk gekleurd zijn is een actieve koolbehandeling een optie, wanneer men echter werkt met goede filters tijdens de spectrofotometrische bepaling met molybdeenblauw is er geen probleem.

Pierzynski⁴ beschrijft dat het gehalte aan P in bodemextracten gemeten met ICP-AES gevoelig hoger kan liggen bij lage P-concentraties, dit is te wijten aan het feit dat aanwezige P uit organische P-verbindingen bij de destructies en in de hoge temperatuur van het plasma bij ICP-AES wel meegemeten wordt terwijl dit bij spectrofotometrische bepaling niet het geval is.

2.2. STALEN EN STAALNAME

Er werd een reeks bodemstalen genomen, op 19 en 20 april 2010, waarbij gelet werd op de textuur en de pH van de bodem. Op volgende lokaties werden bodemmonsters gecollecteerd:

- Meise (weiland en akkerland): zandleemstreek
- Koksijde (weiland en akkerland): polders
- Bornem (weiland en akkerland): Vlaamse zandstreek
- Poppel (weiland en akkerland): Kempen
- Bierbeek: weiland: leem – akkerland: zandleem

In Tabel 2 worden de stalenummers, herkomst, pH, dichtheid, aard van het perceel en de bemestingsgegevens weergegeven.

² NEN 5793: Bodem- Bepaling van fosfaat in grond extraheerbaar met een ammoniumlactaat-azijnzuurbuffer (P-AL)

³ H. Egner, H. Riehm en W.R. Domingo, *Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Böden. II Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor- und Kaliumbestimmung*, Kungl. Lantbrukshögskolans Ann. 26, 199-255, 1960.

⁴ "Phosphorus Determination in waters and extracts of soils and by-products: inductively coupled plasma spectrometry versus colorimetric procedures" by taskforce group (Pierzynsky et al.)

Monster	herkomst	pH	Dichtheid (kg/m ³)	Aard perceel	bemesting
20101646	Koksijde W1	7,14	1250	weiland	In Februari
20101647	Koksijde A1	7,40	1250	akker	Geen
20101648	Poppel W1	4,24	1250	weiland	Niet in 2010
20101649	Poppel A1	4,90	1250	akker	In Maart
20101650	Bierbeek W1	5,43	1450	weiland	In Maart
20101651	Bierbeek A1	6,68	1450	akker	Geen
20101652	Meise W1	4,73	1450	weiland	In April
20101653	Meise A1	6,00	1450	akker	In April
20101654	Bornem W1	5,40	1250	weiland	In Maart
20101655	Bornem A1	5,79	1250	akker	Geen

Tabel 2: Onderzochte bodemstalen

Tijdens de bemonstering werd een klein deel van het veld bemonsterd om de heterogeniteit van het gecollecteerde monster te beperken. In deze studie is het niet noodzakelijk om een representatief getal van het perceel te bekomen. Bij deze monsters werd de bodemlaag 0-30 cm bemonsterd en dit met een boor met binnendiameter van 20 mm. Per veld werden 15 deelsteken genomen. De 15 deelsteken werden in een 1 plastic zak gedaan, gecompacteerd (lucht uitsluiten), gesloten en als dusdanig gekoeld naar het labo gebracht.

De bodemmonsters werden gedroogd bij 40°C en gezeefd over 2 mm.

De pH van de bodems werd bepaald volgens ISO 10390:2005⁵.

2.3. BEPALING VAN P IN EEN AMMONIUMLACTAAT EXTRACT (BAM/DEEL 1/11 VERSIE 3.1 JUNI 2010)

Deze compendiummethode beschrijft een procedure voor de bepaling van het gehalte aan plantbeschikbare P in grond, extraheerbaar met een op pH = 3.75 gebufferde oplossing van ammoniumlactaat-azijnzuur. Deze methode kan worden toegepast op voorgedroogde grondmonsters, gezeefd over een zeef van 2 mm.

De voorgedroogde grondmonsters worden geëxtraheerd in een verhouding 1:20 (massa/volume) met een oplossing van ammoniumlactaat-azijnzuurbuffer met een pH van 3.75. Met die extractievloeistof worden de aanwezige calciumfosfaatverbindingen en een deel van de aanwezige ijzer- en aluminiumverbindingen geëxtraheerd. Een gedeelte van het heldere filtraat wordt geanalyseerd op fosfaat volgens bestaande analysemethoden.

2.3.1. AANMAAK OPLOSSINGEN

Melkzuuroplossing (circa 3 mol/l)

Verkregen door 500 ml melkzuur te verdunnen met 1 l water in een pyrefles, en waarmee de volgende handelingen zijn uitgevoerd. Dek de fles af met een horlogeglas en plaats ze gedurende 48 h in een stoof bij een temperatuur van 95°C om het melkzuur te laten hydrolyseren. Laat afkoelen.

⁵ ISO 10390:2005 Soil quality -- Determination of pH

Bepaal de concentratie van de oplossing als volgt. Pipetteer 10.0 ml van de oplossing in een maatkolf van 100 ml en vul aan met water. Homogeniseer en pipetteer van die verdunde oplossing 10.0 ml en titreer ze met een 0.1 mol/l NaOH-oplossing met fenolphthaleïne als indicator. Bereken de concentratie (= A) van de melkzuuroplossing.

Geconcentreerd azijnzuur (circa 16 mol/l)

Bepaal de exacte concentratie daarvan als volgt. Pipetteer met een pipet 10.0 ml azijnzuur in een maatkolf van 500 ml waarin reeds 400 ml water zit. Vul aan met water en homogeniseer. Pipetteer 10,0 ml van die verdunde oplossing en titreer ze met een 0.1 mol/l NaOH-oplossing met methylrood als indicator. Bereken de exacte concentratie (= B) van het geconcentreerde azijnzuur.

Geconcentreerde ammonia (circa 13 mol/l)

Bepaal de exacte concentratie daarvan als volgt. Pipetteer met een pipet 10.0 ml ammonia in een maatkolf van 500 ml waarin reeds 400 ml water zit. Vul aan met water en homogeniseer. Pipetteer 10.0 ml van die verdunde oplossing en titreer ze met een 0.1 mol/l HCl-oplossing met methylrood als indicator. Bereken de exacte concentratie (= C) van de geconcentreerde ammonia.

Opmerking: De gestelde waarde van oplossingen zijn 1 dag geldig. Als de geconcentreerde extractieoplossing wordt gemaakt uit niet-verse oplossingen moeten die oplossingen opnieuw worden gesteld.

Geconcentreerde extractieoplossing

Neem een 1 l-maatkolf die al 300 ml water bevat en voeg daaraan toe: 1000/A ml van de melkzuuroplossing, 4000/B ml geconcentreerd azijnzuur en 1000/C ml geconcentreerde ammonia, meng na elke toevoeging. Laat afkoelen en vul aan met water en homogeniseer.

Opmerking: De oplossing is 1 jaar houdbaar.

Verdunde extractieoplossing

Verdun 500 ml van de geconcentreerde extractieoplossing tot 5 l met water. De pH van de oplossing moet zijn: 3.75 ± 0.05 .

Opmerking: Deze oplossing is 5 dagen houdbaar.

2.3.2. EXTRACTIE

Weeg $2.5 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ voorgedroogd grondmonster af in een schudfles en voeg 50 ml verdunde extractieoplossing toe. Neem twee blancomonsters mee. Schud gedurende 4 h bij een temperatuur van $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Filtreer de suspensies en blancomonsters. Controleer de filtraten op helderheid. Filtreer zo nodig een tweede maal.

2.3.3. SPECTROFOTOMETRISCHE METING MET DOORSTROOMANALYSE

Het fosfor gehalte werd bepaald onder de vorm van orthofosfaat in watermonsters met een doorstroomanalysestelsel volgens ISO 15681⁶. Het werkgebied gaat van 0.05 tot 0.5 mg P/l.

