



Spectrofotometrische bepaling van ammonium in kleiwater, chloride en fluoride in sterk matrixbelaste afvalwaters

Optimalisatie en validatie

Bachelor in Chemie
Afstudeerrichting: Procestechnologie

Hoydonckx Jonas

Academiejaar 2015-2016

Campus Geel, Kleinhoefstraat 4, BE-2440 Geel

VOORWOORD

In eerste instantie zou ik Lesley Adriaensen, Tom Ooms en Kristien Schoone willen bedanken voor het in orde brengen van de stageplaats en het onderwerp. Tijdens mijn stage op het SCK•CEN heb ik veel bijgeleerd en ervaring opgedaan. Het was interessant en leerzaam om zelf eens op zoek te gaan naar een methode, deze op punt te stellen en de sterktes en zwaktes uit te halen.

Ik zou ook graag mijn externe begeleider, Peter van Bree, willen bedanken. Hij heeft me goed op weg geholpen toen ik aan de stage begon en hielp me elke keer meteen wanneer ik met een vraag zat of zijn hulp nodig had. Liliane Vos zou ik willen bedanken voor het helpen met het verkrijgen van enkele producten. Tot slot zou ik nog een dankwoord willen uitbrengen aan mijn stagebegeleider, Marc Thijs. Het internet was natuurlijk ook een uiterst zinvolle bron van informatie die me goed op weg heeft geholpen met mijn thesis.

SAMENVATTING

Tegenwoordig moet de samenstelling van vaste en vloeibare media steeds beter gekend zijn. In deze thesis geldt dit voor de bepaling van ammonium in kleiwater en de bepaling van chloride en fluoride in radioactief afvalwater. Voor deze anionen in die specifieke monstertypes zijn er op het SCK•CEN nog geen geschikte methodes in gebruik. Deze dienen dus opgesteld en gevalideerd te worden.

Ammonium wordt spectrofotometrisch bepaald met de phenate methode waarbij indofenol wordt gevormd die een blauwe kleur geeft en gemeten kan worden op 640 nm. Deze methode heeft een werkgebied van 0-1000 $\mu\text{g N/L}$. Chloride wordt bepaald op 480 nm met de ferricyanide methode waarbij roodoranje ijzer(III)thiocyanaat gevormd wordt. Het werkgebied van deze methode is van 0-30 mg Cl^-/L . Fluoride reageert met een lanthanum-alizarin complex ter vorming van een blauw fluoride-lanthanum-alizarin complex dat gemeten kan worden op 620 nm in een werkgebied van 50-2000 $\mu\text{g F}^-/\text{L}$. Elke methode wordt gevalideerd en getest op de invloeden van licht, tijd, pH en monstersamenstelling.

Uit validatiestudie is gebleken dat de methode voor ammonium de minst robuuste is, gevolgd door chloride en fluoride. Verder werd getest of metingen met een probe of met een cuvet een invloed heeft op de prestatiekenmerken. Vanuit analytisch standpunt is het gunstiger om met een cuvet te meten, maar wegens praktische overwegingen (radioactiviteit) wordt de probe verkozen.

INHOUDSTAFEL

VOORWOORD	2
SAMENVATTING	3
INHOUDSTAFEL	4
AFKORTINGEN	6
INLEIDING	7
1 INSTRUMENTATIE	8
1.1 UV-VIS spectrofotometrie	8
1.1.1 Principe	8
1.1.1.1 Wet van Lambert-Beer.....	8
1.1.2 Specificatie	8
1.1.2.1 UV-VIS spectrofotometer	8
1.1.2.2 Optical immersion probe	9
1.1.3 Voor- en nadelen probe ten opzichte van cuvet.....	10
1.2 pH-meter	10
1.2.1 Specificaties	10
2 VALIDATIE	12
2.1 Wat is een validatie?	12
2.2 Werkgebied	12
2.3 Precisie	12
2.4 Juistheid	13
2.5 Interferenties	14
2.6 Robuustheid	14
3 AMMONIAK BEPALING	15
3.1 Principe	15
3.2 Toepassingsgebied	15
3.3 Aanmaken oplossingen	16
3.4 Spectrum	16
3.5 Validatie	17
3.5.1 Werkgebied	17
3.5.2 Precisie	18
3.5.3 Juistheid	19
3.5.4 Interferenties	20
3.5.4.1 Invloed van de pH.....	20
3.5.4.2 Invloed van het Mg-citraat complex.....	22
3.5.5 Robuustheid	23
3.5.5.1 Verschillende volgorde reagentia.....	23
3.5.5.2 Invloed van de tijd	25
3.5.5.3 Invloed van het licht.....	25
3.6 Conclusie	26
4 CHLORIDE BEPALING	27
4.1 Principe	27
4.2 Toepassingsgebied	27
4.3 Aanmaak oplossingen	27
4.4 Optimalisatie	29
4.4.1 Verhouding monster/kleurreagens.....	29
4.4.2 Aanmaak kleuroplossing	30
4.5 Spectrum	31
4.6 Validatie	32
4.6.1 Werkgebied	32
4.6.2 Precisie	33

4.6.3	Juistheid	34
4.6.4	Interferenties	35
4.6.4.1	Invloed van de pH.....	36
4.6.5	Robuustheid	36
4.6.5.1	Invloed van tijd en licht	36
4.7	Conclusie	37
5	FLUORIDE BEPALING	38
5.1	Principe.....	38
5.2	Toepassingsgebied.....	38
5.3	Aanmaak oplossingen	39
5.3.1	Microdiffusie	39
5.3.1.1	De selectie van reagentia voor de microdiffusie	40
5.3.1.2	Optimalisatie van de tijd voor de microdiffusie.....	41
5.3.2	Verhouding monster / kleurreagens.....	41
5.4	Spectrum	42
5.5	Validatie.....	44
5.5.1	Werkgebied	44
5.5.2	Precisie	45
5.5.3	Juistheid	46
5.5.4	Interferenties	47
5.5.4.1	Invloed pH	47
5.5.5	Robuustheid	48
5.5.5.1	Invloed van de tijd	48
5.5.5.2	Invloed van het licht.....	48
5.6	Conclusie	49
BESLUIT 50		
LITERATUURLIJST		51

AFKORTINGEN

SCK•CEN	Studiecentrum voor kernenergie
SCH	Scheikunde
SNP	Natrium nitroprusside
LOD	Detectielimiet
LOQ	Kwantificeringslimiet
CV _r	Herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt
CV _i	Intralaboratorium-reproduceerbaarheids-variatiecoëfficiënt
La-ALC-F	Fluoride-lanthanum-alizarin complex
HMDS	Hexamethyldisilazane
HMDSO	Hexamethyldisiloxane
TMFS	Trimethylfluorosilane
RCA	Radiochemie

INLEIDING

Het studiecentrum voor kernenergie (SCK•CEN) is een onderzoekscentrum dat onderzoek en ontwikkelingen doet van duurzame technologieën met het oog op de toekomst. Het onderzoek situeert zich voornamelijk in het gebied van vreedzame toepassingen van radioactiviteit.

De proeven worden uitgevoerd in de expertgroep Radiochemie (RCA). De taak van RCA is voor het uitvoeren van radiochemische en instrumentele analyses enerzijds en het op punt stellen van chemische processen anderzijds. De analytische groep binnen RCA heeft als doel het aanbieden van analyses voor interne en externe klanten. Zij streven voortdurend naar het verbeteren van bestaande methoden en het uitbreiden van de analysemogelijkheden.

De analyse van chloride en fluoride kadert in de karakterisatie van vloeibare nucleaire afvalstromen. Deze afvalwaters zijn doorgaans sterk zuur en hebben vaak een hoge matrixbelasting die bovendien nog erg wisselend kan zijn. Door het zure karakter van deze waters is een standaardmethode voor anionen, zoals ionchromatografie, onbruikbaar. Bovendien moet de methode zodanig gekozen worden dat contact tussen toestel en monster zoveel mogelijk beperkt of vermeden kan worden. Indien UV-VIS wordt gebruikt in combinatie met een externe probe, voldoet het zeker aan deze laatste voorwaarde. Het nadeel alsook het voordeel van UV-VIS is dat deze zeer specifiek is voor de bepaling van één anion. Hierdoor zal er geen last ondervonden worden van bijvoorbeeld de nitraten in zuur milieu. Voor zeer veel anionen zijn al methodes ontwikkeld en zijn de interferenties dus ook goed gekend.

De bepaling van ammonium is van belang voor de karakterisatie van kleiwater. Ammonium wordt nu gemeten met ion selectieve electrode, maar deze techniek is weinig accuraat en robuust gebleken waardoor men wil overschakelen naar een UV-VIS meting.

1 INSTRUMENTATIE

1.1 UV-VIS spectrofotometrie

1.1.1 Principe

Spectrofotometrie is een methode waarbij de hoeveelheid geabsorbeerd licht gemeten wordt ten opzichte van de intensiteit van de lichtstraal wanneer deze door een monster is gegaan. Het basis principe is dat elke ion licht absorbeert of uitstraalt over een bepaalde breedte van golflengtes. (chemwiki)

Een UV-VIS spectrofotometer maakt gebruik van twee verschillende lampen. Met een deuteriumlamp kan er gemeten worden in het UV gebied en met de wolframamp kan er in het visuele gebied gewerkt worden. Met deze twee lampen in combinatie kunnen metingen van een golflengte uitgevoerd worden over het hele spectrale gebied. (Perkampus, 1992, p. 12)

1.1.1.1 Wet van Lambert-Beer

De wet van Lambert-Beer vormt de basis voor de licht-absorptie metingen van gassen en vloeistoffen in het UV-VIS en IR gebied. Volgens de wet van Lambert zal een monster altijd een bepaalde hoeveelheid van het licht absorberen, ongeacht de sterkte van de lichtstraal. Dit zorgt ervoor dat de verkregen resultaten onafhankelijk zijn van de lichtbron en dus enkel afhankelijk van de hoeveelheid licht geabsorbeerd wordt door het monster. (GE Healthcare Life Science, 2012)

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Met:

I = De intensiteit van het licht dat het monster verlaat

I₀ = De intensiteit van het licht voordat deze het monster binnengaat

T = Doorlaatbaarheid

De wet van Beer wordt vooral gebruikt bij kleine concentratie ($c \leq 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) omdat de extinctie coëfficiënt bij een te hoge concentratie niet meer constant is en er dus geen lineair verband meer is tussen de absorptie en de dikte van het materiaal.

$$A = \varepsilon * d * c$$

Met:

A = absorbantie

ε = extinctie coëfficiënt ($\frac{\text{L}}{\text{mol} * \text{cm}}$)

d = weglengte of dikte van het materiaal (cm)

c = de concentratie van het monster ($\frac{\text{mol}}{\text{L}}$)

Bij het gebruik van cuvetten zal een deel van het licht verloren gaan door reflectie. Om deze fout tegen te gaan zal er gewerkt gaan worden met een referentie of blanco meting. (Perkampus, 1992, p. 3-4)

1.1.2 Specificatie

1.1.2.1 UV-VIS spectrofotometer

Voor het uitvoeren van de metingen met de UV-VIS spectrofotometer werd de UV-1800 (Schimadzu) gebruikt. De spectrofotometer kan meten tussen 190 – 1100 nm met een

nauwkeurigheid van 1 nm. Er werd gekozen om de spectrofotometer te koppelen aan een besturingsprogramma genaamd 'UVProbe'. Deze software heeft meerdere modes waarvan er met slechts een aantal gewerkt wordt tijdens deze proeven: de fotometrische, spectrum en kwantificering mode.

De fotometrische mode wordt gebruikt voor het meten van de absorbantie of transmissie bij één of meerdere golflengtes. De spectrum mode is voor het bepalen van het spectrum van een staal door een scanning uit te voeren van de golflengte. De kwantificering mode maakt een kalibratiecurve van de standaarden en gebruikt deze om de concentraties te berekenen van de onbekende monsters. (Shimadzu) In het programma UVProbe zullen de fotometrische en kwantificering mode beide onder de Photometric module vallen. De concentraties van de onbekende monsters en kalibratiecurve zullen dus direct berekend worden samen met de metingen van de stalen.

Bij de UV-VIS spectrofotometers zijn er twee type toestellen: een enkele straal en een dubbele straal. Het toestel dat wordt gebruikt voor de proeven is een dubbele straal toestel. Bij dit type toestel wordt de primaire lichtstraal opgesplitst in twee stralen waarbij de ene straal naar de referentie cuvet gaat en de andere straal naar de te meten cuvet. Beide cuvetten staan 10 tot 15 cm uit elkaar en zullen, nadat ze terug samen gefocust zijn, licht van verschillende intensiteiten op de detector laten vallen wat een afwisselend signaal genereert. (Perkampus, 1992, p. 12)

1.1.2.2 Optical immersion probe

Omdat er gewerkt zal worden met licht radioactieve stalen is het niet evident om met een cuvet binnenin de spectrofotometer te werken. Indien hier gemorst zou worden geraakt het gehele toestel besmet. Dit is iets wat dient vermeden te worden. Om de kans op contaminatie van het toestel te verminderen worden de UV-VIS metingen extern uitgevoerd. Dit wil zeggen dat er met een Optical Immersion Probe gewerkt wordt die met twee glasvezels verbonden is met een cuvet in de spectrofotometer. De gebruikte probe is van het type 661.622-UVS en heeft een weglengte van 20mm (Hellma Analytics, 2015). De hogere weglengte van de probe zou moeten resulteren in een beter resultaat, maar omdat het licht via twee 1 meter lange glasvezels gaat zullen er hier verliezen optreden. De verliezen van lichtintensiteit zijn groter dan de winst in gevoeligheid waardoor de accuraatheid uiteindelijk slechter uitvalt.

1.1.3 Voor- en nadelen probe ten opzichte van cuvet

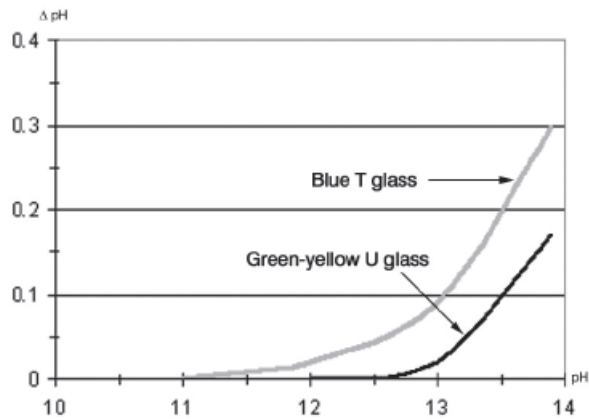
Tabel 1.1 Voor-en nadelen van de probe t.o.v. de cuvetten

	Voordelen	Nadelen
Besmetting	Bij besmetting kan de probe makkelijk vervangen worden	Meer kans op cross contaminatie door druppels die aan de probe blijven hangen
Afval	Geen afval cuvetten, minder water nodig om te reinigen	Meer afval van doekjes voor het droogmaken van de probe
Snelheid	/	Metten gaat trager dan met de cuvetten
Nauwkeurigheid	Hogere absorbantie, hogere rico en grotere weglengte	Veel verlies door lange glasvezels
Producent	Een goede en betrouwbare producent	Probe en spectrofotometer niet van zelfde bedrijf. De spectrofotometer is dus niet voorzien voor het werken met de probe
Stabiliteit	/	De gegeven absorbantie tussen de verschillende dagen verschilt. Dit geeft een zeer slechte reproduceerbaarheid.

1.2 pH-meter

1.2.1 Specificaties

Omdat indofenol bij de bepaling van ammoniak pH afhankelijk is (paragraaf 3.5.4.1) zal deze bepaald moeten worden met een pH-meter. De pH meter die gebruikt wordt is de Metrohm pH-meter 713 en heeft een resolutie van 0,001. Deze pH-meter heeft tevens een ingebouwde temperatuur sensor die gemeten kan worden met een gecombineerde pH glaselektrode Pt 1000. De gemeten temperatuur in het labo varieert tussen 22,5°C en 24°C. De kalibratie gebeurde met een Metrohm bufferoplossing van pH 7,00 en 9,00 waarbij een richtingscoëfficiënt van 0,997 verkregen werd. Er waren tevens bufferoplossingen aanwezig van het bedrijf 'Hanna instruments' met een pH van 10,01; 12,00 en 13,00. Helaas konden deze bufferoplossingen niet gebruikt worden voor de kalibratie van de pH-meter omdat de pH 10,01 buffer niet betrouwbaar leek te zijn en de pH 12,00 en 13,00 een error gaven bij kalibratie. Deze error werd veroorzaakt door een asymmetrisch potentiaal dat te zien is in Figuur 1.1.



ΔpH has to be added to the measured pH value. Valid for $c(\text{Na}^+) = 1.0 \text{ mol/L}$

Figuur 1.1 Alkalische error en typische correctie curves voor verschillende pH glazen (Haider, 2004, p. 10)

Het grote nadeel is dat de bufferoplossingen van pH 12,00 en 13,00 niet gebruikt kunnen worden voor de kalibratie, maar dat er gewerkt zal moeten worden buiten het kalibratiegebied waardoor de gemeten waarden dus niet helemaal juist zijn. Indofenol zal gemeten worden bij een pH van 8,8 – 11,5 wat dus ver buiten de kalibratiecurve ligt van pH 7,00-9,00.

2 VALIDATIE

2.1 Wat is een validatie?

Met de validatie van een analysemethode wordt er aangetoond of de gebruikte analysemethode al dan niet geschikt is voor het desbetreffende doel. Er kan hier vertrokken worden uit twee verschillende standpunten: vastgelegde eisen en niet-specifieke eisen. Bij de vastgelegde eisen dient te methode hieraan te voldoen. Indien dit het geval is zal de validatie deze eisen slechts bevestigen. Wanneer er geen specifieke eisen zijn vooropgesteld, zal de validatie informatie geven over de mogelijkheden en beperkingen van de methode.

De belangrijkste prestatiekenmerken voor de validatie die aan bod komen zijn: het afbakenen van het werkgebied, de precisie en juistheid van de methode. In deze thesis worden ook nog de robuustheid en selectiviteit aangehaald omdat deze tevens van groot belang zijn. De selectiviteit wordt in beperkte maten gecontroleerd en vermeld onder de noemer: interferenties. De gebruikte definities van de validatie worden gehaald uit een document van Vito (Vito, 2011, p.2-17).

Voor de berekeningen van de prestatiekenmerken bestaan talrijke benaderingen. Voor de berekeningen wordt de werkwijze die courant wordt gebruikt binnen de RCA groep overgenomen. Dit heeft als voordeel dat de prestatiekenmerken van verschillende methode met elkaar vergeleken kunnen worden.

2.2 Werkgebied

Het werkgebied is het interval tussen de kleinste en grootste concentratie van het ion waarvoor de analysemethode gevalideerd is en bestaat uit twee delen: de ondergrens en de bovengrens. De bepaling van de ondergrens kan nog eens opgedeeld worden in twee delen: detectielimiet (LOD) en kwantificeringslimiet (LOQ).

De LOD (2.1) geeft de minimale concentratie van een analyt weer dat onderscheiden kan worden van de analyse achtergrond op een bepaald betrouwbaarheidsniveau. De LOQ (2.2) is de minimale concentratie van een analyt die gekwantificeerd kan worden met een bepaald niveau van precisie en nauwkeurigheid. Hieruit kan vastgesteld worden dat de LOD slechts een limiet voor lage concentraties is waarop de aan-of afwezigheid kwalitatief bepaald kan worden terwijl de LOQ de limiet voor lage concentraties zet waarop ze kwantitatief bepaald kunnen worden. (Lawson, 1994, p. 1218)

$$LOD = |\bar{x}|_{blanco} + 3 * S_{blanco} \quad (2.1)$$

$$LOQ = |\bar{x}|_{blanco} + 10 * S_{blanco} \quad (2.2)$$

De bovengrens wordt vaak begrensd door de lineariteit van de methode. Men spreekt over een lineaire analysemethode wanneer het verband tussen de te bepalen component en de gekende component rechtlijnig is. Wanneer er een niet lineair verband is tussen deze twee componenten dient het werkgebied van de analysemethode verkleind te worden. Er is echter ook de mogelijkheid om over te schakelen naar een kwadratische functie.

2.3 Precisie

De precisie van een analysemethode is een maat van de spreiding op de analyseresultaten. De mate van spreiding wordt verkregen doordat er een herhaald

aantal metingen gedaan worden op hetzelfde monster onder vastgelegde condities. De precisie wordt onderverdeeld in twee karakteristieken: de reproduceerbaarheid en de herhaalbaarheid. De herhaalbaarheid (2.4) wordt gemeten onder dezelfde omstandigheden, door dezelfde laborant, in hetzelfde laboratorium met dezelfde apparatuur zo kort na elkaar. Het is dus een maat van spreiding tussen onafhankelijke resultaten die verkregen zijn met dezelfde methode op hetzelfde staal met zo min mogelijk veranderingen op de meetcondities en wordt uitgedrukt als de herhaalbaarheidsstandaardafwijking (S_r) of de herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt (CV_r).

$$S_r = \sqrt{S_r^2} = \sqrt{MS_{within}} \quad (2.3)$$

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \quad (2.4)$$

Met:

MS_{within} = De mean square afkomstig van een 'ANOVA: single factor' van metingen van dezelfde dag

De bepaling van de reproduceerbaarheid gebeurt door middel van een ringtest waarbij verschillende laboratoria deelnemen en dezelfde methode toegepast wordt. Dit valt echter buiten het doel van dit werk. Daarom wordt er bij deze methodes niet de reproduceerbaarheid, maar de intralaboratorium-reproduceerbaarheid, ook wel de intermediaire reproduceerbaarheid genoemd, bepaald. Voor de reproduceerbaarheid dient telkens vermeld te worden welke omstandigheden veranderd worden tijdens te metingen.

De intralaboratorium-reproduceerbaarheid (2.7) is gelijkaardig voor de bepaling van de herhaalbaarheid, op één cruciaal verschil na. Bij de intralaboratorium-reproduceerbaarheid worden de analyse-omstandigheden zo hard mogelijk veranderd met in het bijzonder de tijd. Dit wil zeggen dat de metingen op verschillende dagen zullen gebeuren met een zo groot mogelijk tijdsspanne, telkens met een andere kalibratie en eventueel andere laboranten. De gebruikte maat voor de reproduceerbaarheid is de intralaboratorium-reproduceerbaarheidsstandaardafwijking (S_I) of de intralaboratorium-reproduceerbaarheids-variatiecoëfficiënt (CV_I).

$$S_A^2 = S_{between}^2 = \frac{MS_{between} - MS_{within}}{n_j} \quad (2.5)$$

$$S_I = \sqrt{S_I^2} = \sqrt{S_r^2 + S_A^2} \quad (2.6)$$

$$CV_I = \frac{S_I}{\bar{x}} \quad (2.7)$$

Met:

$MS_{between}$ = De mean square afkomstig van een 'ANOVA: single factor' van metingen van verschillende dagen

n_j = Het 'between effect'. De nummer van het aantal replica's van de MS_{within}

2.4 Juistheid

De juistheid van een analysemethode is de mate van overeenkomst tussen de werkelijke waarde of de waarde die als werkelijk wordt aangenomen en het gemiddelde van een reeks meetwaarde. Er wordt bij deze experimenten vooral gekeken naar de terugvinding van de analysemethode en niet naar een analyse referentiemonster en ringtest. Er werd meegedaan aan een ringtest, maar hiervan konden geen resultaten weergegeven worden. Met de term 'terugvinding' bedoeld men de hoeveelheid gekende component die teruggevonden kan worden wanneer deze toegevoegd wordt

aan een gekend of onbekend monster. Uit de resultaten van de terugvinding kan de bias of systematische fout berekend worden.

2.5 Interferenties

Interferenties van een methode vallen onder de selectiviteit. Met de selectiviteit van een analysemethode bedoelt men de mate waarmee de te bepalen component onderscheiden kan worden van andere bestanddelen wanneer deze component zich bevindt in een mengsel of matrix. Wanneer de analysemethode een voldoende hoge selectiviteit heeft zullen de bepalingscondities zodanig gekozen worden dat de interfererende componenten binnen de onzekerheidsmarge vallen of gewoonweg geëlimineerd worden.

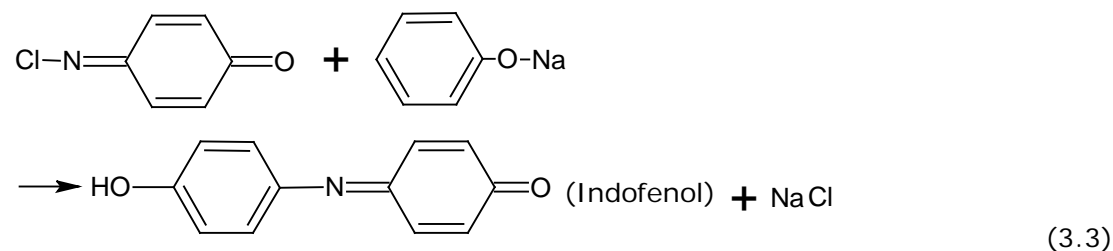
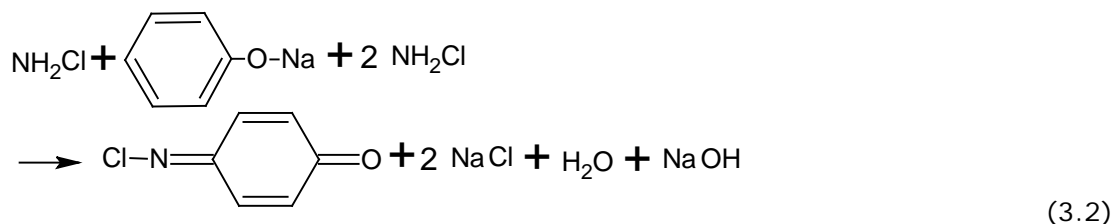
2.6 Robuustheid

Met de robuustheid gaat men na hoe gevoelig/ongevoelig de resultaten van een methode is bij kleine variaties. Wanneer de methode geen last ondervindt van deze variaties kan de methode als zeer robuust bestempeld worden, maar wanneer een kleine variatie al snel een verandering in resultaten geeft heeft de methode eerder een lage robuustheid. Onder deze kleine variaties verstaat men het anders uitvoeren van de methode, de omstandigheden waarin deze methode wordt uitgevoerd en de hoedanigheid van het materiaal.

3 AMMONIAK BEPALING

3.1 Principe

Er wordt een blauw kleurreagens, indofenol, gevormd door middel van een reactie van ammoniak, hypochloriet en fenol met natrium nitroprusside (SNP) als katalysator. In alkalisch medium (pH = 8-11,5) zal eerst chlooramine gevormd worden door de reactie van ammoniak en hypochloriet (3.1). Het gevormde chlooramine zal op zijn beurt reageren met fenol en de overmaat aan hypochloriet ter vorming van quinone chlooramine (3.2). Vervolgens zal quinone chlooramine reageren met een overmaat aan fenol ter vorming van het indofenol (3.3).



Bij deze methode zijn de meest voorkomende interferenties te wijten aan magnesium en calcium. De interfererende ionen worden geëlimineerd door het toevoegen van natriumcitraat. Natriumcitraat vormt een complex met deze ionen zodat ze in oplossing blijven, niet kunnen neerslaan bij hoge pH en dus niet voor interferentie kunnen zorgen. De effecten van de interferenties worden verder besproken in paragraaf 3.5.4.2. De bepaling van ammonium wordt uitgedrukt in $\mu\text{g N/L}$ i.p.v. $\mu\text{g NH}_4^+/\text{L}$.

3.2 Toepassingsgebied

De spectrofotometrische bepaling van ammoniak zal voornamelijk gebeuren voor de ammoniak bepaling in kleiwater. Kleiwaters zijn waterige oplossingen die in contact zijn geweest met klei en een vrij hoog humuszuurgehalte kunnen hebben. Dit kan als gevolg hebben dat de oplossingen een licht tot donkerbruine kleur hebben. De bruine kleur geeft een verhoging in absorptie, maar stoort tot dusver de bepaling niet doordat er een correctie uitgevoerd kan worden met een blanco. De humuszuren die in de waterige oplossing zitten kunnen neergeslagen worden door een verlaging in pH toe te passen.

De methode beschreven in dit hoofdstuk dient ter vervanging van de reeds bestaande methode: ion selectieve electrode. De huidige methode bleek onbetrouwbaar voor dit soort monsters.

3.3 Aanmaken oplossingen

Veel van de oplossingen moeten zelf aangemaakt worden en zijn vaak niet op voorraad beschikbaar. In *Bijlage 1. Lijst met gevaren van producten voor bepaling van NH_4^+ , Cl^- & F^-* is een overzicht met de producten die gebruikt gaan worden voor deze methode en wat de eventuele gevaren zijn die het gebruik hiervan met zich meebrengt. In Tabel 3.1 wordt weergegeven hoe de oplossingen dienen aangemaakt te worden volgens Eaton, Clesceri, Rice & Greenberg (2005, p. 4-114), de functie van het product in de reactie en de bewaartijden. Al de oplossingen worden aangelengd met gedemineraliseerd water met uitzondering op de fenoloplossing.

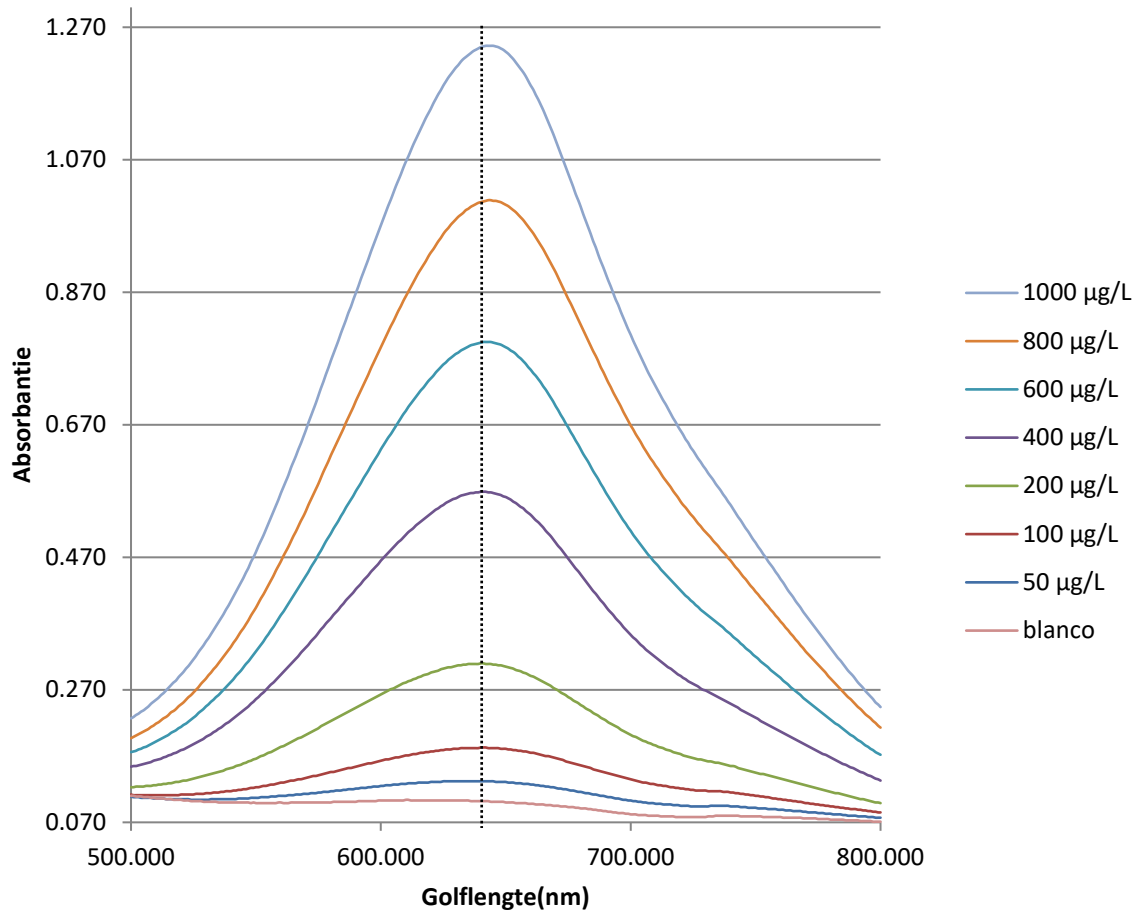
Tabel 3.1 Aanmaak van de kleurreagentia

Oplossingen	Producten	m (g) of V (ml)	V _{Totaal} (ml)	houdbaarheid	Functie
Fenoloplossing	Fenol (≥89%)	11.1 ml	/	1 week	Vorming Indofenol
	Ethanol 95%	/	100		
Natrium nitroprusside		0.5 g	100	1 maand	katalysator
Alkalisch citraat	Natrium citraat	200 g	1000	n.v.t.	Verwijderen interferenties door complexvorming met Mg^{2+} & Ca^{2+}
	Natrium hydroxide	10 g			
Natrium hypochloriet (5%)	Natrium hypochloriet (10%)	25 ml	50	2 maand	Vorming indofenol
Oxiderende oplossing	Alkalisch citraat	100 ml	100	1 dag	Vorming indofenol + verwijderen interferenties door complexvorming met Mg^{2+} & Ca^{2+}
	Natrium hypochloriet (5%)	25 ml	25		

De kleur van de oplossingen is stabiel na 1 uur. Na 60 minuten wachten kunnen de oplossingen gemeten worden bij een golflengte van 640nm.

3.4 Spectrum

Om de verandering in absorptantie in een ander perspectief te zien werd er een volledig spectrum opgenomen tussen 500 en 800 nm van de te meten piek. Het weergegeven spectrum in Figuur 3.1 werd opgesteld door het spectrum van elke standaardoplossing die gebruikt wordt voor de curve weer te geven. Het exacte punt op de piek, bij een golflengte van 640 nm, waarbij de absorptantie van de oplossingen wordt gemeten wordt weergegeven met een stippellijn op de grafiek.



Figuur 3.1 Spectrum standaardcurve phenate methode

Zoals op de bovenstaande grafiek te zien wordt de absorbantie op het maximum van de piek gemeten. De kleur van de oplossing geeft op deze plaats, voor de geconcentreerde oplossingen, een donker blauwe kleur afkomstig van indofenol. De piek reikt van ongeveer 850 nm tot 450 nm.

3.5 Validatie

3.5.1 Werkgebied

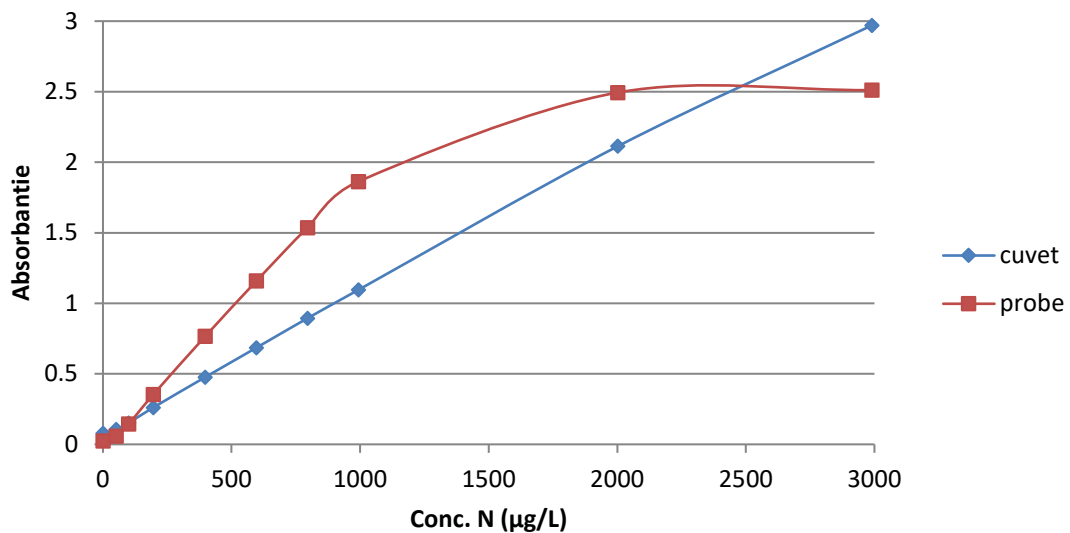
Voor het berekenen van zowel de detectielimiet (2.1) als de kwantificeringslimiet (2.2) is een standaard deviatie nodig. De gebruikte standaarddeviatie is afkomstig van de herhaalbaarheid op blanco metingen (zie paragraaf 3.5.2). Er wordt een gemiddelde genomen van de berekende concentraties van alle blanco stalen die gemeten zijn. Dit gemiddelde wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 3.2 Bepaling van de ondergrens ($\mu\text{g N/L}$)

	S_r	$ \bar{x} _{\text{blanco}}$	LOD	LOQ
Cuvet	2,99	11,53	20,51	41,45
Probe	4,66	2,29	16,26	48,88

De laagste concentratie die gedetecteerd kan worden is 20,51 $\mu\text{g N/L}$. Deze waarde is afkomstig van de cuvet en is lichtjes hoger dan deze van de probe. De reden achter dit verschil tussen cuvet en probe bij de LOD is afkomstig van de gemiddelde concentratie van de blanco stalen. Bij de probe zijn er een redelijke hoeveelheid aan stalen die een negatieve concentratie uitkomen. Hierdoor krijg je iets wat lijkt op de verdeling van een gausscurve met 0 $\mu\text{g N/L}$ in de buurt van de piek van de curve. Dit effect heb je bij de cuvet niet waardoor de concentratie van de probe dicht bij de 0 $\mu\text{g N/L}$ komt te liggen. Het gebruik van de probe resulteert echter in een hogere standaarddeviatie waardoor er een hogere LOQ verkregen wordt dan bij de cuvet. Met een LOQ van 48,88 $\mu\text{g N/L}$ wordt de ondergrens van de methode vastgelegd op 50 $\mu\text{g N/L}$ en zal gebruikt worden als laagste standaard.

Voor de bepaling van de bovengrens werd Figuur 3.2 opgemeten. Dezelfde oplossingen werden gebruikt voor zowel de bovengrens van de cuvet alsook de probe. Beide ijklijnen worden in onderstaande grafiek weergegeven. Hierin is duidelijk te zien dat de metingen met de cuvet een lagere absorptantie geven tot 3000 $\mu\text{g N/L}$, terwijl de probe een grotere ricio geeft.



Figuur 3.2 De bovengrens van de phenate method

Wanneer beide instrumenten worden toegepast is er een duidelijk verschil in de curve waarneembaar. De standaardcurve opgemeten met de cuvet geeft een lineair verband tot ongeveer 2000 $\mu\text{g N/L}$ en vertoont een licht afbuiging bij 3000 $\mu\text{g N/L}$. De standaardcurve van de probe is echter maar lineair tot 1000 $\mu\text{g N/L}$ en vertoont een forse verandering t.o.v. 2000 $\mu\text{g N/L}$. Omdat alle metingen later met de probe worden uitgevoerd wordt voor deze methode de bovengrens vastgelegd op 1000 $\mu\text{g N/L}$.

3.5.2 Precisie

Er zijn voor de bepaling van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid in duplo blanco stalen gemeten die afzonderlijk staan van de blanco gebruikt in de standaardcurve. Voor de cuvet werd dit gedaan op 9 verschillende dagen en voor de probe op 6 verschillende dagen.

De bepaalde precisie is enkel geldig voor lage concentraties dicht bij de LOD. Voor hogere concentraties moet een aparte proefopzet met herhaalde metingen uitgevoerd worden, bij voorkeur met reële stalen of gesimuleerde stalen. Deze waren echter nog niet beschikbaar en kunnen dus niet opgenomen worden in de thesis.