De bepaling is gebaseerd op de reactie van orthofosfaat met ammoniummolybdaat en kaliumantimoontartraat in zuur milieu tot fosfor-molybdeenzuur. Reductie met ascorbinezuur

⁶ ISO 15681-2: 2003 Water Quality – Determination of orthophosphate and total phosphorous contents by flow analysis (FIA and CFA) – Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA).

geeft aanleiding tot de vorming van een blauwe kleur waarvan de intensiteit gemeten wordt bij 880 nm. Het monster wordt aangezuurd en ondergaat een dialyse. Hierbij worden alle onoplosbare bestanddelen samen met storende componenten afgezonderd. Dan worden de ammonium-molybdaatoplossing gevolgd door de ascorbinezuuroplossing toegevoegd. Het mengsel wordt verwarmd bij 40°C. Vervolgens vindt de spectrofotometrische bepaling plaats bij 880 nm. De intensiteit wordt opgenomen in functie van de tijd.

2.4. PROEFOPZET

In eerste instantie werden de analyses uitgevoerd zoals beschreven in 2.3 (cfr. BAM/deel 1/11 versie 3.1 juni 2010). Voor een aantal parameters werden geen specificaties voorgeschreven en werden deze op basis van literatuurgegevens en eigen expertise ingevuld. In Tabel 3 wordt aangegeven welke parameter instelling reeds is beschreven in de huidige BAM methode, welke werd aangewend als referentiemethode en welke bijkomend werd getoetst t.o.v. de referentiemethode.

Parameter	BAM methode	Referentie methode	Variabele
Bewaring stockoplossing extractievloeistof	-	Donker, 4°C	Licht/donker 25°C
Receptiënt extractie	-	Glas	Plastic
Extractie licht/donker	-	Licht	Donker
Filtratie/centrifugatie	Filtratie	Filtratie	Centrifugatie
Ratio bodem:extractievloeistof	2,5 g : 50 ml	2,5 g : 50 ml	5 g : 100 ml
pH extractievloeistof	3,75	3,75	3,6 en 3,9

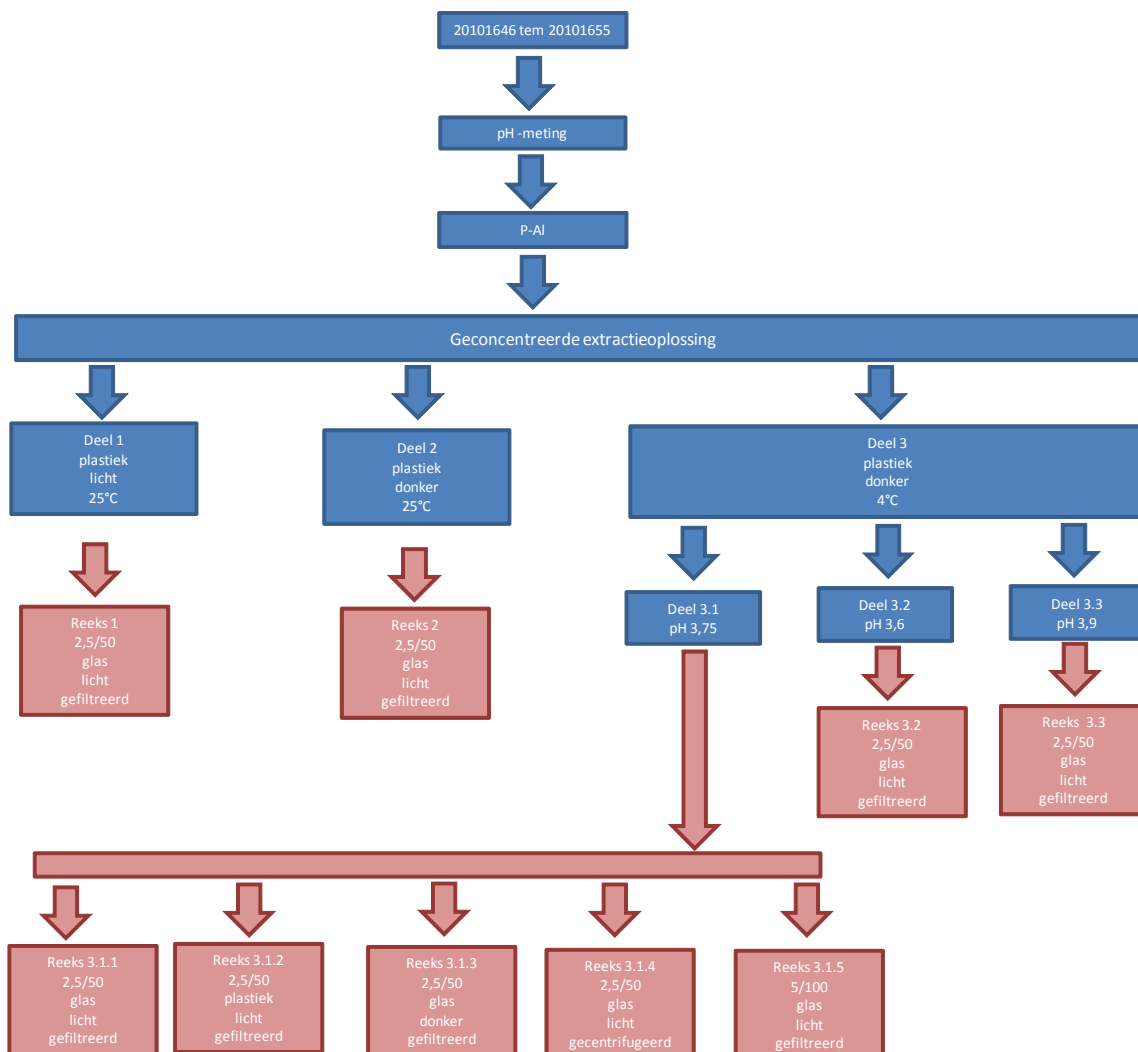
Tabel 3 Overzicht van de onderzochte parameter instellingen

Het doel van het onderzoek was na te gaan welke parameters er tijdens de aanmaak van de extractievloeistof en de extractie een invloed hebben op het resultaat. In schema 1 wordt de werkwijze weergegeven. Uit literatuur en uit eigen expertise is geweten dat bij de bewaring van de geconcentreerde extractieoplossing er een invloed kan zijn van licht, bewaringstemperatuur en het materiaal van het receptiënt. Daarnaast is er bij de extractie een mogelijke invloed van het materiaal van het receptiënt, licht, methode van het verwijderen van het vaste materiaal (centrifugatie of filtratie), de verhouding bodem:water en de pH van de extractievloeistof. Tot slot is het geweten dat de temperatuur van de extractievloeistof een rol speelt. Aangezien in de laboratoria standaard bij kamertemperatuur wordt gewerkt, wordt de temperatuur vastgelegd op $20 \pm 2^\circ\text{C}$, eveneens vergelijkbaar met de eis beschreven voor de bepaling van pH in bodem.

Het onderzoek zal er in bestaan om in eerste fase de referentie extractiemethode toe te passen en deze te testen op herhaalbaarheid. Daarna zal er telkens één parameter veranderd worden tov deze referentiemethode (ref) terwijl al de andere mogelijks kritische parameters constant worden gehouden. Om het effect van de parameter in te schatten wordt de regressie tussen de referentiemethode en de methode waarbij één van de parameters verschillend is, berekend.