De herhaalbaarheid wordt bepaald met formule (2.3) waarbij MS_{within} een waarde heeft van 8,95 voor de cuvet en 21,71 voor de probe. De resultaten van de precisie worden weergegeven in Tabel 3.3.

De intralaboratorium-reproduceerbaarheid wordt bepaald met formule (2.5) en (2.6) waarbij de MS_{between} een waarde heeft van 480,22 voor de cuvet en 908,24 voor de probe. Omdat er in duplo gemeten wordt is n_j gelijk aan 2. Wanneer op deze gegevens de beide formules worden toegepast zal het resultaat in Tabel 3.3 bekomen worden.

Tabel 3.3 Resultaten van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid

	Herhaalbaarheid	Intralaboratorium-reproduceerbaarheid	
	S_r ($\mu\text{g N/L}$)	S_A^2 ($\mu\text{g N/L}$) ²	S_i ($\mu\text{g N/L}$)
Cuvet	2,99	235,64	15,64
Probe	4,66	443,26	21,56

Er is een duidelijk verschil waarneembaar tussen de precisie van de cuvet en van de probe. De precisie van de cuvet is beter dan de probe doordat de concentraties van de cuvet lager zijn in vergelijking met deze van de probe. Dit betekent dat de resultaten die bekomen worden met de cuvet beter zullen zijn of hiertoe een grotere kans hebben dan wanneer deze met de probe uitgevoerd zou worden. Wanneer echter de waarden van zowel de cuvet als de probe worden vergeleken met de ondergrens, van 50 $\mu\text{g N/L}$, is duidelijk waarneembaar dat deze hier ver onderliggen. De intralaboratorium-reproduceerbaarheid van de probe heeft de hoogste waarde en is twee maal kleiner dan de ondergrens. Dit alles duidt op een relatief goede precisie van de gebruikte methode.

3.5.3 Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werd een recovery-experiment (terugvinding-experiment) uitgevoerd. Bij dit soort experimenten wordt een gekende hoeveelheid standaard oplossing toegevoegd (gespiked) aan een ion die men wilt terug vinden tijdens de analyse. In Tabel 3.4 zijn onder andere twee verschillende onafhankelijke standaarden gespiked met 200 $\mu\text{g N/L}$ standaard oplossing.

Tabel 3.4 Bepalen van de juistheid met een gespikete monster oplossing

Sample ID	Absorbantie	Conc. N ($\mu\text{g/L}$)	Conc. standaard theorie ($\mu\text{g/L}$)	Conc. standaard praktijk ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)	
Cuvet	Onafhankelijke standaard 1	0,584	443	198	197	99%
	Spike 1	0,464	640			
	Onafhankelijke standaard 2	0,707	343	197	203	103%
	Spike 2	0,820	546			

Uit de spike oplossingen van de onafhankelijke standaarden werd een vrij hoog percentage van de toegevoegde standaard oplossing teruggevonden. Dit betekent dat

de gebruikte methode een goede terugvinding heeft. De concentraties uit Tabel 3.4 werden berekend uit de absorptantie met formule (3.7).

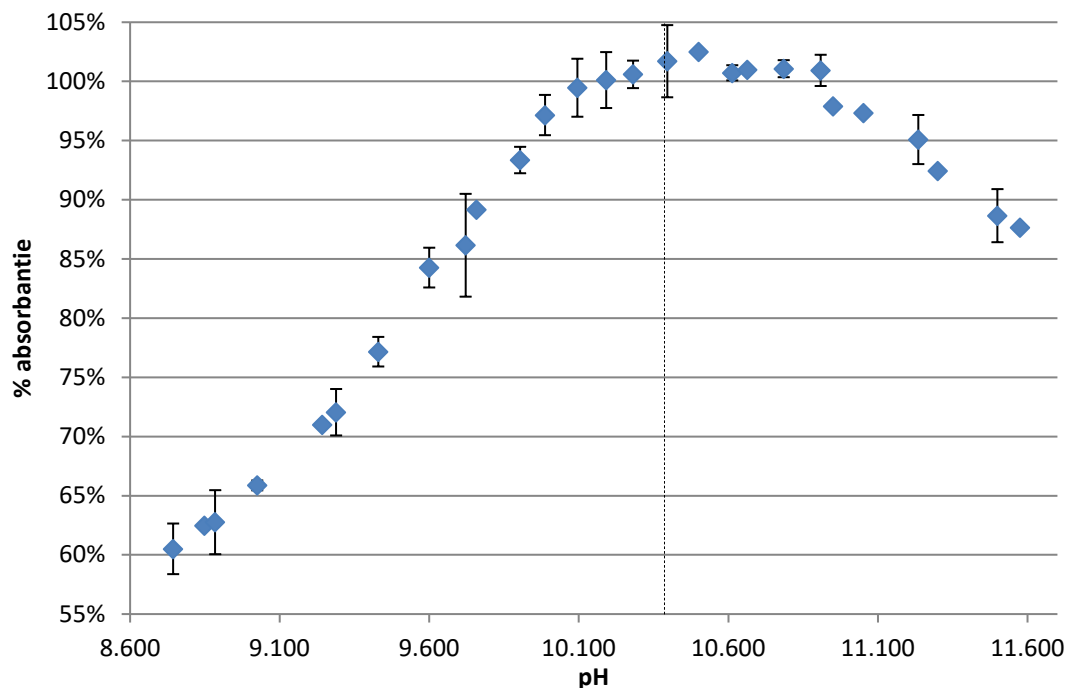
$$\text{Absorbantie} = 0,0012 \frac{L}{\mu\text{g N}} * \text{Conc. N} + 0,0523 \quad (R^2 = 0,9995) \quad (3.7)$$

Voor de gebruikte methode is ook een ringtest staal gemeten. Dit staal is vrij laat in de stageperiode gekomen waardoor er nog geen referentiewaarde voor dit staal beschikbaar is. Het gevonden resultaat kan dus niet weergegeven worden.

3.5.4 Interferenties

3.5.4.1 Invloed van de pH

Voor het gebruik van deze methode dient de zuurtegraad van het monster of de standaard gekend te zijn. Indofenol is namelijk zeer gevoelig voor een verandering in pH. Indofenol zelf heeft een gele kleur, het gedissocieerde product van indofenol, het indofenol zout, geeft een blauwe kleur. De blauwe kleur van het indofenol zout zal intenser worden op een hogere pH, mogelijk net boven 10, wanneer de verhouding indofenol zout/indofenol bijna 100% is. (Alm, Oh & Park, 2009, p. 2037) Een lagere pH heeft dus een negatieve invloed op de kleurintensiteit, bij een pH waarde lager dan 8 zal de reactie zelfs niet op gang schieten. Bij een pH hoger dan 11,5 is de oxidatie van ammoniak naar nitraat niet compleet en zal de oplossing stilaan groen beginnen te zien in plaats van blauw. Volgens Anthimidis et al. (2010, p. 122-123) ligt de ideale pH voor de indofenol reactie, met de maximale absorptantie, op $10,4 \pm 0,1$. Deze maximale absorptantie staat met een stippellijn aangeduid op Figuur 3.3. Omdat indofenol zo sterk pH afhankelijk is kan de tijd nodig voor kleurvorming verschillen bij een verschil in pH tussen stalen. Ook wordt er een verschil waargenomen in pH tussen standaardoplossingen en monsters.



Figuur 3.3 De invloed van de pH op de absorptantie op de phenate method

De curve is opgemeten door aan drie verschillende standaardoplossingen verschillende hoeveelheden zuur en base toe te voegen. Dit gebeurde twee maal met ongeveer een maand tussen de metingen. Van deze metingen werd een gemiddelde genomen binnen

een bepaald pH gebied (Tabel 3.5). De absorbantie wordt relatief uitgedrukt ten opzichte van de neutrale oplossing. De curve is, indien ze wordt opgesteld met cuvetten, reproduceerbaar over een langere periode. Bij de probe is dit niet het geval. Deze reproduceerbaarheid van de curve, bij gebruik van cuvetten, houdt de mogelijkheid in om een correctie toe te passen bij monsters met een afwijkende pH. Dit gebeurt concreet door het toepassen van de correctiefactoren uit onderstaande tabel. Hiervoor dient wel de pH van elk monster gekend te zijn.

Tabel 3.5 De invloed van de pH op de absorbantie op de phenate method bij cuvetten

pH gebied	pH gemiddeld	S _{pH}	% absorbantie	S _{absorbantie}
8,75-8,65	8,744	0,005	61%	2%
8,85-8,75	8,849	/	62%	/
8,95-8,85	8,885	0,018	63%	3%
9,05-8,95	9,025	0,013	66%	0%
9,25-9,15	9,242	/	71%	/
9,35-9,25	9,289	0,040	72%	2%
9,45-9,35	9,430	0,009	77%	1%
9,65-9,55	9,600	0,038	84%	2%
9,75-9,65	9,722	0,033	86%	4%
9,85-9,75	9,758	/	89%	/
9,95-9,85	9,904	0,033	93%	1%
10,05-9,95	9,987	0,040	97%	2%
10,15-10,05	10,095	0,038	99%	2%
10,25-10,15	10,191	0,037	100%	2%
10,35-10,25	10,281	0,026	101%	1%
10,45-10,35	10,396	0,032	102%	3%
10,55-10,45	10,501	0,003	103%	0%
10,65-10,55	10,613	0,010	101%	1%
10,75-10,65	10,664	/	101%	/
10,85-10,75	10,785	0,049	101%	1%
10,95-10,85	10,909	0,032	101%	1%
11,05-10,95	10,950	/	98%	/
11,15-11,05	11,052	/	97%	/
11,25-11,15	11,235	0,024	95%	2%
11,35-11,25	11,300	/	92%	/
11,55-11,45	11,500	0,053	89%	2%
11,65-11,55	11,575	/	88%	2%

Wanneer de correctiefactor van de cuvet op de probe wordt uitgevoerd kan een even nauwkeurig resultaat bekomen worden. De juistheid van deze resultaten is echter niet met zekerheid geweten omdat de kleurvorming van de pH afwijkende stalen niet altijd even goed tot ontwikkeling komt. Daarom is het aan te raden om het monsters meerdere malen aan te maken ter controle van de verkregen absorbantie. In onderstaande tabel zijn resultaten weer gegeven van een uitgevoerde correctiefactor op verschillende gespikete oplossingen met een gekende onafhankelijke standaard.

Tabel 3.6 Uitgevoerde correctiefactor van de pH op onafhankelijke en gespikete stalen

	Cuvet			Probe		
	spike 1	spike 2	spike 3	spike 1	spike 2	spike 3
Conc _{gemeten} (µg/L)	460	579	466	458	583	467
pH	9,238	9,71	9,272	9,238	9,71	9,272
Correctiefactor	70,91%	85,80%	71,64%	70,91%	85,80%	71,64%
Conc _{theoretisch} (µg/L)	642	652	649	642	652	649
Conc _{na correctie} (µg/L)	649	674	650	646	679	653
Recovery (%)	101%	104%	100%	101%	104%	101%

In dit experiment werden de stalen slechts 1 maal aangemaakt. De procentuele afwijking met de verwachte waarde valt binnen 5%. Tabel 3.6 laat zien dat het gebruik van de correctiefactor een goede manier is voor het terugvinden van de juiste concentratie. Deze correctiefactor werd bekomen door een interpolatie uit te voeren.

3.5.4.2 Invloed van het Mg-citraat complex

De methode voor de bepaling van ammoniak is niet zo gevoelig voor interferenties. Slechts enkele kationen en anionen kunnen voor interferentie zorgen. De interfererende ionen zijn vermeld in Tabel 3.7.

Tabel 3.7 Interfererende concentraties voor de bepaling van NH₄⁺ (0.300 mg/L) (Anthimidis et al., 2010, p. 122)

Ionen	Concentratie (mg/L)	Recovery ± RSD (%)
Na ⁺	20.000	102 ± 4
K ⁺	1500	101 ± 3
Mg ²⁺	800	90 ± 1
Ca ²⁺	800	92 ± 2
Fe ²⁺	15	88 ± 4
Mn ²⁺	5	101 ± 3
HCO ₃ ⁻	2000	100 ± 3

Zoals in Tabel 3.7 te zien is, zullen vooral Mg^{2+} , Ca^{2+} en Fe^{2+} voor problemen zorgen in verhoogde concentraties. Mn^{2+} kan bij lage concentraties al voor interferentie zorgen, maar is niet veelvoorkomend in kleiwater en vormt dus ook niet zo een probleem. In hoge concentraties zullen Ca^{2+} en Mg^{2+} voor troebelvorming, en dus interferentie, zorgen doordat deze bij een hoge pH met hydroxiden of carbonaten zullen reageren en neerslaan. Om deze troebelvorming te voorkomen wordt natriumcitraat toegevoegd die een complex zal vormen met deze kationen en in oplossing blijft.

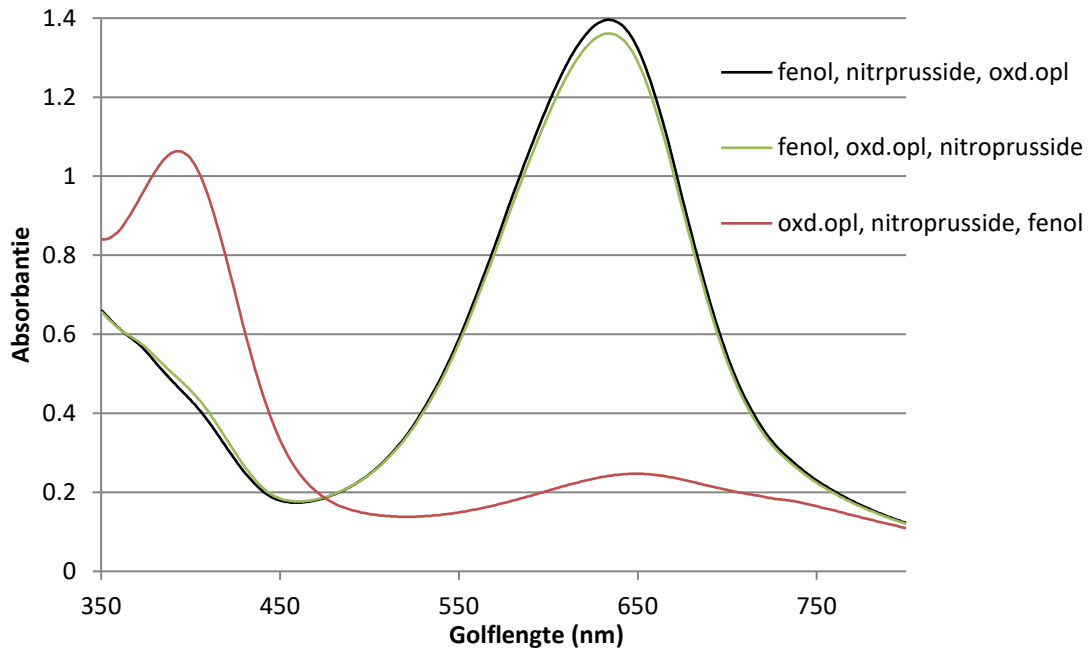
Natriumcitraat vormt een complex met deze ionen zodat ze in oplossing blijven, niet kunnen neerslaan bij hoge pH en dus niet voor interferentie kunnen zorgen. Zonder de citraat-oplossing zal er een verhoging in troebelheid waargenomen worden in stalen met een hoog magnesium en calcium concentratie. In hoge minerale wateren echter, zal de vorming van een Mg-citraat buffer voor problemen zorgen in pH aanpassingen en de indofenol reactie bij ammoniak bepalingen. Omdat er echter rekening gehouden kan worden met een verschil in pH, en deze gecorrigeerd kan worden m.b.v. paragraaf 3.5.4.1, heeft de buffervorming dus weinig invloed.

Om de interferentie van magnesium toch even na te gaan werd er een magnesiumhydroxide oplossing aangemaakt met een concentratie net boven 800 mg/L. Omdat de aangemaakte oplossing gemaakt werd van een niet oplosbaar product was er een grote troebelheid waargenomen. Door het toevoegen van de citraat oplossing verdween de troebelheid niet volledig. Wel kon de magnesiumhydroxideneerslag gemakkelijk uit de oplossing gehaald worden door de oplossing even te centrifugeren. Wanneer vervolgens een oplossing aangemaakt werd van magnesiumchloride, werd er geen last ondervonden van troebelvorming. Ook bij een magnesium concentratie boven 800 mg/L werd er geen afwijking gedetecteerd op de absorbantie van het gemeten staal.

3.5.5 Robuustheid

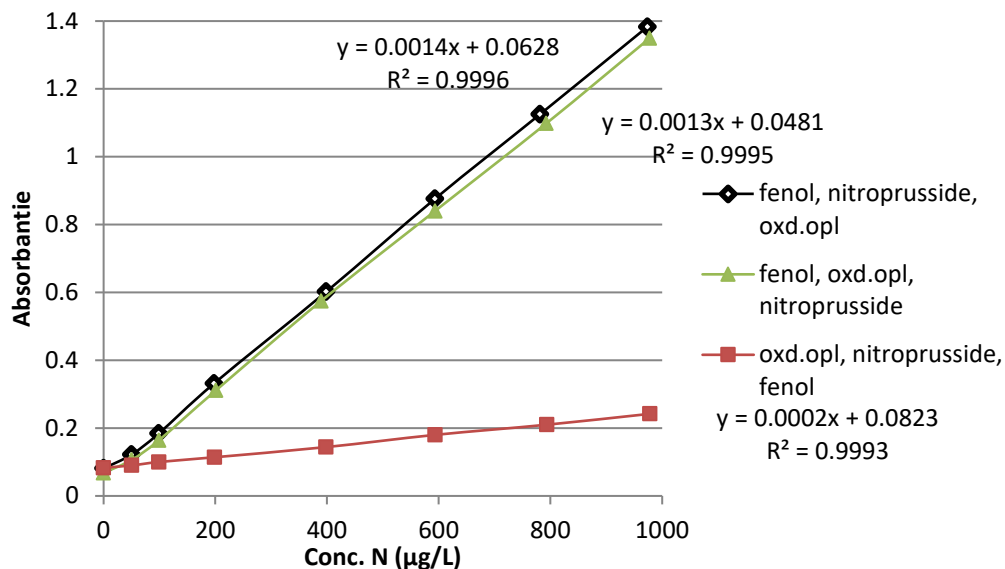
3.5.5.1 Verschillende volgorde reagentia

Voor een zo goed mogelijke kleurvorming van indofenol dienen de kleurreagentia in de juiste volgorde toegevoegd te worden. Eerst wordt fenol toegevoegd aan het monster, vervolgens de katalysator waarna de oxiderende oplossing. Wanneer de volgorde veranderd wordt zal er een daling in absorbantie plaatsvinden zoals te zien is in Figuur 3.4.



Figuur 3.4 Spectrum verschillende volgorde toevoeging kleurreagentia 1000 $\mu\text{g N/L}$

In de zwarte curve bij Figuur 3.4 heeft de oplossing een donker blauwe kleur. De groene curve vertoont ook een blauwe kleur, maar heeft een iets lagere absorptantie dan de bovenste curve. Deze verlaging komt door het later toevoegen van de katalysator waardoor de reactie minder snel is opgegaan. De rode curve vertoont een groengele kleur. De gele kleur van de onderste curve is afkomstig van de gereduceerde katalysator die later een groengele kleur geeft door de blauwe kleurvorming van indofenol. De tweede piek die te zien is bij 394 nm komt door een reactie die optreedt bij de katalysator. De mogelijke vorming van deze piek wordt verder uitgelegd in paragraaf 3.5.5.3.



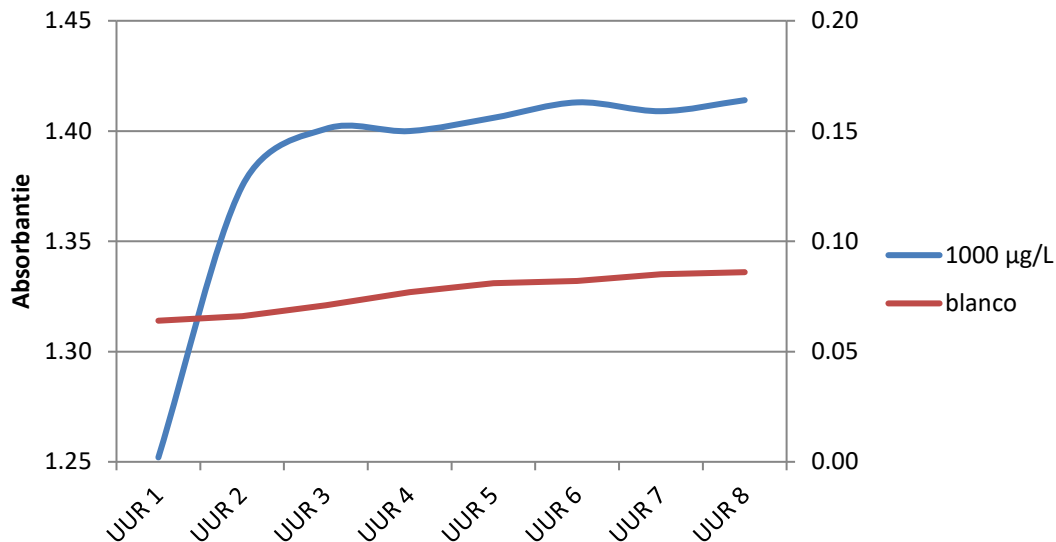
Figuur 3.5 Kalibratiecurve verschillende volgorde toevoeging kleurreagentia bij 640 nm

Door de daling in absorptantie zullen de absorptanties van de verschillende standaarden dichter bij elkaar liggen en zal een kleine afwijking een groter gevolg hebben. Uit Figuur 3.5 kan men afleiden dat het veranderen van toevoegvolgorde, en dus verlaging

van de absorptantie, een direct gevolg heeft op de helling van de kalibratiecurve. Door deze daling in hellingsgraad zal de ondergrens hoger uitkomen en zullen kleine verschillen in absorptantie sneller voor foute resultaten zorgen.

3.5.5.2 Invloed van de tijd

Na het toevoegen van de kleurreagentia aan het monster of de standaard is de kleur stabiel van 1 uur tot 24 uur na aanmaak. In deze periode van stabiliteit zal de absorptantie geleidelijk stijgen. Figuur 3.6 geeft de stijging van de absorptantie in functie van de tijd weer.

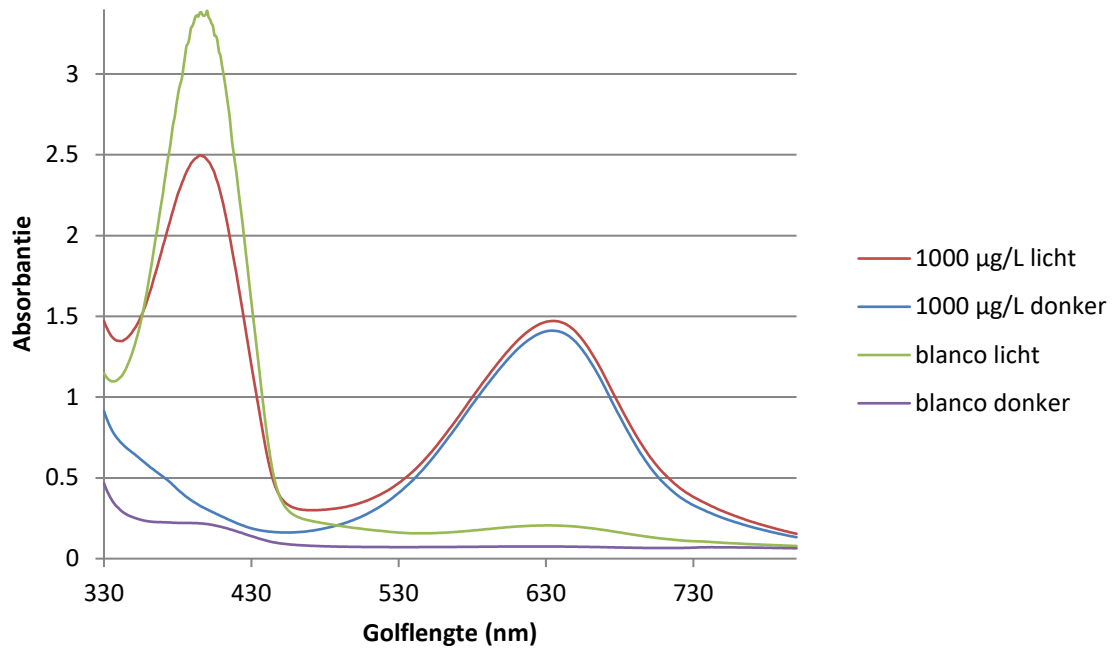


Figuur 3.6 Invloed van de tijd op de absorptantie bij 1000 µg N/L

Alhoewel volgens de standaard methode de oplossing al na 1 uur stabiel is, is er toch nog een grote stijging te zien in absorptantie. Deze stijging is logischerwijze veel groter bij de hoogste standaard dan bij de laagste. Aan de hand van Figuur 3.6 wordt vastgesteld dat, voor een zo representatief mogelijk resultaat, minstens 3 uur gewacht moet worden na aanmaak van de oplossingen vooraleer deze gemeten wordt.

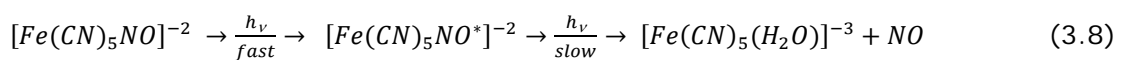
3.5.5.3 Invloed van het licht

De kleurvorming van de indofenol reactie zal niet verslechteren wanneer deze in aanwezigheid of afwezigheid van licht is. In aanwezigheid van licht zal de absorptantie iets hoger uitkomen dan wanneer de oplossing in afwezigheid van licht heeft gestaan of bij weinig licht. Toch zal de oplossing in aanwezigheid van licht een heel andere kleur hebben doordat er een nevenreactie/tweede reactie optreedt die groen uitslaat. De nevenreactie komt door de fotodecompositie van SNP en heeft een grote invloed op de piek van 394 nm zoals geïllustreerd wordt in Figuur 3.7. Het verschil in absorptantie tussen de blanco standaard en hoogste standaard bij 394nm komt er waarschijnlijk doordat SNP bij de blanco standaard wegens gebrek aan ammoniak nog volledig beschikbaar is. Hierdoor is er meer katalysator vrij in de oplossing die kan reduceren onder invloed van licht. De verklaring van deze verhoging is echter niet bewezen.



Figuur 3.7 De invloed van fotodegradatie op de kleur na 4 uur

Onder invloed van licht zal SNP veel verschillende reacties ondergaan, waarvan er vele nog niet gekend zijn. In direct licht zal SNP uiteindelijk een blauwe kleur krijgen afkomstig van het cyanidezuur. Door de cyanidezuurvorming is er een iets grotere piek op ± 640 nm waar te nemen bij de twee stalen die in het licht gestaan hebben. De producten die direct gevormd worden onder invloed van de fotodecompositie in licht van lage energie zijn NO en $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})]^{-3}$. In waterige oplossingen zal nitroferrocyanide gereduceerd worden door licht ter vorming van nitroferrocyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{-3}$. Deze drie ionen worden beschreven als de meest voorkomende producten van SNP door directe fotodecompositie. Ongeacht de onzekerheid van de fotochemische reacties wordt vergelijking (3.8) voorgesteld. De eerste reactie toont de licht geëxciteerde toestand van nitroferrocyanide. In de tweede reactie wordt het gereduceerde product gevormd van het geëxciteerde molecuul.



Bij de metingen in Figuur 3.7 is er ongeveer 4 uur gewacht vooraleer het spectrum gemeten werd. Deze tijdsspanne resulteert in een verlaging van 20% SNP. (Frank, Johnson & Rubin, 1976, p. 44-46)

3.6 Conclusie

De phenate methode is een goede methode voor de spectrofotometrische bepaling van ammonium in kleiwater en weinig onderhevig aan interferenties. Het werkgebied is gelegen van 50 tot 1000 $\mu\text{g N/L}$. De herhaalbaarheid van de methode ligt op 2,99 en 4,66 $\mu\text{g N/L}$ voor de cuvet en de probe respectievelijk met een intralaboratorium-reproduceerbaarheid op laag niveau van 15,64 $\mu\text{g N/L}$ voor de cuvet en 21,56 $\mu\text{g N/L}$ voor de probe. De methode heeft ook een goede juistheid, al kon dit niet getest worden met een referentie staal.

De phenate methode is een weinig robuuste methode met name door de tijdsspanne van stabiliteit en invloed van de zuurtegraad op het kleurreagens. Ook de gebruikte katalysator maakt de methode vrij gevoelig aan licht.

4 CHLORIDE BEPALING

4.1 Principe

Een kleurreagens wordt gevormd door kwik(II)thiocyanaat en ijzer(III)nitraat samen te voegen. In contact met chloride-ionen zal het kwik(II)thiocyanaat reageren tot kwik(I)chloride en thiocyanaat-ionen (4.1). De Fe^{3+} ionen zullen een reactie aangaan met de thiocyanaat-ionen ter vorming van roodoranje ijzer(III)thiocyanaat (4.2).



Bij deze methode is er niet veel last van interferenties wegens het zure milieu. De elementen die voor interferentie kunnen zorgen - bromide, jodide, cyanide, thiocyanaat, sulfide, thiosulfaat, bromaat, ferrocyanide en ferricyanide – zijn vaak in zo'n lage concentraties aanwezig dat ze niet voor storing zorgen. (Hagino, Iwasaki, Ozawa & Utsumi, 1956, p. 863)

4.2 Toepassingsgebied

De spectrofotometrische analysemethode voor chloride wordt gebruikt voor de bepaling van chloride in radioactief besmet afvalwater. Voor een correcte karakterisatie is de bepaling van chloride een vereiste. Door de radioactiviteit van de afvalwater monsters is een uitwendige probe wenselijk om contaminatie van apparatuur te minimaliseren. De methode dient gebruikt te worden wegens het zure milieu van de monsters. Ion chromatografie is hierdoor geen optie vanwege de hoge concentratie pieken aan zuren.

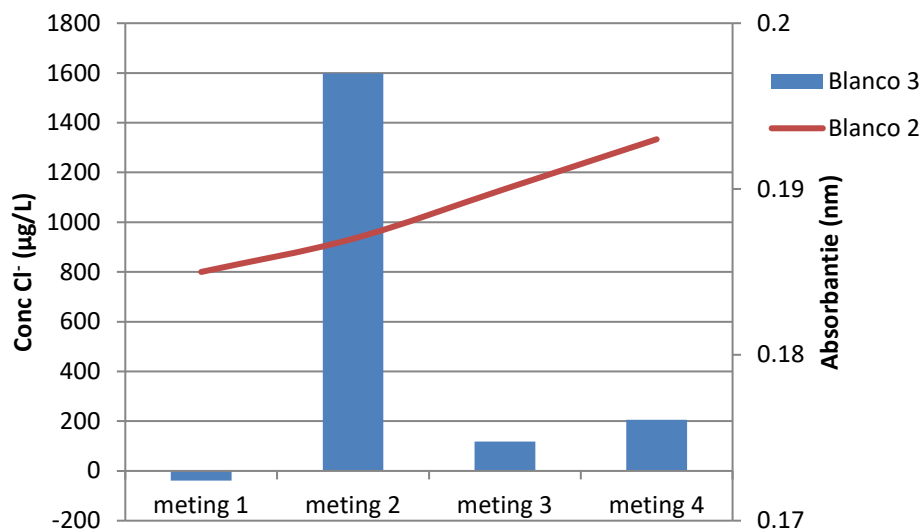
4.3 Aanmaak oplossingen

Veel van de oplossingen moeten zelf aangemaakt worden en zijn vaak niet op voorraad beschikbaar. In *Bijlage 1. Lijst met gevaren van producten voor bepaling van NH_4^+ , Cl^- & F^-* is een overzicht met de producten die gebruikt gaan worden voor deze methode en wat de eventuele gevaren zijn die het gebruik hiervan met zich meebrengt. In Tabel 4.1 wordt weergegeven hoe de oplossingen dienen aangemaakt te worden volgens Eaton, Clesceri, Rice & Greenberg (2005, p. 4-74) en hoe deze dienen bewaard te worden. De andere gevonden standaard methodes (paragraaf 4.4) spreken over de zelfde manier van aanmaak voor het kleurreagens. Al de oplossingen worden aangelengd met gedemineraliseerd water met uitzondering van de stock kwik thiocyanaat oplossing.

Tabel 4.1 Aanmaak van de kleurreagentia

Oplossingen	Producten	m (g) of V (ml)	V _{totaal} (ml)	Bewaring
Stock kwik thiocynaat oplossing	Kwik thiocynaat	4.17 g	/	n.v.t.
	Methanol	/	1000	
Stock ijzer nitraat oplossing	Ijzer nitraat nonahydraat	202 g	1000	Amber fles
	Salpeterzuur	23 ml		
Kleurreagens	Stock kwik thiocynaat oplossing	150 ml	1000	Amber fles
	Stock ijzer nitraat oplossing	150 ml		

Het is aangeraden om bij deze methode handschoenen te gebruiken. Niet enkel voor de eigen veiligheid, maar vooral om contaminatie van stalen te voorkomen. Omdat chloride zo veel voorkomend is, en de absorptie tussen twee punten dicht bij elkaar liggen, kan een kleine contaminatie al grote gevolgen hebben. De invloed van contaminatie wordt geïllustreerd in Figuur 4.1 waarbij meting 2 van blanco 3 gecontamineerd is geraakt door contact met de huid.



Figuur 4.1 Invloed van contaminatie op absorptie en concentratie

Alle 4 de metingen zijn afkomstig van dezelfde blanco-oplossing die meerdere keren gemeten is. De blanco-oplossing werd in een kleine hoeveelheid aangemaakt wat er voor zorgt dat contaminatie aan lucht of cuvet al voldoende is om de concentratie/absorptie te laten stijgen. De resultaten van de metingen van blanco 2 in Figuur 4.1 tonen aan dat contaminatie bij herhaaldelijk meten bijna onvermijdelijk is wanneer er met kleine hoeveelheden oplossing wordt gewerkt. Deze stijging in concentratie is ook te zien bij de drie overige metingen van blanco 3.

4.4 Optimalisatie

De bestaande standaard methodes voor de spectrofotometrische bepaling van chloride zijn voornamelijk geautomatiseerde methodes: EPA-Method-3252, standard methods 21st edition (2005) 4500-Cl⁻ E. Automated Ferricyanide Method p.4-74 & 4500-Cl⁻ G. Mercuric Thiocyanate Flow Injection Analysis p.4-75.

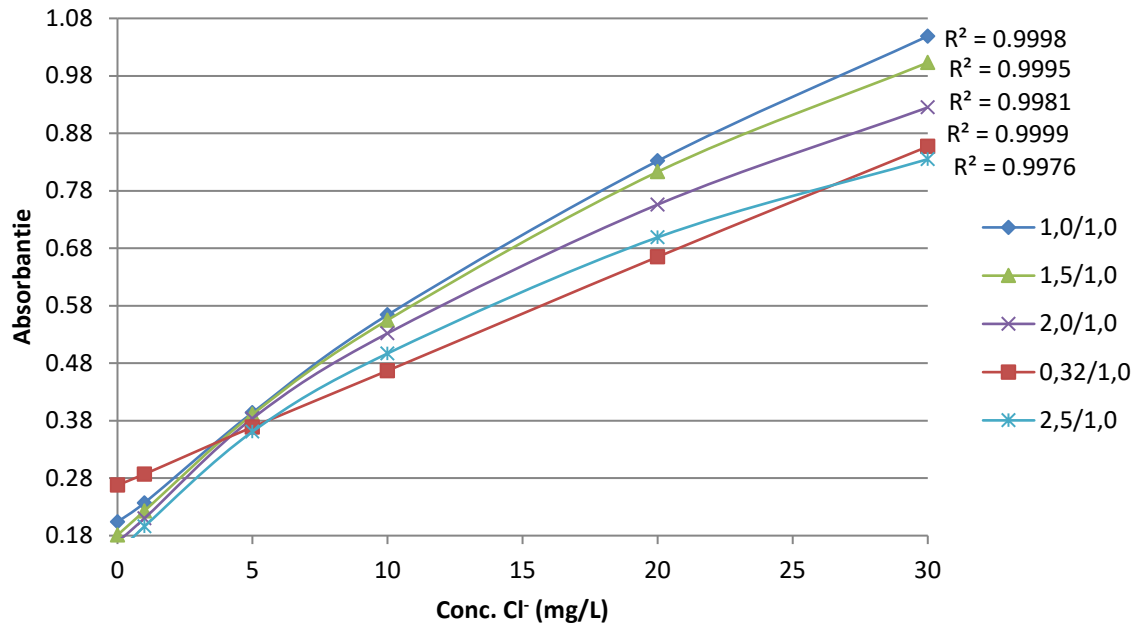
Bij elke methode wordt er gemeten op een golflengte van 480nm, maar telkens met verschillende verhoudingen monster/kleurreagens, hoeveelheid gebruikt salpeterzuur en gemeten gebied. Deze verschillen zijn weer gegeven in Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Verschillende methodes voor de bepaling van chloride

Standaard methode	V monster ($\frac{ml}{min}$)	V kleurreagens ($\frac{ml}{min}$)	$\frac{V_{HNO3} (ml)}{Lijzernittraat opl.}$	Meetgebied ($\frac{ml}{L}$)
EPA 3252	1,0	1,0	31,5	5,0 – 200,0
Automated Ferricyanide Method	0,32	1,0	21,0	1,0 – 200,0
Mercuric Thiocyanate Flow Injection Analysis	1,8	1,0	25,0	1,0 – 200,0

4.4.1 Verhouding monster/kleurreagens

Doordat er voor deze methode enkel geautomatiseerde methodes gevonden werd was het niet duidelijk hoe het chloridegehalte manueel bepaald moet worden. Daarom wordt er in eerst instantie gekeken naar de verschillende verhoudingen van het monster t.o.v. het kleurreagens om te bepalen waar er het beste mee wordt verder gewerkt. Uit eerdere experimenten bleek dat het detectielimiet rond 1,0 mg Cl⁻/L ligt en werd er voor Figuur 4.2 gekozen voor een iets groter gebied. Een eerste analyse werd gedaan van 0-30 mg Cl⁻/L bij verhoudingen van 0,32 ml monster per ml kleurreagens tot 2,5 ml monster per ml kleurreagens. Als volume salpeterzuur werd er gekozen voor 23,0 ml/L omdat deze uit de vorige metingen als beste uitkwam.



Figuur 4.2 Bepaling verhouding volume monster t.o.v. volume kleurreagens

De verkregen standaardcurves bij de verschillende verhoudingen lijkt enkel lineair te zijn bij de laagste verhouding. De andere curves zijn kwadratisch berekend en lijken een steeds slechtere R^2 te verkrijgen wanneer het volume monster stijgt t.o.v. het volume kleurreagens. Uit de gegevens van Figuur 4.2 kan men vaststellen dat de beste verhouding om mee verder te werken bij 23,0 ml HNO_3/L ijzeroplossing de 0,32 ml/1,0 ml verhouding is. De rico van deze curve lijkt echter minder steil te zijn wat er voor kan zorgen dat het detectielimiet iets hoger zal te komen liggen dan de al opgestelde ondergrens.