Deze werkwijze wordt weergegeven in Figuur 1. In dit schema worden volgende meetreeksen teruggevonden:

- Reeks 1 en 2: invloed van licht op de bewaring van de geconcentreerde extractievloeistof.
- Reeks 3.1.1.: referentie extractiemethode (ref).
- Reeks 3.1.2.: invloed van het materiaal van het recipiënt tijdens de extractie.
- Reeks 3.1.3.: invloed van licht tijdens de extractie.
- Reeks 3.1.4.: invloed van centrifugatie ipv filtratie tijdens de extractie.
- Reeks 3.1.5.: invloed van hoeveelheid bodem/extractiemiddel (2.5 g bodem/50ml versus 5 g bodem/100 ml)
- Reeks 3.2.: invloed van pH (3.6 ipv 3.75)
- Reeks 3.3.: invloed van pH (3.9 ipv 3.75)



Figuur 1: Schematische weergave van de proefopzet

2.5. EXPERIMENTEN

2.5.1. HERHAALBAARHEID VAN DE STANDAARD METHODE (CFR. BAM/DEEL 1/11 VERSIE 3.1 JUNI 2010).

Aangezien een aantal parameters tijdens de extractie een effect kunnen hebben werden er eerst 3 monsters in 5-voud geanalyseerd. De resultaten worden weergegeven in Tabel 4.

Monster	Massa (g)	mg P/l	mg P/kg luchtdroge grond 40°C;2mm	Gemiddelde (mg P/kg luchtdr)	%RSD
blanco		<0,004			
blanco		-0,007			
gemiddelde		-0,00700	ref		
20101648/1	2,5100	9,965	199		
20101648/2	2,4988	9,856	197		
20101648/3	2,5055	9,874	197		
20101648/4	2,5031	10,381	208		
20101648/5	2,5008	10,13	203	201	2,2
20101650/1	2,5085	6,649	133		
20101650/2	2,5045	6,855	137		
20101650/3	2,5077	6,857	137		
20101650/4	2,5037	7,195	144		
20101650/5	2,4986	7,32	147	139	4,1
20101651/1	2,5066	22,12	441		
20101651/2	2,4955	22,76	456		
20101651/3	2,5091	19,65	392		
20101651/4	2,5099	22,60	450		
20101651/5	2,5023	22,99	459	440	6,3

Tabel 4: Herhaalbaarheid van de standaardmethode

Er worden RSD's vastgesteld van 2.2% ; 4.1% en 6.3% op de 3 verschillende monsters die werden gemeten met de standaardmethode (cfr. BAM/deel 1/11 versie 3.1 juni 2010).

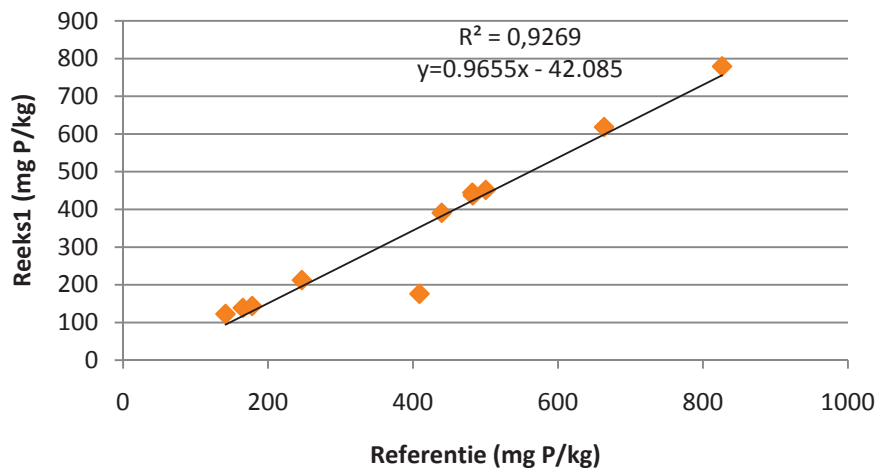
2.5.2. INVLOED VAN TEMPERATUUR, RECIPIËNT EN LICHT OP DE GECONCENTREERDE EXTRACTIEVLOEISTOF

Bij dit experiment werd een geconcentreerde extractievloeistof in 3-voud aangemaakt. Eén deel werd bewaard in plastic flessen bij 25°C en in het licht (reeks 1). Een tweede fles werd identiek aangemaakt maar werd bewaard in het donker (reeks 2). En een derde werd bewaard in plastic in het donker bij 4°C (referentie, reeks 3.1.1). Vervolgens werden de geconcentreerde oplossingen verdund en op pH 3.75 gebracht en in een glazen recipiënt bewaard. In Tabel 5 worden de resultaten weergegeven in mg P/kg luchtdroge grond gezeefd op 2 mm. In Figuur 2 en Figuur 3 worden de resultaten grafisch uitgezet.

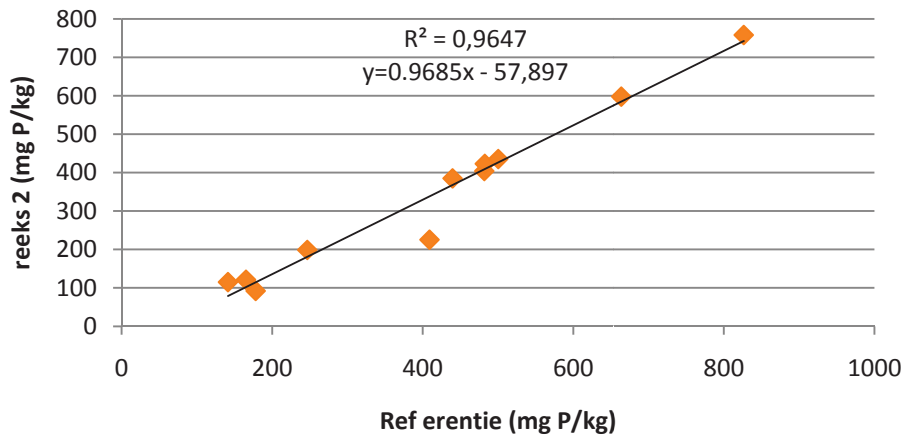
Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie: Donker 4°C	Reeks 1: Licht 25°C	Reeks 2: Donker 25°C
20101646	826	779	758
20101647	664	618	598
20101648	247	212	199
20101649	440	391	385
20101650	165	139	121
20101651	482	444	404
20101652	141	123	115
20101653	409	176	225
20101654	178	144	92
20101655 A	482	437	423
20101655 B	500	451	435

Tabel 5: Invloed van temperatuur, recipiënt en licht tijdens de bewaring van de extractievloeistof

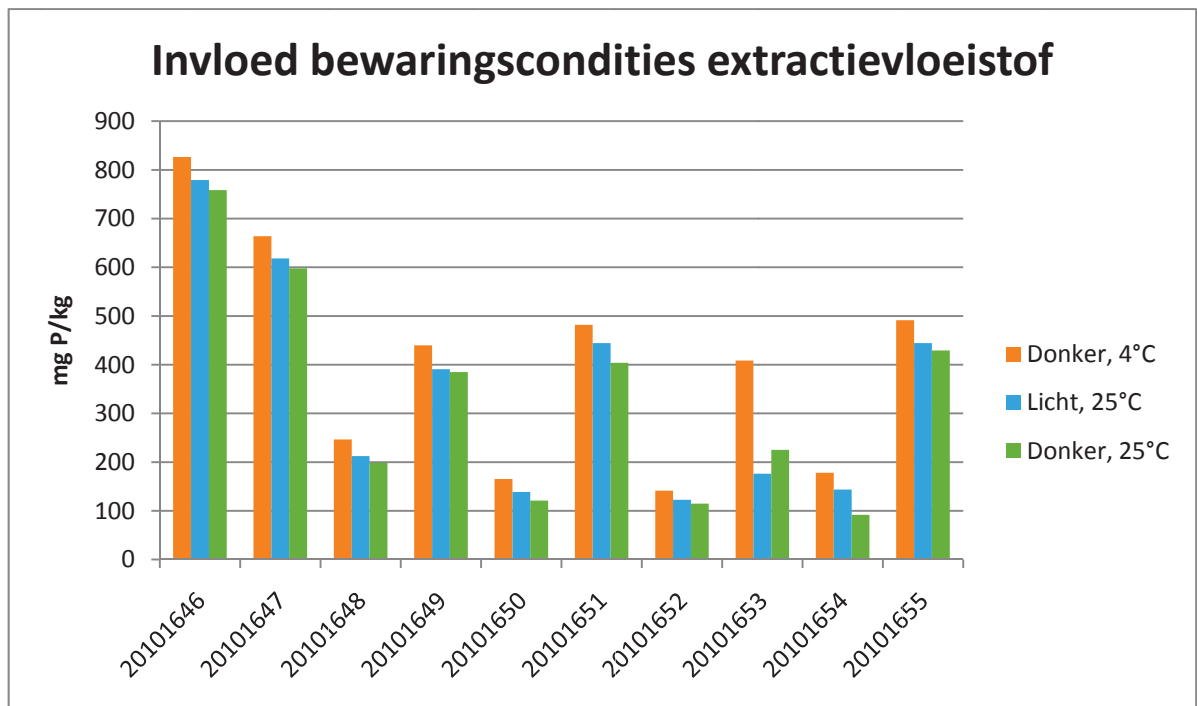


Figuur 2: Resultaten reeks 1 (licht, 25°C) vs referentie (donker, 4°C)