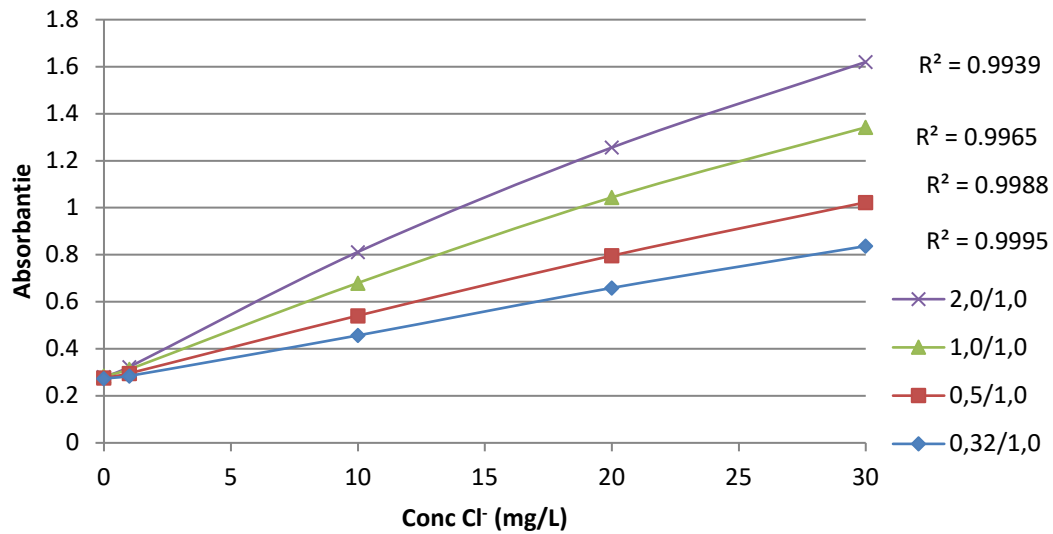
4.4.2 Aanmaak kleuroplossing

Omdat de 0,32 ml monster per ml kleurreagens verhouding als de beste verhouding uit de test kwam, maar de verhouding op zichzelf niet gemakkelijk is om mee te werken, wordt gekeken naar een alternatieve manier om de kleuroplossing aan te maken. In Tabel 4.3 worden de concentraties berekend die in de huidige methode aanwezig zijn en de alternatieve die dezelfde concentraties geven. Om het rekenwerk gemakkelijker te maken voor de aanmaak van de oplossingen en flexibiliteit voor het werken met kleine volumes aan monster te verhogen wordt er gekeken naar de aanmaak van het kleurreagens voor de $\frac{0,5 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}}$, $\frac{1,0 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}}$ en $\frac{2,0 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}}$ verhoudingen gekeken.

Tabel 4.3 Concentraties en verdunningen kleurreagens

Producten	Conc	V _{0,32/1,0} (ml)	V _{0,5/1,0} (ml)	V _{1,0/1,0} (ml)	V _{2,0/1,0} (ml)	V _{totaal} (ml)
Hg(SCN) ₂	0,47 mg/ml	7,500	8,500	11,400	17,000	50,000
Methanol	11,4%					
Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	23,0 mg/ml	7,500	8,500	11,400	17,000	
HNO ₃	0,038 M					

De oplossingen werden allemaal aangemaakt met dezelfde concentraties aan chloride, kwik en ijzer, maar met verschillende verhoudingen. Het resultaat van deze gegevens wordt weergegeven in Figuur 4.3.

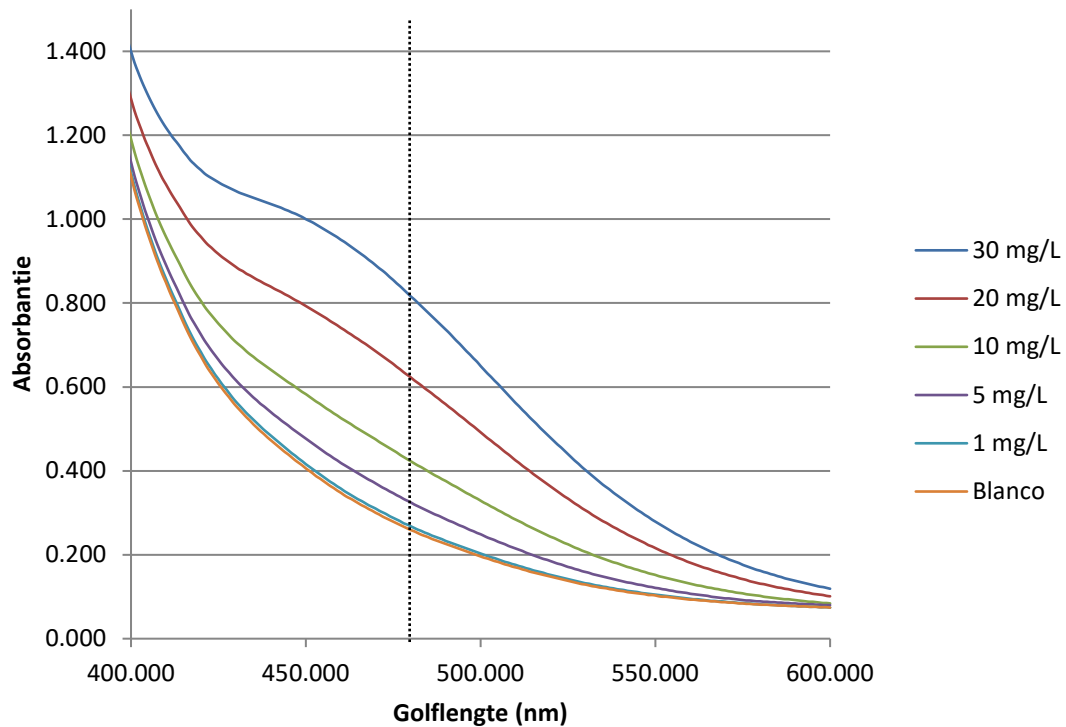


Figuur 4.3 Verschillende verhouding monster/kleuroplossing met zelfde concentraties kleuroplossing

Er werd verwacht dat de kalibratiecurves ongeveer gelijk waren aangezien de concentraties aan kwik en ijzer en de concentratie aan chloride respectievelijk kloppen. Echter wordt er een verhoging in absorbantie, en een verslechtering in lineairiteit, waargenomen. Het blijkt dus dat, ondanks de apart juiste concentraties, er toch een verschil zit in meetwaarde. Dit verschil is te verklaren doordat bij het toevoegen van het kleurreagens bij een andere verhouding het volume monster minder hard wordt verdund. Dit zorgt er op zijn buurt voor dat, desondanks de juiste concentratie aan kleuroplossing, de monsteroplossing in verhouding geconcentreerder uitkomt. Deze relatieve verhoogde concentratie aan monster zorgt voor een stijging in absorbantie die er op zijn buurt dan weer voor zorgt dat de lineairiteit omlaag gaat.

4.5 Spectrum

Figuur 4.4 werd opgemaakt door het spectrum te nemen van alle gebruikte standaardoplossingen. De oplossingen worden bij de fotometer gemeten op 480 nm. Het punt van 480 nm wordt aangeduid op de grafiek met een stippellijn.



Figuur 4.4 Spectrum standaardcurve ferricyanide methode

Door het lage verschil in absorbantie zijn de twee spectra van 1 mg/L en de blanco bijna niet te onderscheiden van elkaar op deze figuur. Toch is er een verschil in absorbantie van 0,009 op 480 nm. Bij 450 nm is er het begin van een piek te zien bij de hoogste standaard. Hier wordt echter niet gemeten omdat de meeste literatuur 480 nm aangeven als de te meten golflengte.

4.6 Validatie

4.6.1 Werkgebied

Het detectielimiet wordt bepaald met formule (2.1) en het kwantificeringslimiet wordt bepaald met formule (2.2). Als standaarddeviatie wordt de waarde van de herhaalbaarheid gebruikt. De concentratie van de herhaalbaarheid en de absolute waarde van de gemiddelde concentratie van de blanco stalen worden weergegeven in Tabel 4.4.

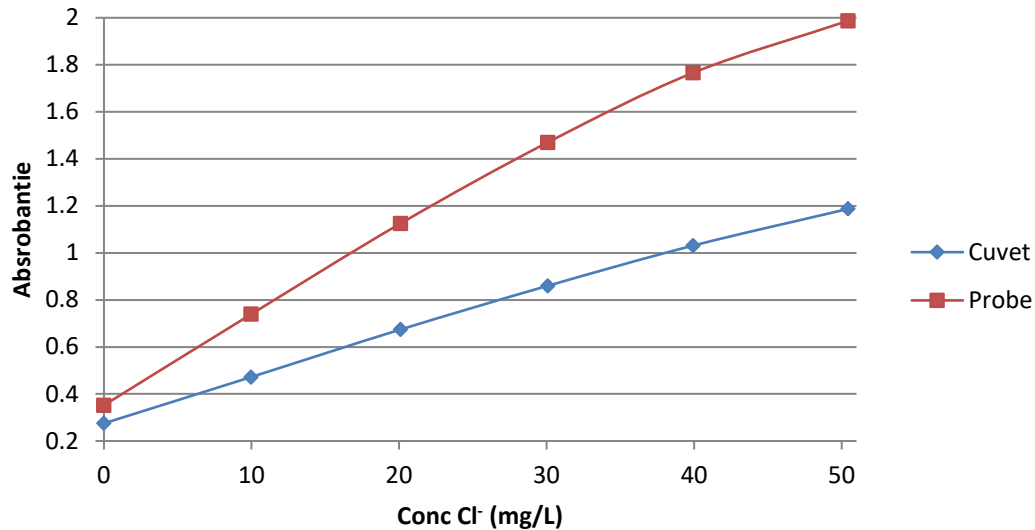
Tabel 4.4 De ondergrens van de ferricyanide methode (mg/L)

	S_r	$ \bar{x} _{\text{blanco}}$	LOD	LOQ
Cuvet	0,096	0,317	0,605	1,278
Probe	0,196	0,135	0,722	2,093

Net zoals bij de bepaling van ammonium is ook hier het gemiddelde van de blanco bij de probe lager als bij de cuvet. Dit komt ook weer doordat bij de probe een groot deel van de berekende concentraties negatief uitvielen en dus ene gausscurve bekomen wordt. De LOD is bij de cuvet een klein beetje lager dan bij de probe. Het verschil

tussen beide meettoestellen wordt veel groter bij de LOQ. Hierbij ligt de waarde van de probe bijna 0,800 mg/L hoger dan bij de cuvet. Dit komt door de veel slechtere herhaalbaarheid van de probe t.o.v. de cuvet. Met een LOQ van 2,093 mg/L bij de probe wordt er een ondergrens vast gelegd van 2,5 mg/L. Dit is voldoende ver boven de LOQ van de cuvet en probe.

Bij de optimalisatie werd gewerkt met een bovengrens van 30 mg/L. Deze bovengrens wordt nu met de optimale monster/kleurreagens verhouding opnieuw bepaald en weergegeven in Figuur 4.5.



Figuur 4.5 De bovengrens van de ferricyanide methode

De bovengrens bij de cuvet lijkt tot 40 mg/L te gaan, wat een pak hoger ligt dan de eerder opgestelde bovengrens. Maar wanneer echter de probe mee in rekening gebracht wordt voor de bepaling van de bovengrens zal deze terug op 30 mg/L uit komen. Net zoals bij de ammonium bepaling ligt de hoogste concentratie waarop de curve nog lineair is bij de cuvet hoger dan bij de probe.

4.6.2 Precisie

Er zijn voor de bepaling van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid op laag niveau in duplo blanco stalen gemeten die afzonderlijk staan van de blanco gebruikt in de standaardcurve. Voor zowel de cuvet als de probe zijn er elk twee blanco stalen gemeten op zes verschillende dagen.

De bepaalde precisie is enkel geldig voor lage concentraties dicht bij de LOD. Voor hogere concentraties moet een aparte proefopzet met herhaalde metingen uitgevoerd worden, bij voorkeur met reële stalen of gesimuleerde stalen. Deze waren echter nog niet beschikbaar en kunnen dus niet opgenomen worden in de thesis.

De herhaalbaarheid wordt bepaald met formule (2.3) en de intralaboratorium-reproduceerbaarheid wordt bepaald met formule (2.5) en (2.6). De MS_{within} waarde afkomstig van de ANOVA test zijn, voor de cuvet en probe, 0,009 en 0,038 respectievelijk. De $MS_{between}$ waarden zijn, voor de cuvet en de probe, 0,018 L en 0,281 respectievelijk. Omdat er in duplo gemeten wordt is n_j gelijk aan 2. Met deze gegevens van de ANOVA test kunnen de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid op laag niveau berekend worden. Het resultaat van elke berekening wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 4.5 Resultaten van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid

	Herhaalbaarheid	Intralaboratorium-reproduceerbaarheid	
	S _r (mg/L)	S _A ² (mg/L) ²	S _i (mg/L)
Cuvet	0,096	0,005	0,117
Probe	0,196	0,121	0,399

De herhaalbaarheid van de cuvet is ongeveer 2 keer kleiner dan deze van de probe terwijl dit bij de intralaboratorium-reproduceerbaarheid zelfs bijna 3 keer is. Dit resulteert in een veel hogere precisie voor de cuvet t.o.v. de probe. De probe heeft als hoogste waarde een intralaboratorium-reproduceerbaarheid van 0,399 mg/L. Deze waarde ligt ver onder de ondergrens.

4.6.3 Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werden er 2 verschillende onafhankelijke standaarden met 3 verschillende concentraties gemeten. De onafhankelijke standaarden worden gewoon en gespiked gemeten. De gespikete monsters bevatten ongeveer 10 mg Cl⁻/L afkomstig van een standaard chloride oplossing. De reden voor het spiken van de oplossing is voor het terugvinden van de concentratie van de toegevoegde standaard oplossing. Dit wordt nagegaan in Tabel 4.6 door het verschil in concentratie te nemen tussen de gespikete en niet-gespikete oplossing. Dit wordt zowel met de cuvet als met de probe nagegaan.

Tabel 4.6 Bepalen van de juistheid met een gespikete monster oplossing

Sample ID	Absorbantie	Conc. Cl ⁻ (mg/L)	Conc. standaard theorie (mg/L)	Conc. standaard praktijk (mg/L)	Recovery (%)
Cuvet	Onafhankelijke standaard 1	0,545	14,809	10,032	100%
	Spike 1	0,741	24,873		
	Onafhankelijke standaard 2	0,583	16,776	10,070	97%
	Spike 2	0,773	26,529		
	Onafhankelijke standaard 3	0,565	15,833	10,056	96%
	Spike 3	0,753	25,507		
Probe	Onafhankelijke standaard 1	0,545	14,818	10,032	100%
	Spike 1	0,741	24,883		
	Onafhankelijke standaard 2	0,583	16,702	10,070	100%
	Spike 2	0,773	26,762		
	Onafhankelijke standaard 3	0,565	15,623	10,056	100%
	Spike 3	0,545	25,662		

Er is een goede terugvinding van de toegevoegde standaard oplossing. Dit betekent dat de gebruikte methode een goede methode is. Het grote nadeel is echter dat er geen echt monster gebruikt kon worden voor de bepaling van chloride doordat er geen referentie waarde beschikbaar is. Er is met deze methode wel een ringtest staal gemeten, maar door gebrek aan referentie kan de juistheid hiervan niet met zekerheid bepaald worden. Voor de probe werd er bij de onafhankelijke standaarden telkens een recovery gevonden van 100%. De recovery van de toegevoegde standaardoplossing is iets slechter bij de cuvet met een maximum afwijking van 4%. Ook de cuvet toont dus een zeer goede recovery voor de bepaling van chloride. De concentraties van de oplossingen werden berekend met formule (4.3) voor de cuvet en formule (4.4) voor de probe.

$$\text{Absorbantie} = 0,0149 \frac{L}{mg \text{ Cl}^-} * \text{Conc. Cl}^- + 0,2579 \quad (R^2 = 0,9993) \quad (4.3)$$

$$\text{Absorbantie} = 0,0357 \frac{L}{mg \text{ Cl}^-} * \text{Conc. Cl}^- + 0,3337 \quad (R^2 = 0,9993) \quad (4.4)$$

4.6.4 Interferenties

Bij de chloridebepaling treden er pas problemen op met interferenties wanneer deze in hoge concentraties aanwezig zijn. Dit is echter meestal niet het geval waardoor de kans op interfererende ionen zeer klein is. Tabel 4.7 geeft een uitgebreid overzicht weer van veel frequente ionen en de concentratie waarbij ze al dan niet voor interferentie zorgen.

Tabel 4.7 Effect van ionen op de absorbantie bij 15°C (Hagino, Iwasaki, Ozawa & Utsumi, 1956, p. 863-864)

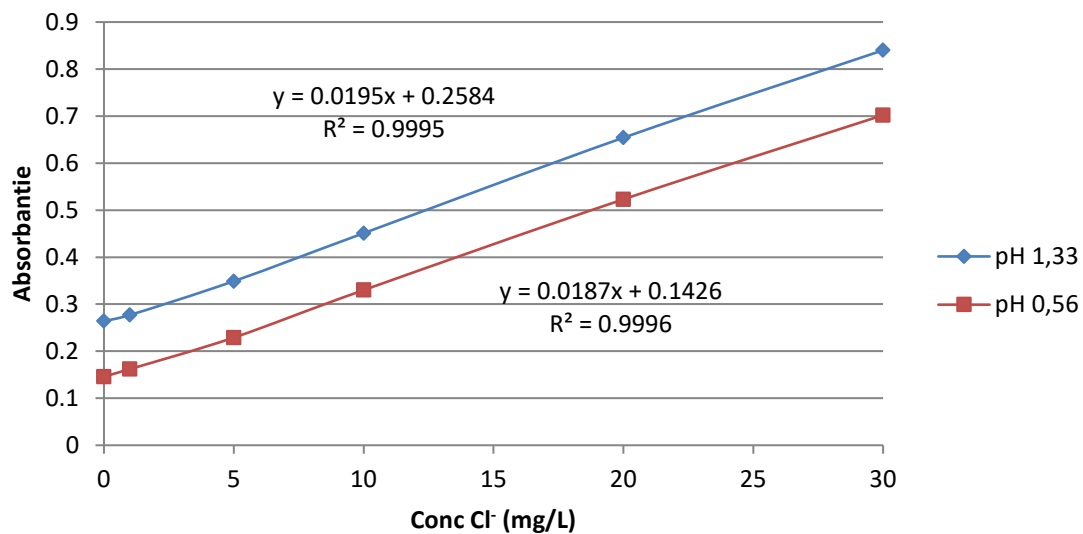
Ionen	Concentratie (mg/L)	Absorbance 30 mg Cl ⁻ /L	Recovery (%)
/	0	0,814	/
NaNO ₃	85.000 (1 M)	0,907	111%
SO ₄ ⁻	5.000	0,738	91%
PO ₄ ³⁻	100	0,772	95%
F ⁻	100	0,793	97%
	10	0,807	99%
Fe ³⁺	100	0,821	101%
	100	1,523	187%
BrO ₃ ⁻	10	0,903	111%
IO ₃ ⁻	100	0,903	111%
[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	10	0,824	101%
[Fe(CN) ₆] ³⁻	10	0,830	102%

[Fe(CN)₆]⁴⁻ en [Fe(CN)₆]³⁻ zorgen al voor interferentie bij zeer lage concentraties. Dit komt doordat Fe(SCN)²⁺ zorgt voor de kleur bij de chloridebepaling. Complexe vormen

van $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ zullen dus voor een versterking van deze kleurvorming zorgen. Voor de rest zorgen enkel F^- en BrO_3^- snel voor interferentie. Deze anionen komen echter niet veel voor in afvalwater en zullen daarom niet zo snel een probleem zorgen. De andere ionen in Tabel 4.7 zullen vaker voorkomen, maar moeten in zodanig hoge concentraties zijn om voor interferentie te zorgen dat deze bijna verwaarloosbaar zijn.

4.6.4.1 Invloed van de pH

De pH zorgt voor het intenser of doffer worden van de kleuroplossing. Hoe meer zuur aan de oplossing wordt toegevoegd, hoe minder intens de kleur wordt. Om na te gaan welke effecten dit heeft op de standaardcurve en omdat de monsteroplossingen een vrij lage pH hebben wordt er een matrix matching uitgevoerd op de standaardcurve. Bij een matrix matching wordt de standaardcurve aangepast aan het monster.



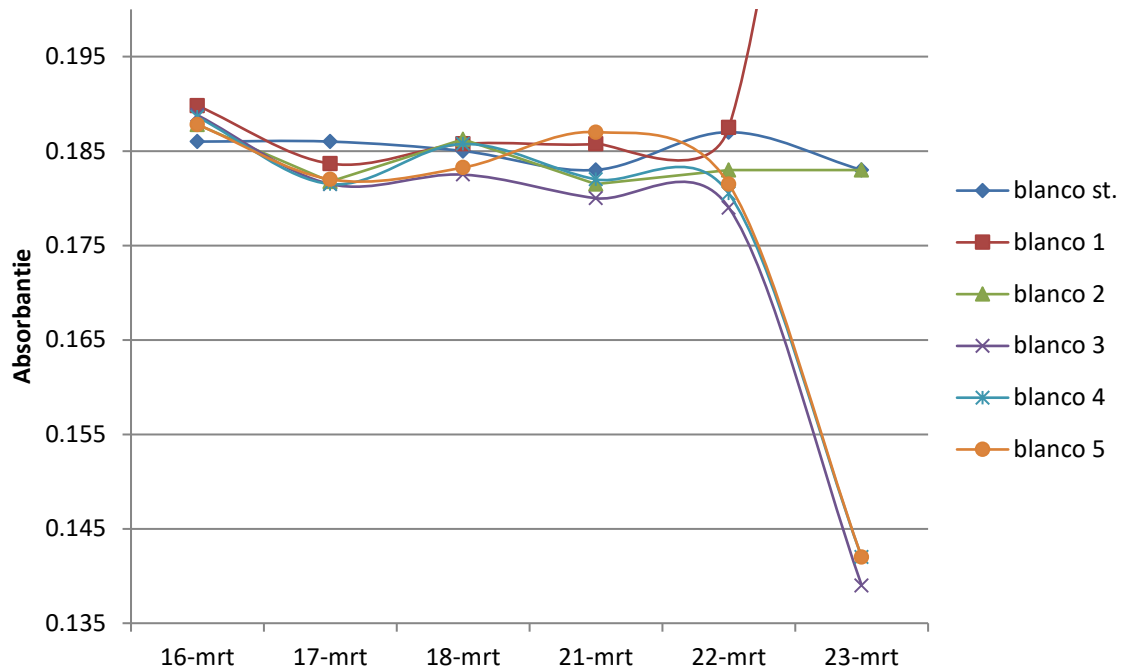
Figuur 4.6 Invloed van de pH op de standaardcurve

De monsteroplossingen bevatten ongeveer een molaire concentratie van 1 mol/L HNO_3 . De onderste curve in Figuur 4.6 werd aangemaakt met dezelfde hoeveelheid HNO_3 als de monsteroplossingen. Het is duidelijk te zien dat de pH geen grote invloed heeft op de standaardcurve. De helling van de curve blijft bij een verandering in pH ongeveer gelijk terwijl het intercept omlaag gaat bij een lagere pH en omhoog gaat bij een hogere pH. Indien de pH van de monsteroplossing gekend is kan de standaardcurve hier dus zonder enig probleem naar worden aangepast. Hierdoor is er, in tegenstelling tot bij de ammonium bepaling, geen correctie nodig na het meten van de oplossingen.

4.6.5 Robuustheid

4.6.5.1 Invloed van tijd en licht

Omdat het niet duidelijk was wat de invloed van de tijd was op de absorbantie werd deze gecontroleerd. Wegens de grote kans op contaminatie werden de oplossingen aangemaakt in hoeveelheden van 50ml. De oplossingen werden als blanco en in veelvoud aangemaakt om de invloed goed te kunnen nagaan (Figuur 4.7). Ter vergelijking werd ook de blanco meegerekend in de grafiek die gebruikt werd voor de kalibratiecurve zelf op te stellen.



Figuur 4.7 Invloed van tijd en licht op de absorbantie

Na dag 1 zijn de absorbanties van alle stalen gedaald. Deze blijven in de loop der dagen stabiel met hier en daar een beetje fluctuatie. Deze waargenomen fluctuatie op de absorbantie valt binnen de verwachte fluctuatie Omdat de kleuroplossing gevoelig is voor licht en in een amber fles bewaard dient te worden werden alle blanco stalen in de kast bewaard tot 21 maart. Van 21 op 22 maart werden blanco 3,4 & 5 uit de kast gelaten en in de trekkast gezet voor 1 dag bij zacht licht. Blanco 3,4 & 5 geven op Figuur 4.7 een lichte daling weer in absorbantie nadat ze niet in het donker bewaard werden. Van 22 op 23 maart werden dezelfde drie blanco stalen aan het raam gezet. Wanneer deze na ongeveer 24 uur gemeten werden was een duidelijke daling waarneembaar in absorbantie. De blanco stalen 'blanco 2', 'blanco st.' en 'blanco 1' werden steeds in het donker bewaard en behielden dezelfde absorbantie. Bij blanco 1 is echter een licht stijging waarneembaar op 22 maart, deze stijging wordt de volgende dag alleen maar groter. De stijging bij blanco 1 komt vermoedelijk door een contaminatie die tijdens de meting gebeurd is.

4.7 Conclusie

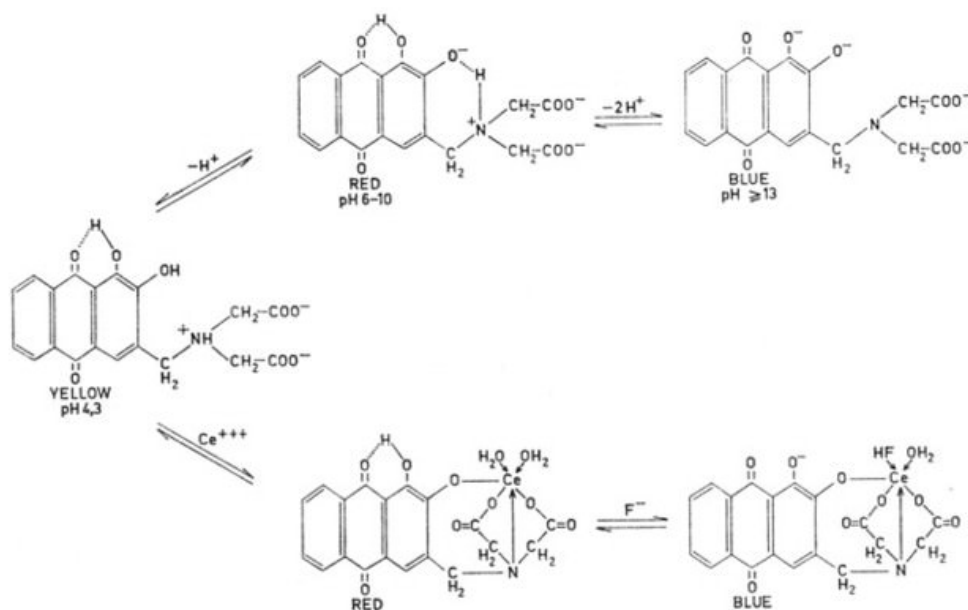
De ferricyanide methode is een goede methode voor de spectrofotometrische bepaling van chloride in afvalwater en weinig onderhevig aan interferenties. Het werkgebied is gelegen van 2,5 mg/L tot 30 mg/L. De herhaalbaarheid van de methode ligt op 0,096 en 0,196 mg/L voor de cuvet en de probe respectievelijk met een intralaboratorium-reproduceerbaarheid op laag niveau van 0,117 mg/L voor de cuvet en 0,399 mg/L voor de probe. De methode heeft ook een goede juistheid, al kon dit niet getest worden met een referentie staal.

De ferricyanide methode is een zeer robuuste methode die buiten een verandering in intercept geen invloed ondervindt van een verandering in pH. Als de oplossingen in het donker bijgehouden worden kunnen deze enkele dagen stabiel blijven. Doordat chloride een vrij courant ion is, is de methode zeer gevoelig aan contaminatie.

5 FLUORIDE BEPALING

5.1 Principe

De spectrofotometrische bepaling van fluoride berust op de complexvorming van alizarin blue, Lanthanium of cerium en fluoride. In eerste instantie zal er een reactie plaatsvinden tussen alizarin blue waarna het verkregen lanthanium-alizarin complex zal reageren met fluoride tot het fluoride-lanthanium-alizarin complex (La-ALC-F). De reactievorming is pH afhankelijk en dus reversibel (Figuur 5.1).



Figuur 5.1 De reactie van het alizarin complex met cerium en fluoride (Backer & Cox, 1967, p. 295)

In Figuur 5.1 gebeurt de reactie van de vorming voor het complex met cerium. De laatste jaren wordt lanthanium echter verkozen boven cerium. Lanthanium blijkt gemakkelijker te zijn voor de aanmaak van de reagentia, stabiel en gevoeliger dan cerium. La-ALC-F is het beste bestand tegen interferenties op een pH 4-4,5 (Smith ed., 1970, p. 22). Deze pH wordt verkregen door het toevoegen van een acetaat buffer oplossing aan het complex. Om de meting nog gevoeliger te maken, de kleurvorming van de reactie stabiel te maken en sneller tot stand te brengen wordt een hoeveelheid aceton toegevoegd aan de oplossing. Aceton heeft op dit moment echter geen grote invloed omdat La-ALC nog een wateratoom bevat op lanthanium waardoor deze onoplosbaar zal zijn in organische solventen. Om La-ALC oplosbaar te maken in organische solventen wordt er tertiaire butanol toegevoegd die La-ALC extraheert uit het water. Dit zorgt ervoor dat de methode gevoeliger zal worden. Hierdoor zal het evenwicht van La-ALC-F tot stand komen in 20-30 minuten i.p.v. 2 uur.

5.2 Toepassingsgebied

De spectrofotometrische analysemethode voor fluoride wordt gebruikt voor de bepaling van fluoride in radioactief besmet afvalwater. Voor een correcte karakterisatie is de bepaling van fluoride een vereiste. Door de radioactiviteit van de afvalwater monsters is een uitwendige probe wenselijk om contaminatie van apparatuur te minimaliseren. De methode dient gebruikt te worden wegens het zure milieu van de monsters. Ion chromatografie is hierdoor geen optie vanwege de hoge concentratie pieken aan zuren.

5.3 Aanmaak oplossingen

Veel van de oplossingen moeten zelf aangemaakt worden en zijn vaak niet op voorraad beschikbaar. In *Bijlage 1. Lijst met gevaren van producten voor bepaling van NH_4^+ , Cl^- & F^-* is een overzicht met de producten die gebruikt gaan worden voor deze methode en wat de eventuele gevaren zijn die het gebruik hiervan met zich meebrengt. In Tabel 5.1 wordt weergegeven hoe de oplossingen dienen aangemaakt te worden volgens Eaton, Clesceri, Rice & Greenberg (2005, p. 4-87) en hoe deze dienen bewaard te worden. Het aanmaken van de reagentia gebeurt met gedemineraliseerd water.

Tabel 5.1 Aanmaak van de kleurreagentia

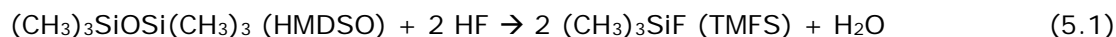
Oplossingen	Producten	m (g) of V (ml)	V _{Totaal} (ml)	Bewaring	Functie
Acetaat buffer oplossing	Watervrij natrium acetaat	60 g	1000	n.v.t.	Buffer pH4.4
	IJsazijnzuur	100 ml			
Alizarin fluorine blue stock oplossing	Alizarin fluorine	0,960 g	250	Amber fles & koelkast	Vorming La-ALC-F
	Conc. ammonium hydroxide	2 ml			
	IJsazijnzuur	2 ml			
Lanthaan nitraat stock oplossing		1,08 g	250	Koelkast	Vorming La-ALC-F
Kleurreagens	Acetaat buffer oplossing	300 ml	1000	2-4 dagen	Buffer pH4.4
	Aceton	150 ml			Katalysator
	Tertiaire butanol	50 ml			Watervrij maken oplossing
	Alizarin fluorine blue stock oplossing	36 ml			Vorming La-ALC-F
	Lanthaan nitraat stock oplossing	40 ml			

5.3.1 Microdiffusie

Omdat de complexone methode (Eaton, Clesceri, Rice & Greenberg, 2005, p. 4-87) veel last heeft van interferenties dient deze gedestilleerd te worden volgens de primaire destillatie stap (Eaton et al., 2005, p. 4-87). Aangezien er bij deze destillatie wordt gewerkt met een sterk zuur, hoge temperatuur en radioactief afvalwater wordt er voor gekozen om af te wijken naar een andere destillatiemethode. Hierom wordt gekozen voor microdiffusie waarbij fluoride wordt gedestilleerd uit het afvalwater op quasi kamertemperatuur.

5.3.1.1 De selectie van reagentia voor de microdiffusie

Microdiffusie maakt gebruik van het vervluchtigen en absorberen van een ion bij lage temperatuur. Voor de microdiffusie van fluoride wordt gebruik gemaakt van hexamethyldisiloxane (HMDSO) in zuur midden (zuur monster) om fluoride te kunnen vervluchtigen en natriumhydroxide (vangoplossing) om fluoride opnieuw te kunnen absorberen. Het grote voordeel van HMDS is dat deze het mogelijk maakt om fluoride te kunnen verwijderen uit het monster bij kamertemperatuur en dat dit kan gebeuren in 1-6 uur, terwijl de meeste methodes 20-24 uur duren. HMDS zal reageren met fluoride ter vorming van trimethylfluorosilicane (TMFS) (5.1). TMFS heeft een kookpunt van 16°C wat het ideaal maakt voor de microdiffusie. Vervolgens zal TMFS terug in oplossing gaan door de reactie met NaOH (5.2) dat zich in een andere beker bevindt.



Na de hydrolyse van TMFS zullen twee silanol moleculen met elkaar reageren ter vorming van HMDSO en water. De HMDSO zal terugkeren naar de zure oplossing en de cyclus opnieuw afleggen. Omdat er echter geen HMDSO aanwezig was werden de experimenten uitgevoerd met hexamethyldisilazane (HMDS).

Bij de andere methodes die aan microdiffusie doen wordt er vaak geen HMDSO gebruikt wat er voor zorgt dat de reactie op 60°C moet gebeuren en een verhoogde kans geeft op contaminatie van sulfaat en fosfaat in de vangoplossing. Door ethanol te gebruiken in plaats van water en de oplossing een roterende beweging te geven zal de benodigde tijd om een goede recovery te verkrijgen verminderen (Taves, 1968, p. 972-973). Veel van de oplossingen moeten zelf aangemaakt worden en zijn vaak niet op voorraad beschikbaar. In *Bijlage 1. Lijst met gevaren van producten voor bepaling van NH₄⁺, Cl⁻ & F⁻* is een overzicht met de producten die gebruikt gaan worden voor deze methode en wat de eventuele gevaren zijn die het gebruik hiervan met zich meebrengt. De aanmaak van de reagentia wordt weergegeven in Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Aanmaak reagentia voor de microdiffusie

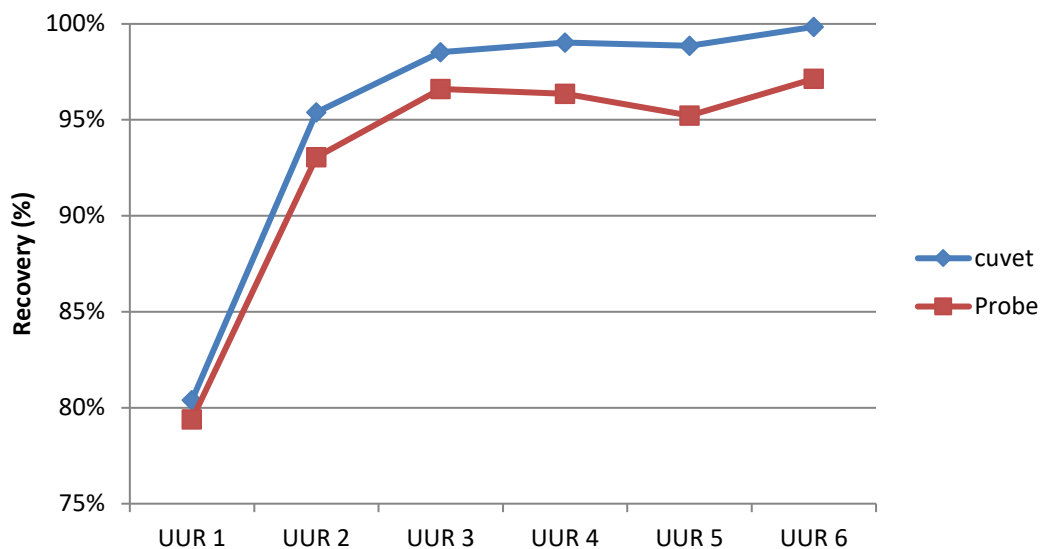
Oplossingen	Producten	m (g) of V (ml)	V _{Totaal} (ml)	$\frac{V_{nodig}(ml)}{3 \text{ ml sample}}$
Ethanol 20%	Ethanol 95%	21,05 ml	100	/
vangoplossing	0,1 N Natriumhydroxide	0,2000 g	/	1
	Ethanol 20%	/	50	
Silicone oplossing	HMDS	25 ml		
	HCl (37%)	200 ml	200	0,5
3,4 M Waterstofperchlooraat		14,912 ml	50	3

De silicone oplossing wordt aangemaakt door 3x 200 ml geconcentreerde HCl (37%) te wassen met 25 ml HMDS. Wanneer HMDS toegevoegd is aan HCl wordt de oplossing voor 5 minuten geschud waarna men deze voor 5 minuten zal laten staan. De onderste laag wordt bijgehouden en gescheiden van de overige HMDS laag en neerslag.

Er kan een microdiffusie uitgevoerd worden zoals in Tabel 5.2 beschreven staat. Er is ook een variant waarbij HClO_4 verzadigd wordt met HMDS. Deze 2 methode zijn echter niet zeer wenselijk omdat perchloorzuur een vrij sterke oxidant is. Het werken met perchloorzuur wordt dus liever vermeden voor veiligheidsredenen zoals brandgevaar. Aangezien bij gebruik van de variant zonder perchloorzuur een goede en snelle microdiffusie wordt bekomen wordt deze methode geselecteerd voor verdere testen.

5.3.1.2 Optimalisatie van de tijd voor de microdiffusie

Om de exacte tijd te bepalen, die nodig is voor de microdiffusie van de hoogst mogelijke concentratie die met de standaardcurve bepaald kan worden, wordt Figuur 5.2 opgesteld. De tijd nodig om de microdiffusie uit te voeren zal minder lang zijn wanneer er wordt gewerkt met een lagere concentratie. Er zal om het uur een microdiffusie van een standaardoplossing uitgevoerd worden zodat er in totaal zes resultaten zijn, met telkens één uur ertussen.