Figuur 3: Resultaten reeks 2 (donker, 25°C) vs referentie (donker, 4°C)

Uit de waarde van R^2 en de regressievergelijking is af te leiden dat er een afwijking is tussen de waarden bekomen met de referentiemethode en de 2 andere condities, het is echter niet eenduidig vast te stellen dat dit te wijten is aan de verschillende bewaarcondities en niet aan de spreiding van de meetmethode. In Figuur 4 wordt dit grafisch voorgesteld.



Figuur 4: Grafische vergelijking tussen de verschillende bewaarcondities

Uit deze gegevens valt af te leiden dat de waardes bekomen met de referentiemethode (zie 2.3), hoger liggen; het rendement van de extractie is dus hoger als de geconcentreerde extractievloeistof bewaard wordt in het donker bij 4°C.

Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat de geconcentreerde extractieoplossing bij voorkeur in het donker en koel bewaard wordt bij 4°C.

2.5.3. INVLOED VAN TEMPERATUUR TIJDENS DE EXTRACTIE

Deze parameter werd niet verder getest omdat volgens NEN 5793 en in de literatuur⁷ is beschreven dat de extractie moet worden uitgevoerd bij 20°C met een spreiding van +/- 2°C. Temperatuursveranderingen hebben immers een invloed heeft op de oplosbaarheid van P in de extractievloeistof en dus op het uiteindelijke rendement van de extractie.

2.5.4. INVLOED VAN TYPE RECIPIËNT EN LICHT TIJDENS DE EXTRACTIE

Vergelijking glazen recipiënt met plastic recipiënt

In Tabel 6 worden de resultaten weergegeven van de invloed van plastic tijdens de extractie (reeks 3.1.2). Bij de referentiemethode wordt de extractie uitgevoerd in een glazen recipiënt (lichtdoorlatend).

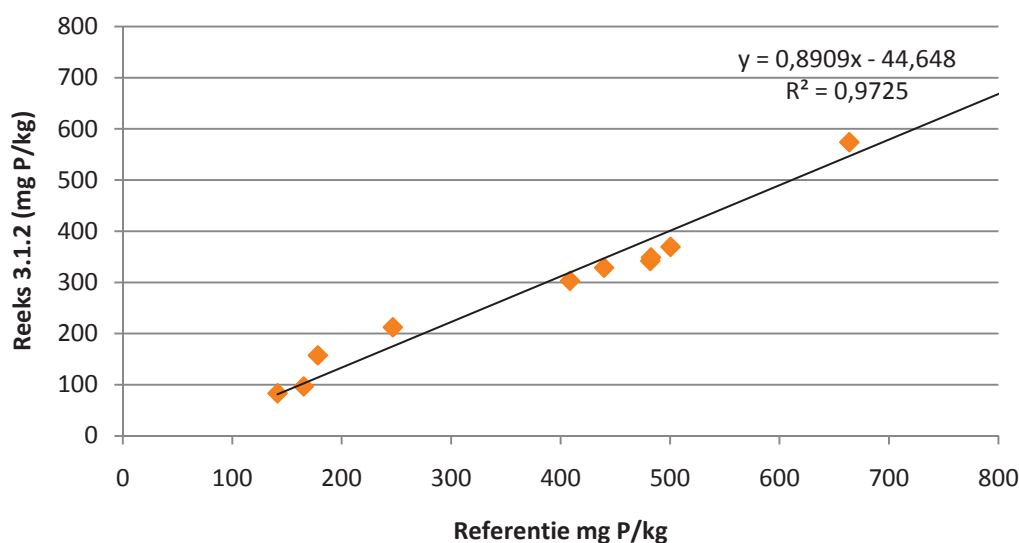
Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie	
	Reeks 3.1.1 Glas	Reeks 3.1.2. Plastic
20101646	826	733
20101647	664	574
20101648	247	212
20101649	440	329
20101650	165	97
20101651	482	342
20101652	141	83
20101653	409	303
20101654	178	157
20101655 A	482	349
20101655 B	500	370

Tabel 6: Invloed van het recipiënt tijdens de extractie

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.1.2. wordt weergegeven in Figuur 5.

⁷ Wendy Van Dyck, *Vergelijkende studie van drie methodes voor fosforbepaling*, eindwerk tot het behalen van het diploma Bachelor in de Chemie Milieuzorg, Katholieke hogeschool Kempen.



Figuur 5: Invloed van plastic tijdens extractie

Uit de waarden voor R^2 en de regressievergelijking van de rechte, die in het ideale geval "1" zijn, blijkt dat er een mogelijke afwijking is op de lineaire correlatie tussen de referentiewaarden en de waarden uit reeks 3.1.2.. Hier kan worden gesteld dat er een invloed is op het resultaat wanneer er plastic recipiënten worden gebruikt tijdens de extractie. Dit wordt grafisch aangetoond in Figuur 7.

Om de fout op de meting en de herhaalbaarheid van de methode na te gaan bij gebruik van plastic recipiënten werd een staal in 5-voud gemeten. De resultaten worden weergegeven in Tabel 7.

monster	Massa (g)	mg P/l	mg P/kg luchtdroge grond 40°C;2mm	Gemiddelde mg P/kg luchtdr	%RSD
blanco		0,001			
blanco		-0,005			
gemiddelde		-0,00200	extractie in plastic		
20101650/1	2,5086	5,084	101		
20101650/2	2,5009	4,672	93		
20101650/3	2,5088	4,506	90		
20101650/4	2,5047	4,287	86		
20101650/5	2,5049	4,273	85	91	7,3

Tabel 7: Herhaalbaarheid van de meting tijdens debepaling van de invloed van plastic

Er wordt een RSD bekomen van 7.3% op de bepaling van P bij het gebruik van plastic recipiënten bij de extractie.

Invloed van licht/donker tijdens de extractie

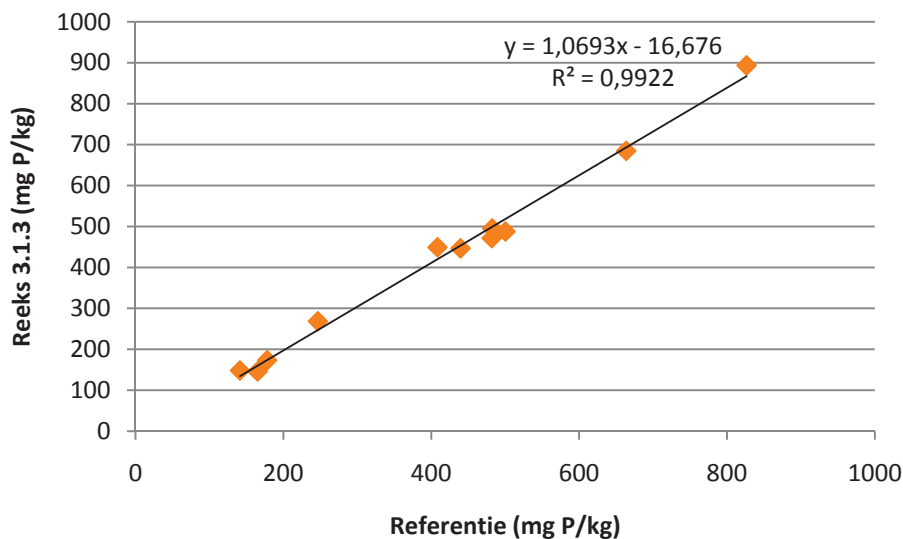
In Tabel 8 worden de resultaten weergegeven van de invloed van de extractie uitgevoerd in het licht (Referentie) of in het donker (reeks 3.1.3). Bij beide methoden werd de extractie uitgevoerd in glazen recipiënten.

Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie Glas licht	Reeks 3.1.3.: Glas donker
20101646	826	894
20101647	664	685
20101648	247	269
20101649	440	447
20101650	165	146
20101651	482	472
20101652	141	148
20101653	409	449
20101654	178	173
20101655 A	482	495
20101655 B	500	488

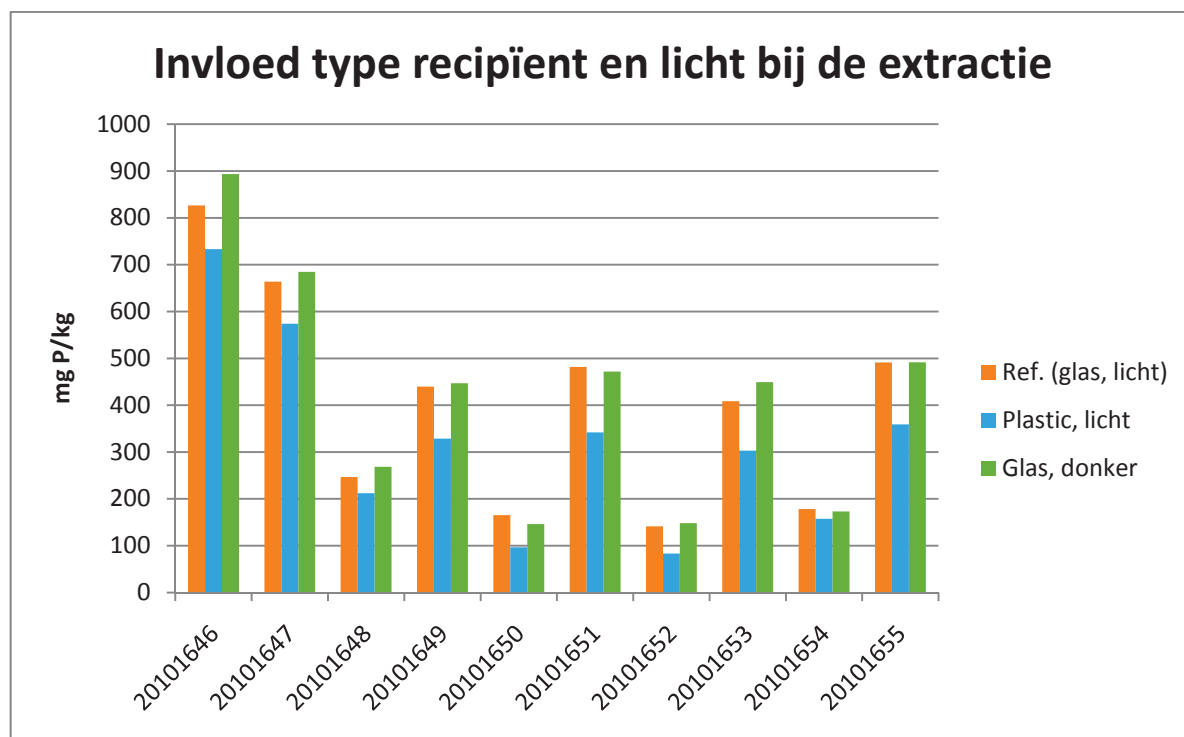
Tabel 8: Invloed van licht/donker tijdens de extractie

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.1.3. wordt weergegeven in Figuur 6.



Figuur 6: Invloed van licht/donker tijdens de extractie

Tussen de vergelijkende resultaten bestaat er een goede mate van overeenkomst; dit wordt ook grafisch weergegeven in Figuur 7.



Figuur 7: invloed van type recipiënt en licht bij de extractie

Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat er geen invloed is van licht tijdens de extractie maar dat de extractie in glazen recipiënten moet worden uitgevoerd en niet in plastic recipiënten.

Om de fout op de meting en de herhaalbaarheid van de methode na te gaan werd een staal in 5-voud gemeten bij de extractie in het donker. De resultaten worden weergegeven in Tabel 9.

monster	Massa (g)	mg P/l	mg P/kg luchtdroge grond 40°C;2mm	Gemiddelde mg P/kg luchtdr	%RSD
blanco		0,007			
blanco		0,008			
gemiddelde		0,0075	extractie donker		
20101650/1	2,5099	6,989	139		
20101650/2	2,5046	7,149	143		
20101650/3	2,5085	7,293	145		
20101650/4	2,5	7,409	148		
20101650/5	2,4966	7,791	156	146	4,4

Tabel 9: herhaalbaarheid van de meting tijdens de bepaling van de invloed van licht

Er wordt een RSD bekomen van 4.4% op de bepaling van P wanneer de extractie afgeschermd van licht wordt uitgevoerd.

2.5.5. INVLOED VAN CENTRIFUGATIE IPV FILTRATIE EN HOEVEELHEID MONSTER BIJ DE EXTRACTIE

Invloed van centrifugatie ipv filtratie bij de extractie

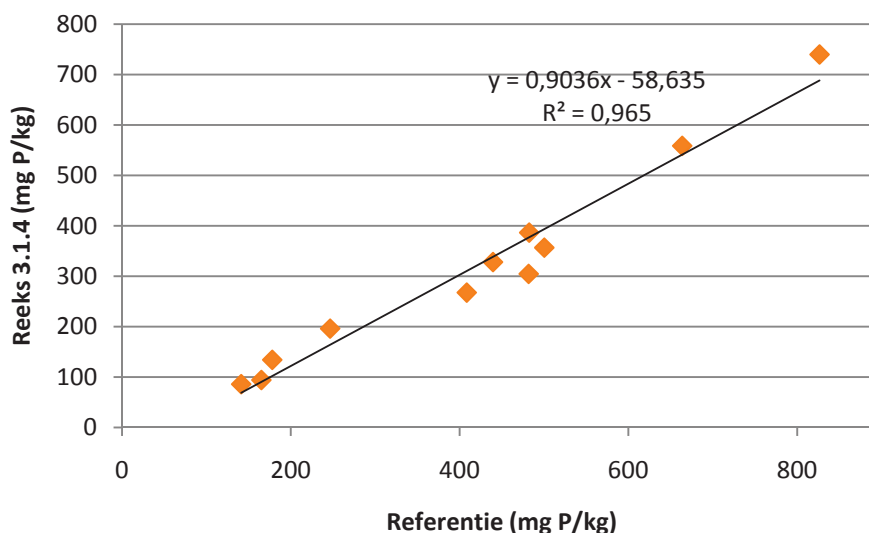
In Tabel 10 worden de resultaten weergegeven van de invloed van centrifugatie tov filtratie na de extractie (reeks 3.1.4). Bij de referentiemethode wordt een filtratie uitgevoerd na de extractie.

Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie Filtratie	Reeks 3.1.4.: Centrifugatie
20101646	826	740
20101647	664	559
20101648	247	196
20101649	440	328
20101650	165	94
20101651	482	305
20101652	141	86
20101653	409	268
20101654	178	134
20101655 A	482	386
20101655 B	500	357

Tabel 10: Invloed van centrifugatie versus filtratie na de extractie

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.1.4. wordt weergegeven in Figuur 8.



Figuur 8: Invloed van centrifugatie versus filtratie na de extractie

Uit de waarden voor R^2 en de regressievergelijking blijkt dat er een mogelijke afwijking is op de lineaire correlatie tussen de referentiewaarden en de waarden uit reeks 3.1.4.. Dit wordt grafisch

weergegeven in Figuur 10. Hier blijkt dus dat er een significant effect waargenomen wordt. De bekomen waardes liggen lager als er gecentrifugeerd wordt ipv gefiltreerd. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het gebruik van plastic recipiënten in de centrifuge.

Invloed van 5 g bodem afwegen in 100 ml ipv 2.5 g in 50 ml

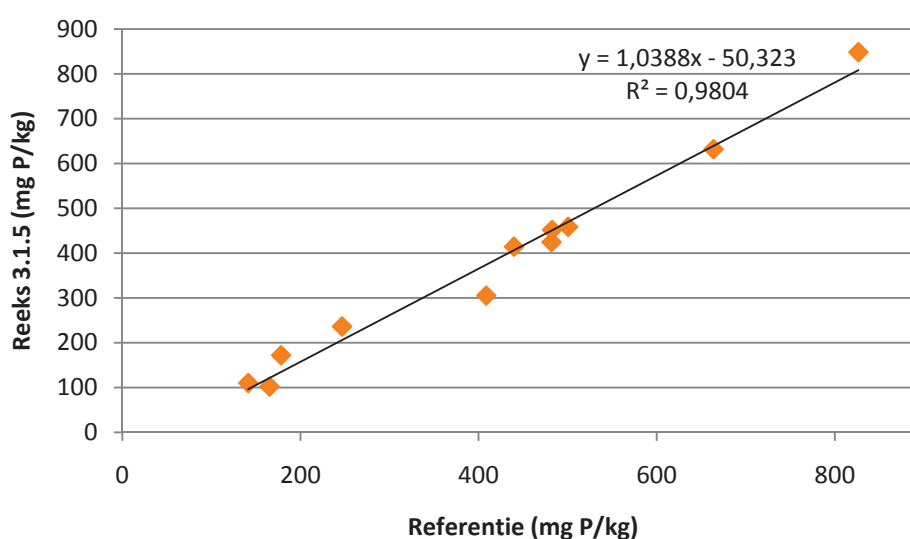
In Tabel 11 worden de resultaten weergegeven van de invloed van hoeveelheid bodem/water tijdens de extractie (reeks 3.1.5). Bij de referentiemethode wordt aan 2.5 g bodem 50 ml extractiemiddel toegevoegd. Bij de vergelijkende meting werd de hoeveelheid verdubbeld naar 5 g op 100 ml.

Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie 2.5g/50 ml	Reeks 3.1.5.: 5g/100 ml
20101646	826	849
20101647	664	632
20101648	247	236
20101649	440	414
20101650	165	102
20101651	482	425
20101652	141	110
20101653	409	305
20101654	178	172
20101655 A	482	452
20101655 B	500	459

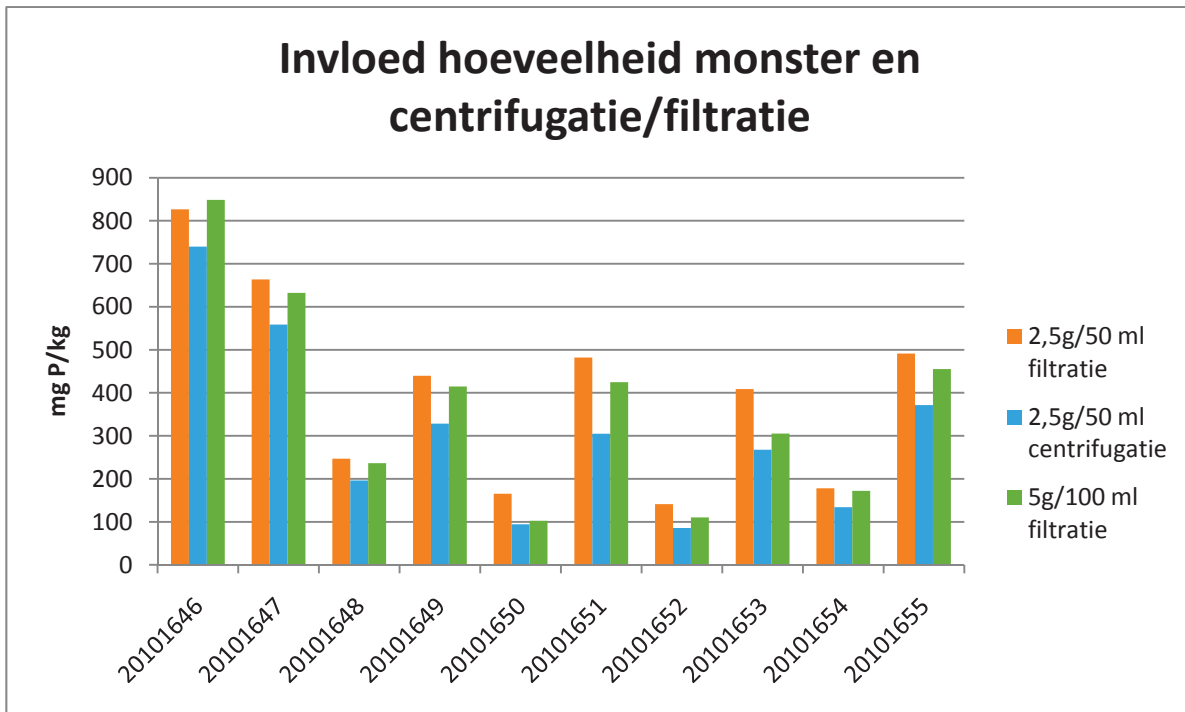
Tabel 11: Invloed van de afgewogen hoeveelheid bodem

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.1.5. wordt weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9: Invloed van afgewogen hoeveelheid bodem

Uit de waarden voor R^2 en de regressievergelijking is er een goede mate van overeenkomst tussen de referentiewaarden en de waarden uit reeks 3.1.5.. De afwijkingen die worden waargenomen kunnen toegeschreven worden aan de spreiding op de meting. Dit wordt grafisch aangetoond in Figuur 10.



Figuur 10: invloed van centrifugatie/filtratie en hoeveelheidmonster

Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat er geen invloed is van de afgewogen hoeveelheid monster indien de verhouding bodem:extractievloeistof wordt behouden. Na de extractie wordt bij centrifugatie lagere rendementen bekomen in vergelijking met gebruik van filtratie. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het gebruik van plastic recipiënten tijdens het centrifugeren.

2.5.6. INVLOED VAN PH VAN DE EXTRACTIEVLOEISTOF TIJDENS DE EXTRACTIE

Bij de referentiemethode wordt de extractie uitgevoerd bij pH 3.75. In deze studie werden bijkomend extracties uitgevoerd bij enerzijds pH 3.6 en anderzijds pH 3.9.

pH 3.6 ipv 3.75

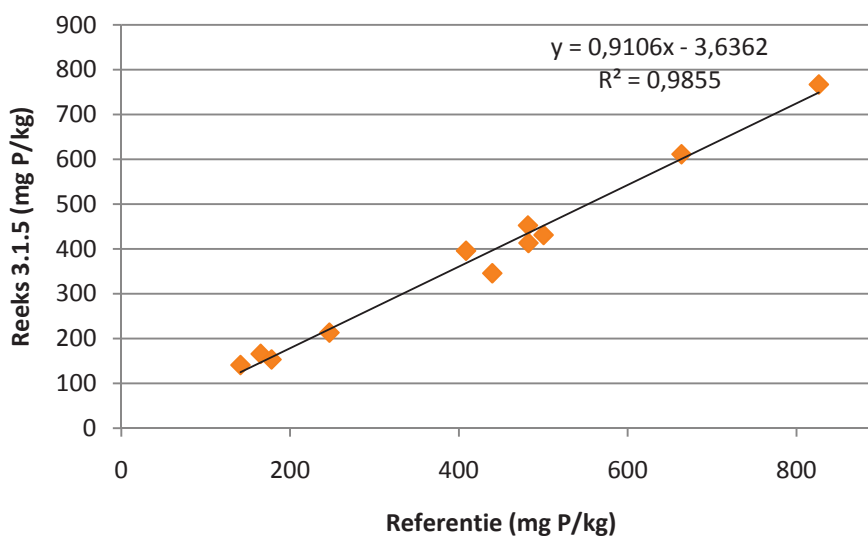
In Tabel 12 worden de resultaten weergegeven van de invloed van de pH van de extractievloeistof tijdens de extractie (reeks 3.2).

Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie pH 3.75	Reeks 3.2.: pH 3.6
20101646	826	767
20101647	664	611
20101648	247	213
20101649	440	346
20101650	165	166
20101651	482	452
20101652	141	141
20101653	409	396
20101654	178	153
20101655 A	482	413
20101655 B	500	431

Tabel 12: Invloed van de pH van de extractievloeistof tijdens de extractie

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.2. wordt weergegeven in Figuur 11.



Figuur 11: Invloed van pH (3.75 versus 3.6) van de extractievloeistof tijdens de extractie

Uit de waarde voor R^2 en de richtingscoëfficiënt blijkt dat er een mogelijke afwijking is op de lineaire correlatie tussen de referentiewaardes en de waardes uit reeks 3.2.. Dit wordt grafisch weergegeven in figuur 13.

pH 3.9 ipv 3.75

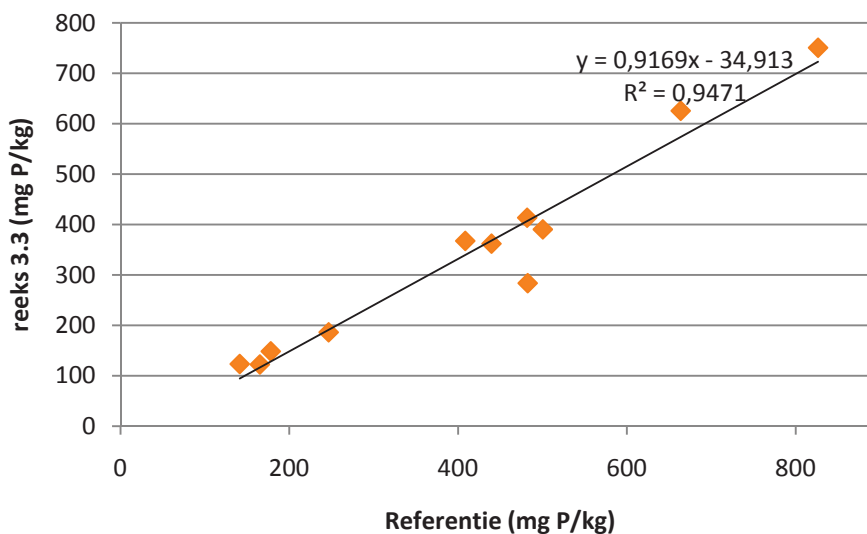
In Tabel 13 worden de resultaten weergegeven van de invloed van de pH van de extractievloeistof tijdens de extractie (reeks 3.3).

Eenheid: mg P/kg luchtdroge grond

monster	Referentie pH 3.75	Reeks 3.3.: pH 3.9
20101646	826	751
20101647	664	626
20101648	247	186
20101649	440	362
20101650	165	122
20101651	482	414
20101652	141	123
20101653	409	367
20101654	178	148
20101655 A	482	284
20101655 B	500	390

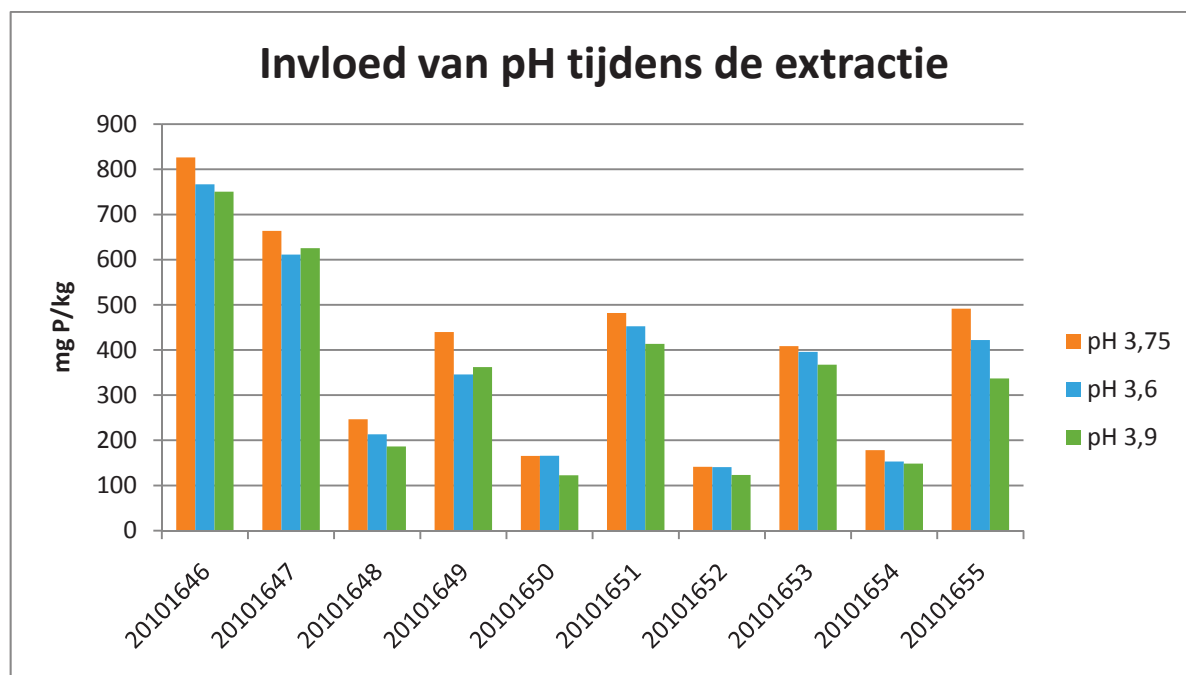
Tabel 13: invloed van de pH (3.75 versus 3.9) van de extractievloeistof tijdens de extractie

Het lineair verband tussen de referentiereeks en de reeks 3.2. wordt weergegeven in Figuur 12.



Figuur 12: Invloed van pH (3.75 versus 3.9) van de extractievloeistof tijdens de extractie

Uit de waarde voor R^2 blijkt dat er een mogelijke afwijking is op de lineaire correlatie tussen de referentiewaardes en de waardes uit reeks 3.3.. Dit wordt grafisch weergegeven in figuur 13.