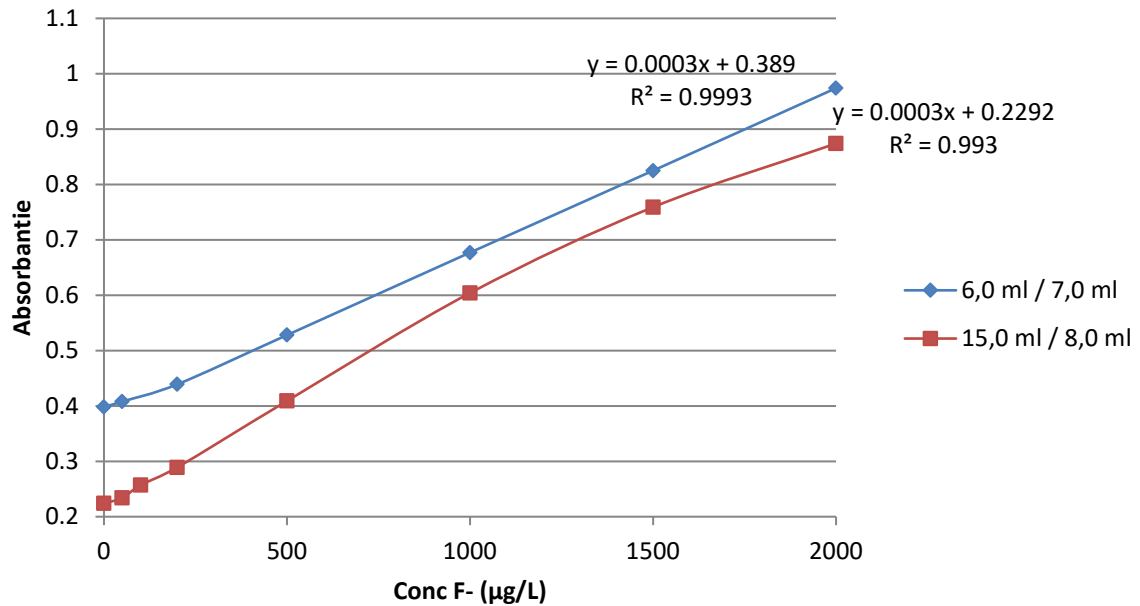


Figuur 5.2 Invloed van de tijd en de stabiliteit bij de microdiffusie van $2000 \mu\text{g F}^-/\text{L}$

De resultaten van Figuur 5.2 zijn verkregen door 0,5 ml geconcentreerde HCl dat gesatureerd is met HMDS toe te voegen aan 3 ml van een $2000 \mu\text{g F}^-/\text{L}$ en 1 ml van een 0.1M NaOH oplossing, opgelost in 20% ethanol, wordt gebruikt om het fluoride terug op te vangen. Uit de gegevens van de grafiek kan afgeleid worden dat 2 uur net niet lang genoeg is voor het laten destilleren van de fluoride oplossing, maar vanaf 3 uur meer dan 95% van de fluoride over gedestilleerd is. Er zal dus, voor zowel een oplossing met een hoge als een lage concentratie, een microdiffusie tijd gehanteerd worden van minstens 3 uur.

5.3.2 Verhouding monster / kleurreagens

Net zoals bij de chloride bepaling (zie paragraaf 4.4) is ook de gevonden methode voor fluoride een geautomatiseerde methode. Voor fluoride werden er twee verschillende verhoudingen getest. Zo werd er een monster op kleurreagens verhouding getest van $\frac{6,0 \text{ ml}}{7,0 \text{ ml}}$ en $\frac{15,0 \text{ ml}}{8,0 \text{ ml}}$ respectievelijk.

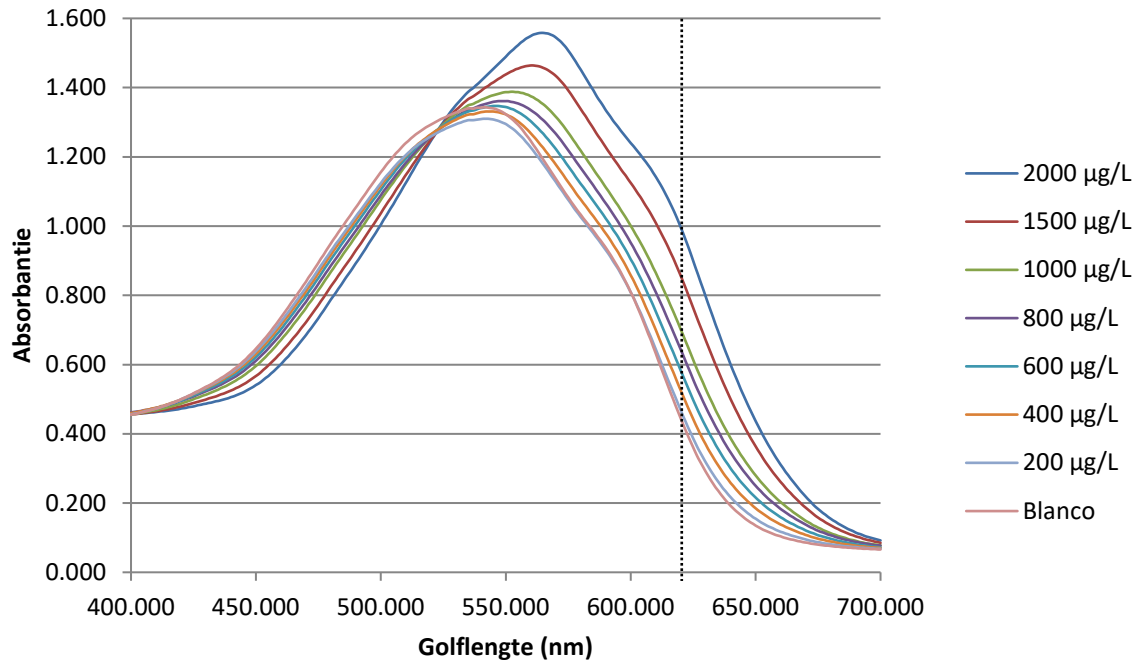


Figuur 5.3 Verschillende verhoudingen voor de bepaling van fluoride

Beide curven geven een goede determinatiecoëfficiënt die dicht bij 1 ligt en nog lineair is tot ver boven de ondergrens. De onderste, rode, curve heeft een iets steiler verloop dan de bovenste, blauwe, curve, maar heeft een lineair gebied dat twee keer lager ligt. De verhouding die verkozen wordt in Figuur 5.3 om mee verder te werken is de 6,0 ml monster/7,0 ml kleurreegens verhouding. Het verschil in rico bij de onderste curve is niet dusdanig groot dat de ondergrens hier een groot voordeel uit haalt, maar de bovengrens tussen beide verhouding kent echter wel een groot verschil.

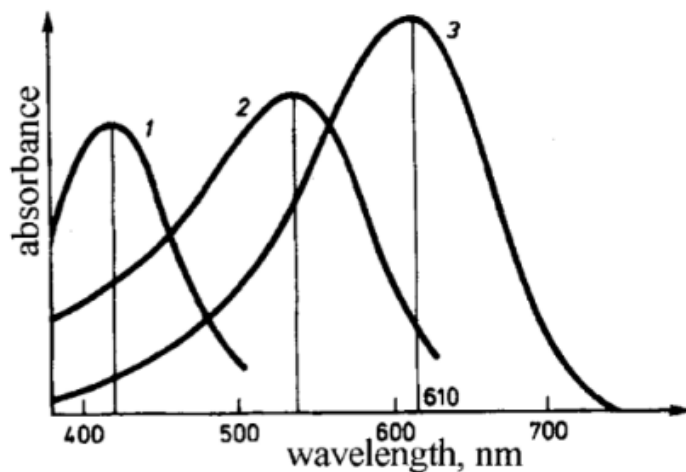
5.4 Spectrum

Er werd een spectrum opgesteld van bijna alle standaardoplossingen die gebruikt worden voor de standaardcurve. In Figuur 5.4 worden de standaarden van 50 µg/L en 100 µg/L weggelaten omdat deze op de grafiek bijna niet afzonderlijk zichtbaar zijn en de grafiek slechts onduidelijker maken. De oplossingen worden met deze methode gemeten op een golflengte van 620 nm, deze wordt op Figuur 5.4 aangeduid met een stippellijn.



Figuur 5.4 Spectrum standaardcurve complexone methode

Er is rond 550 nm een verschuivende piek te zien, maar hier wordt echter niet gemeten. Rechts van deze piek is er een kleine bult waarneembaar in de curve van het spectrum. Een beetje rechts van deze bult worden de oplossingen gemeten. De bult waarnaast gemeten wordt representeert de piek van het La-ALC-F complex. De grote piek die duidelijk zichtbaar is op de grafiek geeft de absorptie weer van La-ALC. Beide pieken overlappen elkaar (zie Figuur 5.5) waardoor er naast de piek van het La-ALC-F complex gemeten moet worden om invloed van het La-ALC complex zo veel mogelijk te vermijden. Dit verklaart tevens het verloop van de curve. Naarmate de concentratie aan fluoride groter wordt zal de piek van het La-ALC complex kleiner worden, terwijl de piek van het La-ALC-F complex groter wordt. Het totale resultaat geeft een verschuiving van de piek weer van links naar rechts op Figuur 1.1.



Figuur 5.5 Absorptie spectrum van alizarin complex (ALC) (1), La-ALC complex (2) en La-ALC-F complex (3) op pH 4,5 (Balcerzak & Marczenko, 2000, p. 191)

5.5 Validatie

5.5.1 Werkgebied

Nadat er enkele testen gedaan waren met de complexone methode kwamen we tot de conclusie dat de determinatiecoëfficiënt van de standaardcurve met de blanco minder goed was dan zonder de blanco. Dit komt doordat de blanco telkens te hoog lag op de standaardcurve waardoor er geen mooi lineair verband verkregen werd. Hierom werd er voor gekozen om als laagste standaard 50 µg/L te nemen i.p.v. de blanco. De reden voor deze systematisch te hoge blanco is niet gekend. Echter, indien de ondergrens van de methode voldoende boven deze blancowaarde ligt, is er weinig reden om aan te nemen dat deze blanco voor systematische afwijkingen zal zorgen. Contaminatie van de blanco's is weinig waarschijnlijk aangezien de systematisch te hoge waarde enkel werd vastgesteld bij de blanco.

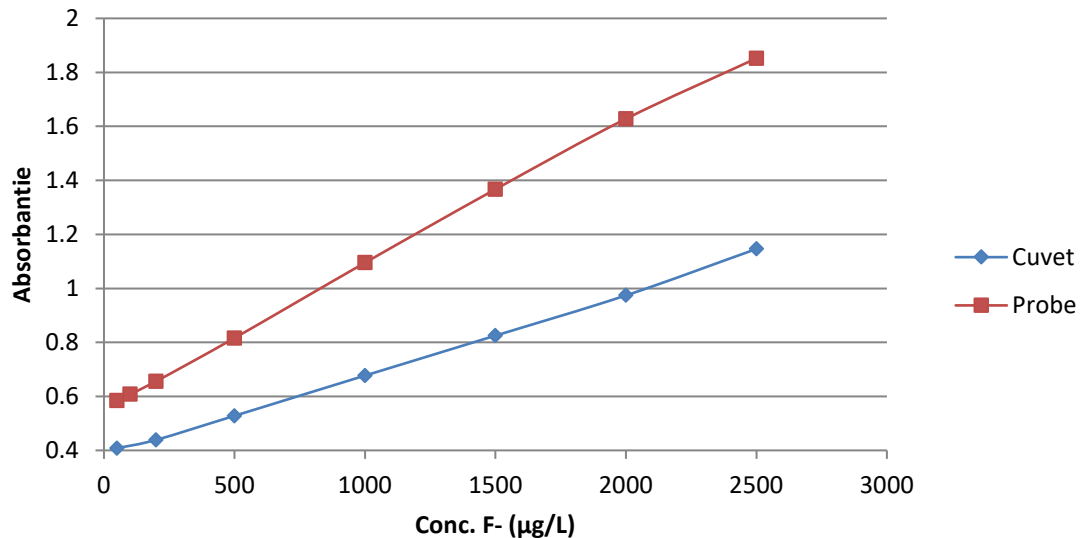
De detectielimiet en kwantificeringslimiet worden bepaald met formules (2.1) en (2.2) respectievelijk. De gebruikte standaarddeviatie is afkomstig van de herhaalbaarheid die berekend is met een standaardcurve en wordt weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 5.3 De ondergrens van de complexone methode (µg/L)

	S_r	$ \bar{x} _{\text{blanco}}$	LOD	LOQ
Cuvet	1,38	50,07	54,21	63,87
Probe	3,30	39,54	49,45	72,56

Bij deze methode is het verschil in gemiddelde concentratie tussen de cuvet en de probe kleiner dan bij de vorige methodes. Dit komt doordat de probe een standaarddeviatie heeft die slechts een beetje hoger is dan deze van de cuvet. Door de goede herhaalbaarheid van de methode ligt het detectielimiet, met een laagste standaard van 50 µg/L, onder 80 µg/L. Als er gekeken wordt naar de LOQ kan de ondergrens van de methode vastgelegd worden op 100 µg/L. Dit duidt erop dat er met de gebruikte methode tot vrij laag gemeten kan worden. Deze LOQ ligt voldoende ver boven de blancowaarde die aanvankelijk gemeten werd. We kunnen er dus vanuit gaan dat de mogelijke blanco bijdrage beperkt is.

Omdat fluoride normaal niet veel voorkomt in waterige media wordt er een curve opgesteld voor de bepaling van fluoride met 2500 µg/L als hoogste standaard. De bepaling van de bovengrens wordt weergegeven in Figuur 5.6. Hierbij zal tevens het verschil weergegeven worden tussen de metingen met zowel de cuvet als de probe.



Figuur 5.6 De bovengrens van de complexone methode

De lineariteit van de zowel de cuvet als de probe lijken ongeveer even goed te zijn tot 2500 µg/L. Hier is echter al een kleine afwijking waarneembaar. De lineariteit wordt verbeterd door een bovengrens te nemen van 2000 µg/L. Een bovengrens van 2000 µg/L is voldoende hoog voor de bepaling van fluoride. Toch is deze bovengrens hoog genoeg om ervoor te zorgen dat er zo goed als nooit een verdunning gemaakt zal moeten worden om de metingen binnen de curve te laten vallen. Doordat er geen verdunning nodig is voor het meten van fluoride zal de kans op een afwijking van de werkelijke concentratie kleiner zijn waardoor de methode in het algemeen nauwkeuriger zal worden.

5.5.2 Precisie

Er zijn voor de bepaling van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid in duplo blanco stalen gemeten die afzonderlijk staan van de blanco gebruikt in de standaardcurve. Voor zowel de cuvet als de probe zijn er elk twee blanco stalen gemeten op zes verschillende dagen.

Omdat er niet met een blanco waarde gewerkt wordt, maar met een laagste standaard van 50 µg/L kan er nu niet enkel de herhaalbaarheid (formule (2.3)) en intralaboratorium-reproduceerbaarheid (formule (2.5) en (2.6)) berekend worden, maar ook de variatiecoëfficiënten hiervan. De herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt wordt berekend met formule (2.4) en de intralaboratorium-reproduceerbaarheidsvariatiecoëfficiënt wordt berekend met formule (2.7). De resultaten in Tabel 5.4 zijn verkregen door het uitvoeren van een ANOVA: single factor op de stalen van 50 µg/L. De bekomen MS_{within} waarden van de cuvet en de probe zijn 1,91 en 10,90 respectievelijk. De bekomen MS_{tussen} waarden van de cuvet en de probe zijn 169,71 en 188,95 respectievelijk. Aangezien er op één zelfde dag slechts twee stalen gemeten werden ligt de waarde van n_j op 2.

Tabel 5.4 De resultaten van de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid

	Herhaalbaarheid		Intralaboratorium-reproduceerbaarheid		
	S _r (µg/L)	CV _r (%)	S _A ² (µg/L) ²	S _i (µg/L)	CV _i (%)
Cuvet	1,38	1,87%	33,90	5,98	8,13%
Probe	3,30	5,15%	89,02	10,00	15,60%

De herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid zijn zeer laag voor de gebruikte methode. Deze lage waarden duiden op een zeer goede precisie. De variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid ligt bij de cuvet onder 2% wat duidt op een zeer kleine afwijking op het gemiddelde van de laagste standaard. De intralaboratorium-reproduceerbaarheids-variatiecoëfficiënt ligt, zoals verwacht, een pak hoger dan de herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt. Hierbij is bij de probe een procentuele afwijking van bijna 16% mogelijk op de gemiddelde waarde.

5.5.3 Juistheid

Om de juistheid van de methode te kunnen achterhalen wordt er een onafhankelijke standaard genomen. Deze onafhankelijke standaard wordt tevens gespiked met een standaard oplossing van 500 µg/L. Door het verschil in concentratie kan de recovery of terugvinding bepaald worden van de gespikete oplossing. Voor de bepaling van de juistheid is in Tabel 5.5 is enkel een onafhankelijke standaard gebruikt. Er is wel een ringstaal gemeten, maar door de referentiewaarde was nog niet gekend waardoor deze niet weergegeven kan worden.

Tabel 5.5 Bepalen van de juistheid met een gespikete monster oplossing

Sample ID		Absorbantie	Conc. F ⁻ (µg/L)	Conc. standaard theorie (µg/L)	Conc. standaard praktijk (µg/L)	Recovery (%)
Cuvet	Onafhankelijke standaard 1	0,626	693	513	505	99%
	Spike 1	0,778	1198			
Probe	Onafhankelijke standaard 1	1,056	704	513	498	97%
	Spike 1	1,335	1202			

Voor de gebruikte methode is een zeer goede terugvinding. Voor zowel de cuvet als de probe valt de terugvinding binnen de marge van 5%. Om de juistheid met een grotere zekerheid te kunnen bepalen zijn de onafhankelijke standaard alsook de gespikete oplossing gedestilleerd met de microdiffusie methode. Door de microdiffusie is er een klein verlies in concentratie omdat niet alles overgedestilleerd wordt. Hierdoor zal de recovery niet hoger dan 100% worden. De concentraties van de oplossingen werden berekend met formule (5.3) voor de cuvet en formule (5.4) voor de probe.

$$\text{Absorbantie} = 0,0003 \frac{L}{\mu\text{g F}^-} * \text{Conc. F}^- + 0,4177 \quad (R^2 = 0,9996) \quad (5.3)$$

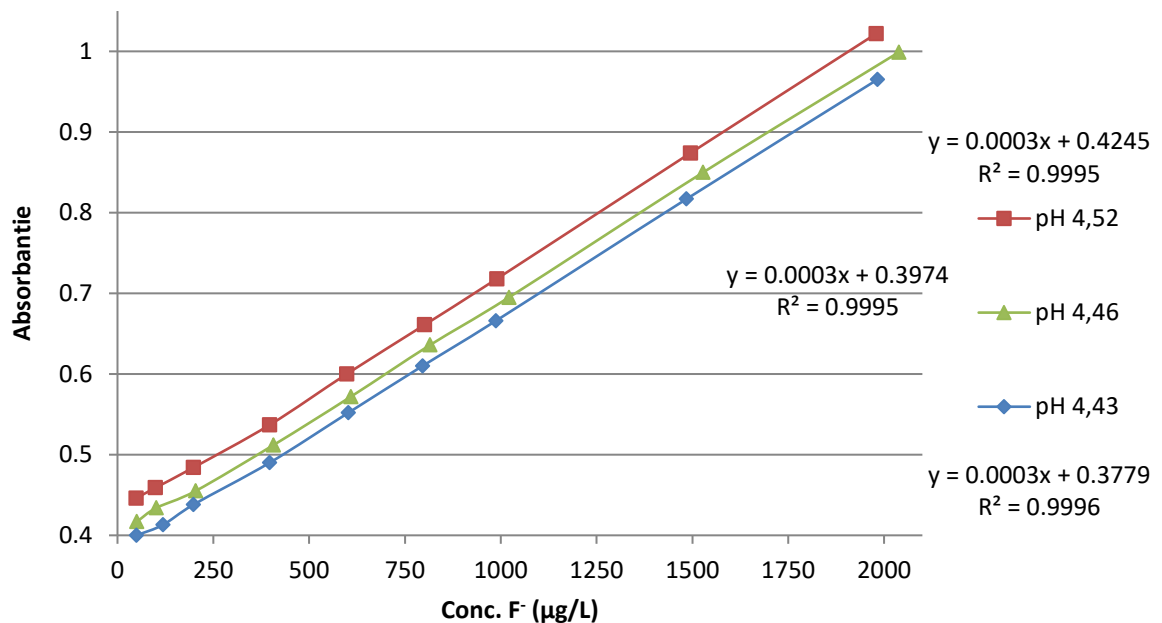
$$\text{Absorbantie} = 0,0006 \frac{L}{\text{mg F}^-} * \text{Conc. F}^- + 0,6616 \quad (R^2 = 0,9998) \quad (5.4)$$

5.5.4 Interferenties

De complexone methode is zeer gevoelig voor interferenties. Om van deze interferenties geen last te moeten hebben wordt er een microdiffusie uitgevoerd zoals beschreven in paragraaf 5.3.1. Met deze methode zou enkel fluoride over gedestilleerd mogen worden en zullen de interfererende ionen dus in de monster oplossing blijven en enkel fluoride in de vangoplossing. Hierom wordt er vanuit gegaan dat na de microdiffusie er geen last meer ondervonden zal worden van de interfererende ionen en wordt dit bijgevolg ook niet getest.