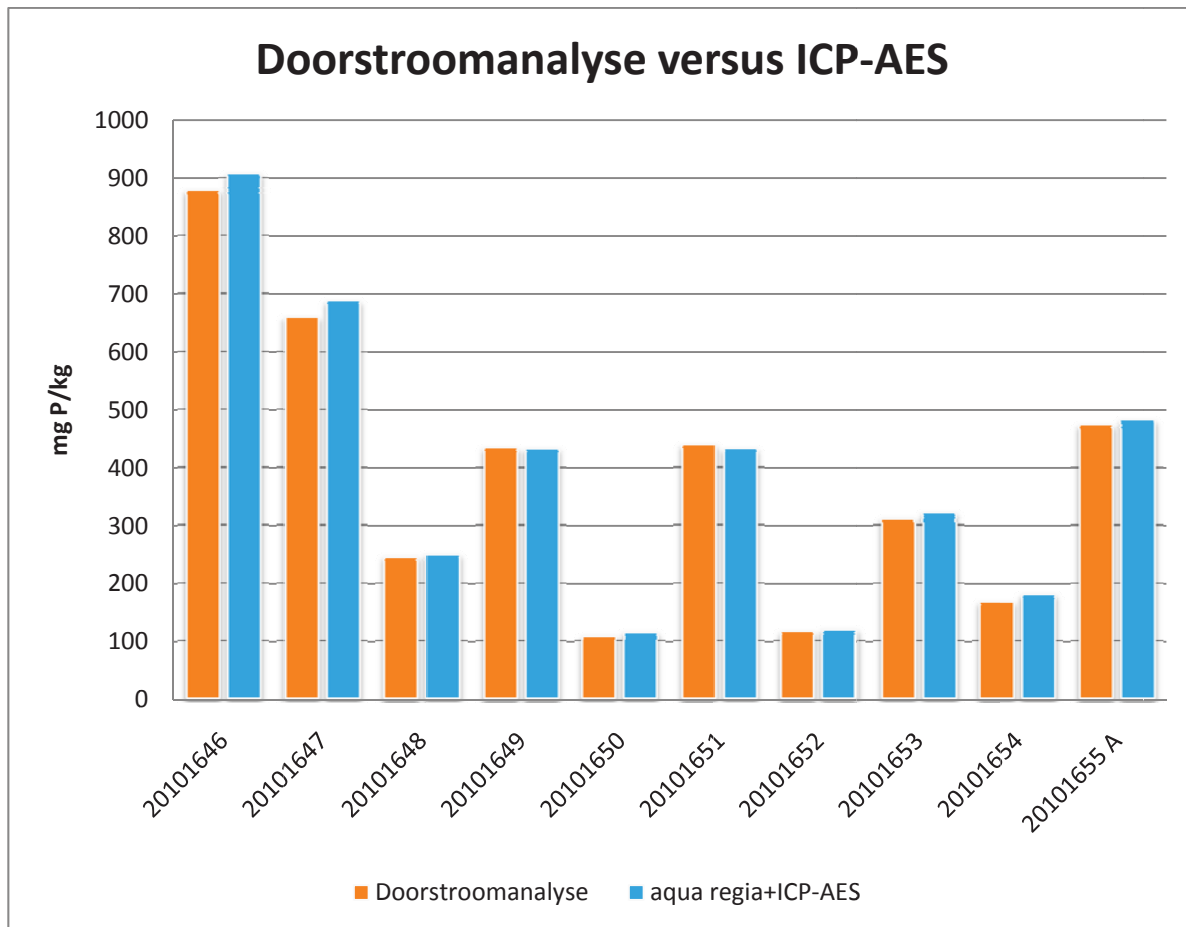
Figuur 13: invloed van pH van de extractievloeistof

In deze figuur wordt een invloed vastgesteld, bij sommige stalen is de afwijking kleiner dan de spreiding op de methode. Toch kan de pH van de extractievloeistof een significant verschil in eindresultaat geven.

Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat de optimale pH gelijk is aan 3.75, er is een invloed van de pH van de extractievloeistof aantoonbaar. Als de pH van de vloeistof gelijk is aan 3.6 of 3.9 dan ligt het rendement van de extractie lager.

2.5.7. VERGELIJKING MET ICP-AES-AES METINGEN

Aangezien fosfor ook met ICP-AES-AES kan bepaald worden, werden de stalen na de extractiebijkomend geanalyseerd met deze techniek. Voorafgaandelijk aan de ICP-AES analyses werd een aqua regia destructie uitgevoerd conform WAC/III/B/002. De bekomen ICP-AES resultaten werden gecorrigeerd met In (interne standaard). Figuur 14 geeft de resultaten van de ICP-AES analyses en de spectrofotometrische bepalingen weer.



Figuur 14: Vergelijking ICP-AES-AES met de spectrofotometrische bepaling

Bij de evaluatie van de resultaten wordt vastgesteld dat de ICP-AES meetwaarden resulteren in vergelijkbare resultaten met de spectrofotometrische metingen. Het matrix matchen van de standaarden en/of gebruik van interne standaard is noodzakelijk om tot de juiste P-gehalten te komen met ICP-AES.

Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat de de gemeten gehalten aan P bekomen met ICP-AES vergelijkbaar zijn met deze van de spectrofotometrische meting.

HOOFDSTUK 3. BESLUIT

Tijdens het validatie onderzoek werden volgende factoren nagegaan:

- De herhaalbaarheid van de P-AL extractie onder standaardvoorwaarden (§ 2.5.1). Onder standaardvoorwaarden wordt verstaan dat de procedure zoals beschreven in NEN 5793, wordt gevolgd;
- De invloed van de bewaringscondities van de geconcentreerde extractievloeistof (§ 2.5.2);
- De invloed van licht en het type recipiënt (glas/plastic) bij de extractie (§2.5.4);
- De invloed van centrifugatie ipv filtratie na de extractie (§ 2.5.5);
- De invloed van de afgewogen hoeveelheid monster bij de extractie met behoud van dezelfde ratio bodem: extractievloeistof (§ 2.5.5);
- De invloed van de pH van de extractievloeistof bij de extractie (§ 2.5.6)
- Bepaling van P met ICP-AES na zuurdestructie in vergelijking met de spectrofotometrische bepaling (§ 2.5.7).

Uit de bekomen resultaten valt af te leiden dat:

- De geconcentreerde extractievloeistof wordt bij voorkeur in het **donker bij 4°C bewaard**.
- De extractie in **glazen recipiënten** dient uitgevoerd te worden. Gebruik van plastic recipiënten resulteert in lagere meetwaarden voor P.
- Het uitvoeren van de extractie in het licht of donker bij gebruik van glazen recipiënten is geen kritische invloedsfactor.
- Bij dit onderzoek werd vastgesteld dat centrifugatie na de extractie resulteert in afwijkende resultaten tov filtratie, maar deze afwijking kan mogelijks gecorreleerd worden aan het gebruik van plastic recipiënten tijdens de centrifugatie.
- Wijziging in de hoeveelheid bodem voor het uitvoeren van de extractie heeft geen invloed zolang de verhouding bodem:extractievloeistof wordt gerespecteerd binnen de grenzen van 2.5 g : 50 ml versus 5 g : 100 ml.
- De pH waarde van de extractievloeistof heeft een invloed op het extractierendement, echter dit is monsterafhankelijk. De specificatie zoals beschreven in de huidige BAM methode (i.e. $\text{pH} = 3.75 \pm 0.05$) dient gerespecteerd te worden.
- Daarnaast is uit dit onderzoek gebleken dat de resultaten bekomen met ICP-AES en spectrofotometrie vergelijkbaar zijn.

De procedure zoals beschreven in BAM/deel 1/11 *Bepaling van fosfaat in grond extraheerbaar met een ammoniumlactaat-azijnzuurbuffer (P-AL)* kan behouden blijven mits volgende aanvullingen/wijzigingen:

- De extractie oplossing dient bij voorkeur in het donker bij 4°C bewaard te worden;
- De extractie moet uitgevoerd worden in GLAZEN recipiënten;
- De aanmaak van de hydrolyse oplossing is kritisch en dient exact te worden uitgevoerd zoals beschreven in de BAM methode.

BIJLAGE 1

monsternr	20101646	20101647	20101648	20101649	20101650	20101651	20101652	20101653	20101654	20101655
pHbodem	7,1	7,4	4,2	4,9	5,4	6,7	4,7	6	5,4	5,8
reeks										
1	779	618	212	391	139	444	123	176	144	444
2	758	598	199	385	121	404	115	225	92	429
3.1.1 ref	826	664	247	440	165	482	141	409	178	491
3.1.2	733	574	212	329	97	342	83	303	157	359
3.1.3	894	685	269	447	146	472	148	449	173	492
3.1.4	740	559	196	328	94	305	86	268	134	372
3.1.5	849	632	236	414	102	425	110	305	172	456
3.2	767	611	213	346	166	452	141	396	153	422
3.3	751	626	186	362	122	414	123	367	148	337
mean	741	583	206	359	122	392	113	305	141	397
STDEV	129	108	42	72	37	89	32	107	32	84
%RSD	17	18	20	20	30	23	28	35	23	21

Tabel 14: Algemeen overzicht van de bekomen resultaten uitgedrukt in mg P/kg luchtdroge grond