5.5.4.1 Invloed pH

Nadat de fluoride oplossing een microdiffusie heeft ondervonden zit de fluoride in een natriumhydroxideoplossing, hierbij waren twee verschillende methodes gebruikt. De methode waarbij HCl gesatureerd werd met HMDS heeft een vangoplossing van 1 ml 0,1M NaOH en de methode waarbij HClO₄ gesatureerd werd met HMDS heeft een vangoplossing van 0,075 ml 0,5M NaOH. Ondanks de toegevoegde acetaatbuffer zal de natriumhydroxideoplossing de pH van de eindoplossing toch veranderen. Het verschil in pH door deze basische oplossing is niet groot, maar heeft wel enig effect op de standaardcurve. In Figuur 5.7 zijn drie standaardcurves weergegeven met telkens een andere aanmaak van de fluorideoplossing.



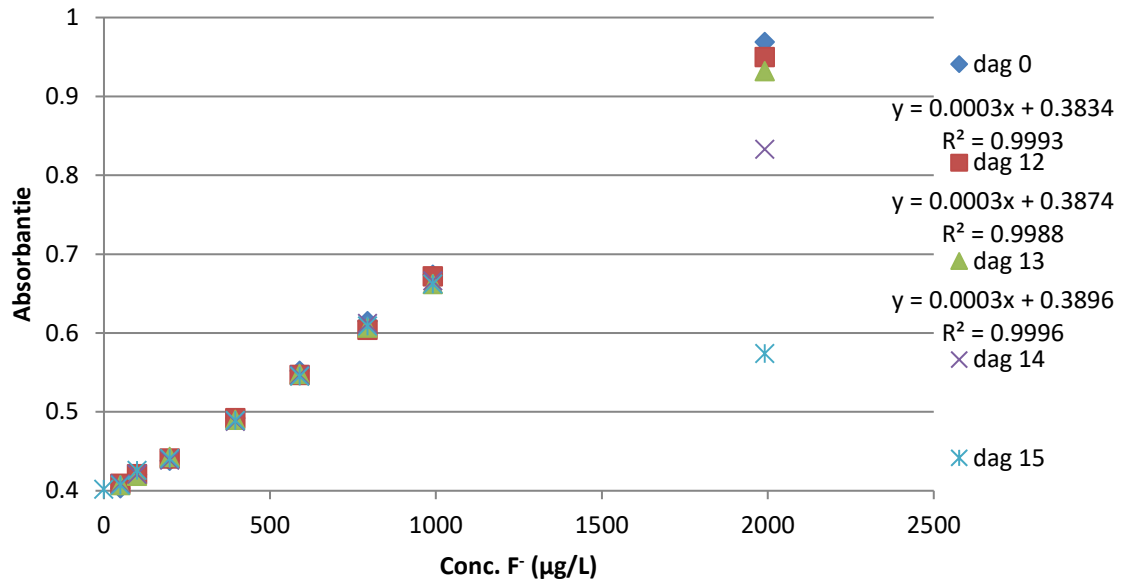
Figuur 5.7 Invloed van de pH op de standaardcurve

Alle drie de standaardcurves vertonen een gelijke determinatie- en richtingscoëfficiënt. Het enige verschil in deze curves is het intercept en pH. Ondanks het kleine verschil in pH tussen de verschillende standaardcurves wordt toch een groot verschil in absorbantie verkregen. In de onderste, blauwe, curve is geen natriumhydroxide oplossing toegevoegd. De middelste, groene, curve vertoont een licht stijging t.o.v. de blauwe curve en werd aangemaakt met een vangoplossing van 0,075 ml 0,5M NaOH. De bovenste, rode, curve heeft een nog hogere pH. Bij deze curve werden de fluorideoplossingen aangemaakt met een vangoplossing van 1,0 ml 0,1M NaOH die opgelost is in 20% ethanol. Door een matrix matching uit te voeren op de standaardcurves kan het probleem in pH verandering verholpen worden.

5.5.5 Robuustheid

5.5.5.1 Invloed van de tijd

Bij het bepalen van eender welk ion is tijd een belangrijke factor. Dit laat weten hoe snel de meting moet gebeuren na het aanmaken van de oplossing. In Figuur 5.8 wordt de invloed van de tijd nagegaan na 12 dagen in de kast te hebben laten staan.

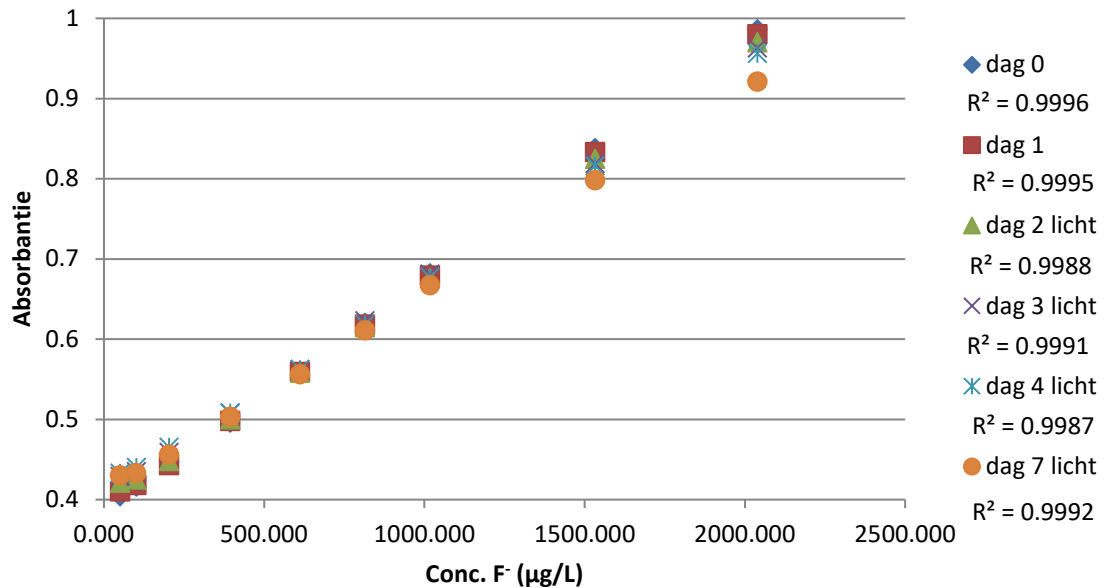


Figuur 5.8 Invloed van de tijd op de complexone methode

Er is een zeer grote daling waarneembaar in de hoogste standaard van 2000 µg/L. Deze daling is te wijten aan de vorming van een neerslag in de oplossing die tevens de kleurintensiteit verminderd. Deze neerslagvorming treedt sneller op bij oplossingen met een hoge concentratie dan bij oplossingen met een lagere concentratie. Na 12 dagen in de kast te hebben gestaan lijkt de curve minder goed te zijn. Dit is echter door een toevallig slechte standaard, want de volgende dag is de determinatiecoëfficiënt veel beter. Ondanks dat de curve na 13 nog steeds goed is wordt voor de zekerheid een maximum van 10 dagen vastgelegd opdat men de oplossingen nog mag gebruiken. Dit is nog steeds een zeer lange tijd waarop de oplossingen bewaard kunnen worden.

5.5.5.2 Invloed van het licht

Omdat er gewerkt wordt met een kleuroplossing, en de kleuroplossingen meestal onderhevig zijn aan licht, wordt een oplossing enkele dagen in het licht gehouden om hiervan de invloed te onderzoeken. De invloed van het licht wordt weergegeven in Figuur 5.9. Het verloop wordt onderzocht na enkele dagen.



Figuur 5.9 Invloed van het licht op de complexone methode

Als er gekeken wordt naar de determinatiecoëfficiënt is er te zien dat deze al redelijk snel afneemt. Deze afname is relatief stabiel en vooral te wijten aan de laagste standaard. Dit komt doordat er bij de laagste standaard een iets te hoge absorptantie gemeten wordt. Zonder deze standaard zou de determinatiecoëfficiënt ongeveer gelijk zijn aan deze van dag 1 en 2. Wat opmerkelijk is aan de curve is dat deze lijkt af te vlakken met de middelste standaard als kantelpunt. De daling van de hoge standaarden kan te wijten zijn aan de invloed van het licht zelf, maar deze verklaring vertelt niets over de stijging in absorptantie bij de lage standaarden. Het is dus niet zeker wat er gebeurt met de lagere standaarden of waarom dit gebeurt.

5.6 Conclusie

De complexone methode is een goede methode voor de spectrofotometrische bepaling van fluoride in afvalwater, maar is zeer onderhevig aan interferenties. De interferenties worden verholpen door het uitvoeren van een destillatie op kamertemperatuur. Het werkgebied is gelegen van 100 µg/L tot 2000 µg/L. De herhaalbaarheid van de methode ligt op 1,38 en 3,30 µg/L voor de cuvet en de probe respectievelijk met een intralaboratorium-reproduceerbaarheid van 5,98 µg/L voor de cuvet en 10,00 µg/L voor de probe. De methode heeft ook een goede juistheid, al kon dit niet getest worden met een referentie staal.

De complexone methode is een zeer robuuste methode die buiten een verandering in intercept geen invloed ondervindt van een verandering in pH. Als de oplossingen in het donker bijgehouden worden kunnen deze tot bijna 2 weken stabiel blijven. Wanneer de oplossingen in het licht bewaart worden zal deze tijd halveren.

BESLUIT

De 3 gebruikte methodes zijn tot dusver goede methodes voor de spectrofotometrische bepaling van ammonium in kleiwater en chloride en fluoride in afvalwater. Vooral de methodes voor ammonium en chloride hebben weinig last van interfererende ionen. De interfererende ionen worden bij de fluoride methode verwijderd door het uitvoeren van een microdiffusie. De resultaten van het werkgebied van elke methode als ook de herhaalbaarheid en intralaboratorium-reproduceerbaarheid worden weergegeven in Tabel 6.1. De juistheid voor elke methode is goed, maar kon niet bepaald worden met een referentie staal.

Tabel 6.1 Samenvatting van de 3 gebruikte methodes

		Phenate methode (µg N/L)	Ferricyanide methode (mg/L)	Complexone methode (µg/L)
Werkgebied		50-1000	2,5-30	100-2000
LOQ	Cuvet	41,45	1,28	63,87
	Probe	48,88	2,10	72,56
Herhaalbaarheid	Cuvet	2,99	0,10	1,38
	Probe	4,66	0,20	3,30
Intralaboratorium-reproduceerbaarheid	Cuvet	15,64	0,12	5,98
	Probe	21,56	0,40	10,00

De phenate methode is een weinig robuuste methode met name door de tijdsspanne van stabiliteit en invloed van de zuurtegraad op het kleurreagens. Ook de gebruikte katalysator maakt de methode vrij gevoelig aan licht. De methodes voor chloride en fluoride ondervinden vooral een invloed van de pH door een verandering in intercept en zijn beide enkele dagen stabiel na aanmaak wanneer ze in het donker bewaard worden. Ook bij deze twee methodes heeft licht een redelijke invloed op de curve en is het enkel opletten bij de ferricyanide methode voor contaminatie.

LITERATUURLIJST

Alm, S., Oh, H.-n., Park, G.-e. (2009). *Improvement of the Ammonia Analysis by the Phenate Method in Water and Wastewater. Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30 (9), 2032-2038.

Anthimidis, A.N., Stratis J.A., Tzollas, N.M., Zachariadis, G.A. (2010). *A new approach to indophenol blue method for determination of ammonium in geothermal waters with high mineral content. International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90 (2), 115-126.

Backer Dirks, O., Cox, F.H. (1967). *Fluoride Determination in Fluoridated Drinking Water. Caries Research*, 1 (4), 295-298.

Balcerzak, M., Marczenko, Z. (2000). Kloczko, E. (Ed.). *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis* (1st edition). (Vol. 10, p. 190-191). Warschau: Elsevier.

Chowdhury, N.G. (1988). *Fluoride intake of infants in new zeeland*. University of Otago, p. 63-71.

Eaton, E.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E. (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater*. (21st ed., p. 4-74 tot 4-114). Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water environment Federation.

Frank, M.J., Johnson, J.B., Rubin, S.H. (1976). *Spectrophotometric determination of sodium nitroprusside and its photodegradation products*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65 (1), 44-48.

GE Healthcare Life Science. (2012). *Spectrophotometry* [Handboek]. S.I.: General Electric Company. Gevonden op het internet: http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Spectrophotometry.pdf

Hagino, K., Iwasaki, I., Ozawa, T., Utsumi, S. (1956). *A New Spectrophotometric Method for the Determination of Small Amounts of Chloride Using the Mercuric Thiocyanate Method. Bulletin of Chemical Society of Japan*, 29 (8), 860-864.

Haider, C. (2004) *Electrodes in potentiometry* [monografie]. S.I.: Teachware, Metrom AG. Gevonden op het internet: <http://www.metrohm.com/en-au/products-overview/%7BB9512338-0BCE-44AF-A15D-1FAC991C60E9%7D>

Hellma Analytics. (2015). *Manual: Optical immersion Probe 661.622-UVS* [Handboek]. S.I.: Hellma GmbH & Co. KG.

Lawson, G.M. (1994). *Defining limit of detection en limit of quantification as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus*. *Clinical Chemistry*, 40(7), 1218-1219.

Perkampus, H.H. (1992). *UV-VIS spectroscopy and its applications* (C.H. Grinter en T.L. Threlfall, vertaler). (p. 3-4 en 12). Heidelberg: Springer-Verlag. (Origineel werk werd gepubliceerd in 1992)

Spectrophotometry. (s.a.). Gevonden op 4 februari 2016 in Chemwiki: http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry

Smith, F.A. (ed.) (1970). *Handbook of Experimental Pharmacology: Pharmacology of Fluorides Part 2*. (Vol. XX (2), p. 21-24). Berlin: Springer-Verlag.

Taves, D.R. (1968). *Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane*. (Vol. 15, p. 969-974). Talanta: Elsevier.

UV-1800. (s.a.). Gevonden op 3 februari 2016 in Shimadzu:
http://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/uv1800/uv.html

Vito. (2011). *Prestatiekenmerken*. p. 2-17. S.I.: Belgisch Staatsblad. Gevonden op het internet:
https://esites.vito.be/sites/reflabos/2012/Online%20documenten/CMA_6_A.pdf

Bijlage 1. Lijst met gevaren van producten voor bepaling van NH_4^+ , Cl^- & F^-

Deze lijst bevat de namen, formules, gevaren en H-zinnen van de producten die gebruikt worden bij de bepaling van chloride, fluoride en ammoniak uit water met een UV-VIS spectrofotometer.

1. Bepaling ammoniak (Phenate method)			
Naam Product	Formule	Gevaren	H-zinnen
<i>Phenol (≥89%)</i>	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	Bijtend Giftig Lange termijn Gezondheid schadelijk	H341 : Verdacht van het veroorzaken van genetische schade H301 + H311 + H331 : Giftig bij inslikken, bij contact met de huid en bij inademing H373 : Kan schade aan organen (centrale zenuwstelsel, huid, lever, nieren) veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling. H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
<i>Ethanol (95%)</i>	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Brandgevaarlijk	H225 : Licht ontvlambare vloeistof en damp
<i>Sodium nitroprusside</i>	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$	Giftig	H301 : Giftig bij inslikken
<i>Alkaline citrate</i>	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	/	/
<i>Sodium hydroxide</i>	NaOH	bijtend	H290 : Kan bijtend zijn voor metalen H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel
<i>Sodium hypochlorite</i>	NaOCl	Explosie gevaar Brand bevorderend Bijtend Schadelijk Milieugevaarlijk	H200 : Instabiele ontplofbare stof H272 : Kan brand bevorderen; oxiderend H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel H335 : Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. H400 : Zeer giftig voor in het water levende organismen.
<i>Anhydrous ammonium chloride</i>	NH_4Cl	Schadelijk	H302 : Schadelijk bij inslikken H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie
<i>Magnesium hydroxide</i>	$\text{Mg}(\text{OH})_2$	Schadelijk	H315 Veroorzaakt huidirritatie H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken
2. Bepaling chloride (Ferricyanide Method)			
Naam Product	Formule	Gevaren	H-zinnen
<i>Mercuric thiocyanate</i>	$\text{Hg}(\text{SCN})_2$	Giftig Milieugevaarlijk Lange termijn Gezondheid schadelijk	H300 + H310 + H330 : Dodelijk bij inslikken, bij contact met de huiden bij inademing H373 : Kan schade aan organen veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling H410 : Zeer giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen
<i>Ferric nitrate</i>	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Brand bevorderend Schadelijk	H272 : Kan brand bevorderen; oxiderend H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie H335 : Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken H315 : Veroorzaakt huidirritatie
<i>Conc. Nitric acid</i>	HNO_3	Brand bevorderend Bijtend	H272 : Kan brand bevorderen; oxiderend H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel
<i>Sodium chloride</i>	NaCl	/	/
3. Bepaling Fluoride (Complexone method)			
Naam Product	Formule	Gevaren	H-zinnen
<i>Anhydrous sodium fluoride</i>	NaF	Giftig	H301 : Giftig bij inslikken H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie H315 : Veroorzaakt huidirritatie
<i>Anhydrous sodium acetate</i>	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	/	/
<i>Conc. (glacial) acetic acid</i>	CH_3COOH	Brand gevaarlijk Bijtend	H226 : Ontvlambare vloeistof en damp H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel
<i>Alizarin fluorine blue (Alizarin-3-methyliminodiacetic acid)</i>	$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_4 \cdot \text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2 \cdot \text{COOH})_2$	/	/
<i>Conc. Ammonium hydroxide</i>	NH_4OH	Bijtend Schadelijk Milieugevaarlijk	H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel H335 : Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken H400 : Zeer giftig voor in het water levende organismen
<i>Lanthanum nitrate hexahydraat</i>	$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Brand bevorderend Schadelijk	H272 : Kan brand bevorderen; oxiderend. H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie

			H335 : Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken H315 : Veroorzaakt huidirritatie
<i>Acetone</i>	C ₃ H ₆ O	Brand gevaarlijk schadelijk	H225 : Licht ontvlambare vloeistof en damp H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie H336 : Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken
<i>Tertiary butanol</i>	C ₄ H ₁₀ O	Brand gevaarlijk Schadelijk	H225 : Licht ontvlambare vloeistof en damp H332 : Schadelijk bij inademing H319 : Veroorzaakt ernstige oogirritatie H335 : Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken

4. Microdiffusie fluoride

Naam Product	Formule	Gevaren	H-zinnen
<i>Conc. hydrochloric acid</i>	HCl	Bijtend Schadelijk	H314 Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. H335 Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken.
<i>Conc. perchloric acid</i>	HClO ₄	Brand bevorderend Bijtend	H271 Kan brand of ontploffingen veroorzaken; sterk oxiderend. H314 Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel.
<i>Hexamethyldisilazane</i>	(CH ₃) ₃ SiNH-Si(CH ₃) ₃	Giftig Bijtend Brand gevaarlijk	H225 Licht ontvlambare vloeistof en damp. H302 Schadelijk bij inslikken. H311 Giftig bij contact met de huid. H314 Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. H331 Giftig bij inademing.
<i>Ethanol (95%)</i>	C ₂ H ₆ O	Brandgevaarlijk	H225 : Licht ontvlambare vloeistof en damp
<i>Sodium hydroxide</i>	NaOH	Bijtend	H290 : Kan bijtend zijn voor metalen H314 : Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel