

En kolorimetrisk metode til bestemmelse af fosforindholdet i planter.

Af J. Benjaminsen og J. Jensen.

Bestemmelse af fosfor i jord og plantemateriale er en af de hyppigst forekommende analyser i et laboratorium, der beskæftiger sig med jordbunds- og agrikulturmæssige spørgsmål, og det er derfor af stor økonomisk betydning at finde frem til så enkle og tidsbesparende metoder som muligt, forudsat det ikke går udover nøjagtigheden.

En af de mest benyttede metoder til bestemmelse af fosfor i jordekstrakter er den såkaldte molybdænbåtmetode — en mikrometode — der er baseret på dannelsen af et hetero-polykompleks, som efter reduktion med et passende reduktionsmiddel giver en blå farve, hvis intensitet er proportional med mængden af inkorporerede centralatomer (fosfor). Ved den på Statens Planteavls-Laboratorium benyttede svovlsyremetode bruges fremkalderen »Metol« (para-methylaminofenol) som reducerende stof, idet man hermed får en passende farveintensitetsskala for det koncentrationsområde, i hvilke fosfor sædvanligvis foreligger i jordekstrakterne.

Ved bestemmelsen af fosfor i plantemateriale anvendes derimod — og det drejer sig her om makroanalyser — gravimetrisk eller titrimetrisk metoder, og den almindeligst anvendte er den såkaldte Lorenz-metode (1) hvorefter en modifikation, udarbejdet af afdelingsbestyrer J. Find Poulsen (2) siden 1936 har været anvendt til fosforsyrebestemmelser i landbrugsafgrøder på Statens Planteavls-Laboratorium. Denne metode har gjort udmærket fyldest og er som gravimetrisk metode betragtet særdeles enkel. Men efter at de kolorimetrisk analysemetoder i den sidste snes år på flere områder har trængt de to foran nævnte noget i baggrunden, har man på Statens Planteavls-Laborato-

rium fundet det opportunt, efter at man har fået et Beckman fotokolorimeter stillet til rådighed, at tage fosforbestemmelsen i afgrøder op til fornyet undersøgelse, og målet har været at finde en kolorimetrisk metode til erstatning for den nu anvendte gravimetrisk.

Molybdænblåtmetoden, som har gjort udmærket fyldest ved bestemmelsen af fosfor i jord, viste sig ved undersøgelse mindre velegnet til fosforbestemmelsen i planteaske. For det første er det en mikrometode, og som sådan kræver den meget stor omhu i analyseringsarbejdet, da der må arbejdes med meget små stofmængder og med så fortyndede opløsninger, at der kan være fare for, at det benyttede glasapparat enten kan afgive eller adsorptivt fastholde det stof, der skal bestemmes, i sådanne mængder, at analyseusikkerheden bliver for stor. For det andet øver de tre tilstandsvariable: pH, tiden og temperaturen for stor indflydelse på farveintensiteten.

Den kemiske reaktion, som ligger til grund for molybdænblåtmetoden, er som ovenfor nævnt en reduktionsproces. Med stærke reduktionsmidler reduceres molybdænet i molybdænsyren, H_2MoO_4 , hvorved der fremkommer en opløsning af molybdænblåt, som indeholder molybdæn i iltningsstrinnet + 5, og som muligvis er en kolloid opløsning af molybdænylmolybdat $(\text{MoO})_2(\text{MoO}_4)_3$. Reduktionen kan gå videre. Reduceres al molybdænet til oxydationstrinnet + 5, fås grønne opløsninger, og ved overgangen til endnu lavere oxydationstrin $\text{Mo}^{(+4)}$ og $\text{Mo}^{(+3)}$ farves opløsningen brun. Ved meget kraftig reduktion dannes ikke molybdænblåt, og der kan foruden brune fremkomme gule og røde reduktionsfarver. På den måde kan H_2MoO_4 f. eks. reduceres af zink og stannoforbindelser, og reduktionens forløb er som ovenfor nævnt i høj grad afhængig af pH, temperatur og reaktionstiden. (R a n c h e M a d s e n (3)).

Ved fosforbestemmelsen efter molybdænblåtmetoden benytter man sig af, at $\text{Mo}^{(+3)}$ reduceres langt lettere, når det findes som bestanddel af en ligand i en heteropolysyre end i den frie molybdænsyre. Ved reduktionen destrueres komplekset langsomt, hvorved fosforsyren frigøres, og der kan opbygges et nyt fosformolybdatkompleks (man tillægger dette formlen $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$, 12 rækken). Fosforsyrens funktion i reduktionsprocessen består altså i, at den virker katalytisk, og af denne grund er det af uhyre vigtighed her, som ved alle sammenlignende målinger i dynamiske systemer, at alle tilstandsvariable, naturligvis på nær den, man ønsker at måle, holdes konstante.

De ovenfor kort omtalte forhold bevirker, at molybdænblåtmotoden ikke er velegnet til fosforsyrebestemmelsen i landbrugsafgrøder, hvor den tilladte tolerence i reglen er lille. Mere velegnet er derimod en anden kolorimetrisk metode, som er udførligt beskrevet af Kitson & Mellon (4). Princippet i denne metode er, at fosforsyre i sur opløsning med ammoniumvanadat og ammoniummolybdat danner en gulfarvet, opløselig forbindelse, hvis intensitet er afhængig af den forhåndenværende fosforsyremængde. Metoden vil i det følgende blive kaldt vanadat-molybdatmetoden.

Kitson & Mellon's arbejde bygger på Missons undersøgelse over en kolorimetrisk fosforsyrebestemmelse i stål, som blev offentliggjort så tidligt som i 1908 (5). Ifølge Misson danner fosforsyre, vanadat og molybdat en forbindelse (vanado-fosfo-ammoniummolybdat) hvis kemiske formel er $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot \text{NH}_4\text{VO}_3 \cdot 16\text{MoO}_3$ og hvis farve er gul. Det gule kompleks kemiske sammensætning er dog ikke endelig fastslået. Ifølge Maksimova & Koglovsky (6) indeholder komplekset ikke ammonium, men kan repræsenteres ved formelen $[\text{P}_2(\text{V}_2\text{O}_6)_2(\text{Mo}_2\text{O}_7)_{12}]$. Maksimumsabsorptionen af lys i en opløsning indeholdende dette stof finder sted ved 470 m μ .

Vanadat-molybdatmetoden har først og fremmest fundet anvendelse ved bestemmelse af fosfor i stål (4, 7), men er også brugt ved fosforbestemmelse i jernmalm (8) og i biologisk materiale (8, 9).

Metoden har to fundamentale fordele fremfor molybdænblåtmotoden. For det første den mindre følsomhed, som bevirker, at der kan tages større stofmængder i arbejde, og for det andet kompleksets store stabilitet, der medfører, at farveintensiteten, når komplekset først er dannet, er uafhængig af tiden. (På Statens Planteavlslaboratorium har man konstateret, at standardopløsningerne i hvert fald er holdbare i 2 måneder).

Ifølge Kitson & Mellon (4) er interferencen af ionerne Ca^{++} , K^+ , Na^+ , Fe^{+++} , SO_4^{--} , Cl^- og silikat, altså de, der udgør hovedmængden af planteaske, overordentlig ringe. Op til 1000 p.p.m. bevirker ikke en ændring i analyseresultatet på over 2 pct.

På Statens Planteavlslaboratoriums jordbundskemiske afdeling er i året 1954 i forbindelse med analyseringen af afgrøder

fra karforsøg vanadat-molybdatmetoden sammenlignet med den af F i n d P o u l s e n modificerede Lorenz-metode, og resultatet af disse undersøgelser vil fremgå af det følgende: Ved analyse-ringens metodik og fremstillingen af reagenser, har vi støttet os til R a u t e r b e r g: Eine Colorimetrische Makromethode zur Phosphorsäurebestimmung (10).

Reagenser:

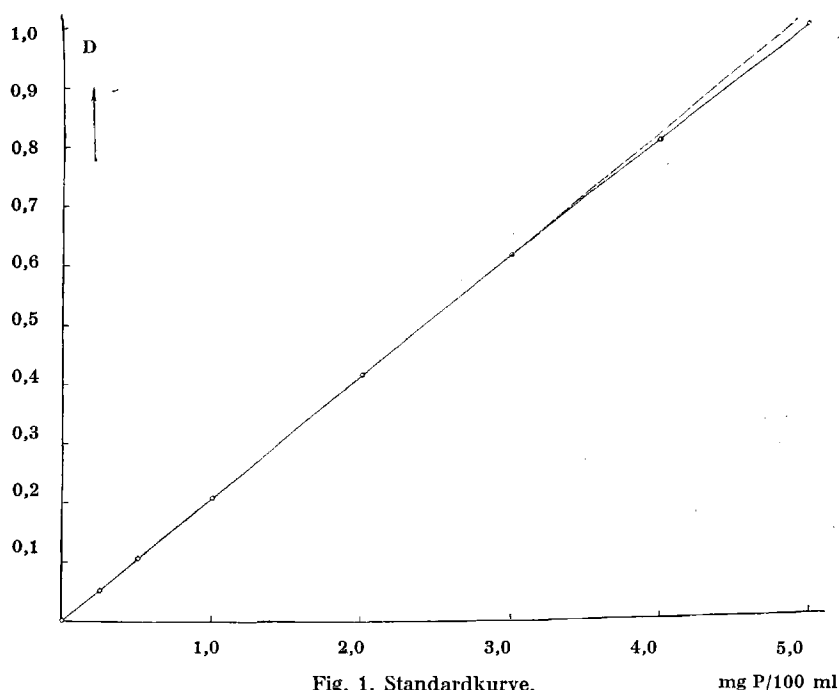
- I. Salpetersyre: 1 del konc. HNO_3 (vægtfylde 1.42) til 2 dele dest. vand.
- II. Ammoniumvanadatopløsning: 2,5 g ammoniumvanadat (NH_4VO_3) opløses i 500 ml kogende vand, i en 1 l målekolbe. Efter afkøling tilsættes 20 ml konc. HNO_3 og fyldes op til 1 l med destilleret vand.
- III. Ammoniummolybdatopløsning. 50 g ammoniummolybdat ($(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) opløses i vand ved 50°C i en 1 l målekolbe, og opløsningen fortyndes til 1 l.
- IV. Stamopløsning: 0,4393 g KH_2PO_4 (efter S ø r e n s e n) opløses i destilleret vand ad 1 l. 1 ml af denne opløsning indeholder 0,1 mg P.

Absorptiometer og kalibrering.

Som måleinstrument anvendtes et Beckman fotokolorimeter model D. U. med termostatkølet lampehus. Ifølge C e n t e r og W i l l a r d (8, 11) er temperaturvariationen lille, men ikke betydningsløs for farveintensiteten af fosfo-vanado-molybdatopløsning. (Det anføres, at en temperaturstigning på 10°C forøger »density-aflæsningen« ca. 0,010 enheder). Alle målinger blev foretaget ved stuetemperatur, $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$. Kalibreringen blev foretaget ved at afpipettere forskellige mængder af stamopløsningen IV i 100 ml målekolber, tilsætte dest. vand til 50 ml og derefter 10 ml salpetersyre I, 10 ml ammoniumvanadatopløsning II og under omrystning 10 ml Ammoniummolybdatopløsning III. (Tilsætning af reagenserne i den nævnte rækkefølge skal overholdes). Efter opfyldning med destilleret vand til mærket og omrystning henstod opløsningerne til den følgende dag, hvor den gule farves intensitet målttes i 10 mm kuvetter ved bølgelæng-

den 470 m μ . Som referenceopløsning benyttedes destilleret vand tilsat reagenser i samme mængde og taget i samme rækkefølge som ovenfor nævnt.

Det fremgår af nedenstående kalibreringstabel (tabel 1 eller tydeligere af figur 1, hvor tabellens data er grafisk fremstillet), at der er en linær sammenhæng mellem aflæsningen på instrumentets skala D og fosforkoncentrationen i koncentrationsintervallet 0—3 mg P pr. 100 ml. Først efter 3 mg P pr. 100 ml sker en svag afbøjning af kurven. Kurven i figur 1 benyttedes som standardkurve for afgrødeanalyserne.



Tabel 1. Sammenhæng mellem instrumentets skala D og fosforkoncentrationen.

mg P/100 ml.	0.25	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
D.....	0.052	0.102	0.208	0.414	0.616	0.811	1.007

For den retlinede del af standardkurven gælder den Lambert-Beer'ske absorptionslov.

Når et parallelbundet af monokromatisk lys sendes gennem en homogen absorberende fase, vil lysstyrken aftage efter en simpel lov, der kan gengives ved en lineær differentiallyingning af 1ste orden.

$$dI = -k \cdot I \cdot dl$$

hvor I er lysstyrken, l lagtykkelsen og k en konstant, absorptionskoefficienten. Er lysstyrken I_0 for $l = 0$ fås ved integration

$$1) \frac{I}{I_0} = e^{-kl}$$

Dette er Lamberts absorptionslov. I praksis bruges dog i stedet for e grundtallet 10, altså

$$2) \frac{I}{I_0} = 10^{-\alpha l}$$

hvor α kaldes *ekstinktionskoefficienten*. Forbindelsen mellem α og k er givet ved $\alpha = k \log_{10} e = 0,4343 k$.

Er den betragtede absorberende fase en opløsning, gælder i mange tilfælde i det fortyndede område Beers lov, at α er proportional med koncentrationen $\alpha = E \cdot c$. Her er c den molære koncentration og E en konstant, den molære ekstinktionskoefficient. Indsættes udtrykket for α i 2)

$$\text{fås} \quad 3) \frac{I}{I_0} = 10^{-l \cdot E \cdot c}$$

$$\text{eller} \quad 4) -\log \frac{I}{I_0} = lEc$$

for konstant holdt l ses, at størrelsen på venstre side af lighedstegnet er en lineær funktion af c , og det er denne størrelse, der ovenfor er betegnet med D . ∞ opløsningens optiske tæthed (optical density).

Størrelsen $\frac{I}{I_0}$ kaldes transmissionen. Udtrykt i procent betegnes den ofte i amerikansk litteratur med T .

I figur 2 er ekstinktionskurverne for de 4 standardopløsninger 0,5, 1,0, 2,0 og 3,0 mg P/100 ml grafisk fremstillet.

Ekstinktionsmaksimet ligger omkring $355\text{ m}\mu$ (altså langt forskudt tilvenstre for hvad Maksimova & Koglovsky fandt (6)).

Måling ved denne bølgelængde er dog upraktisk på grund af den nødvendige store fortynding, der for det første forøger usikkerheden på målingerne og for det andet besværliggør ana-

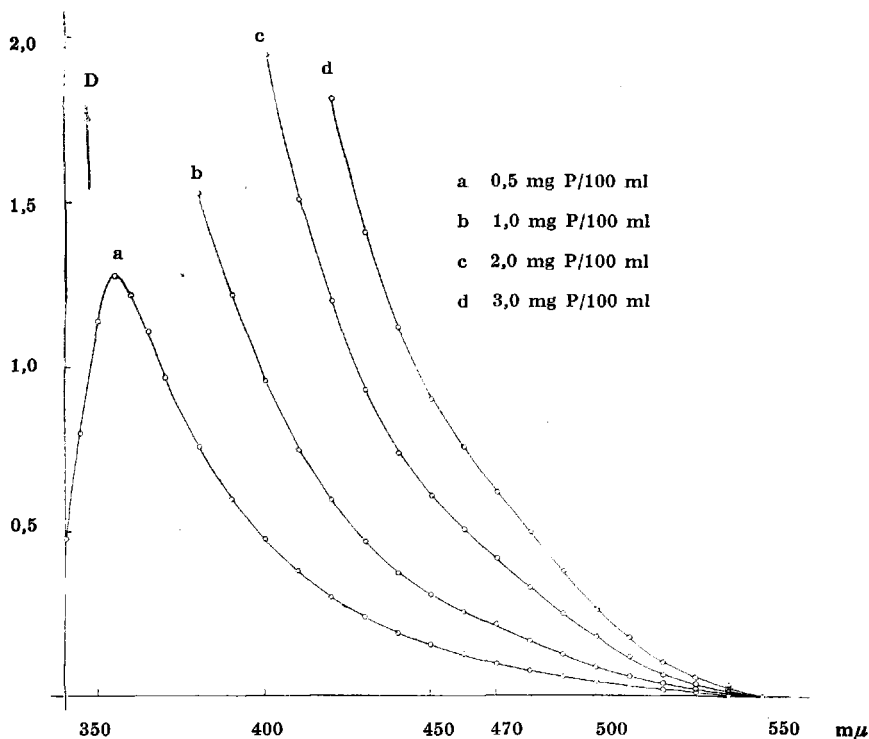


Fig. 2. Ekstinktionskurver.

lysearbejdet, fordi måleintervallet indsnævnes. Som det fremgår af det foregående, har vi her valgt at måle ved $470\text{ m}\mu$ en kompromis løsning ved valget mellem et tilfredsstillende måleinterval og en tilstrækkelig nøjagtig instrumentaflæsning. Men det skal fremhæves, at denne bølgelængde iøvrigt ikke udmærker sig. Bølgelængden kan vælges indenfor meget vide grænser alt efter opgavens art.

Afgrødeanalyser.

Analysens udførelse:

En stofmængde med et indhold af 4–8 mg P foraskes (bedst i elektrisk ovn) og asken tilsættes 10 ml 10 pct. saltsyre, der afdampes på vandbad. Efter afdampning af syren fortsættes indampningen endnu ca. 15 minutter, hvorefter det foraskede stof tørres i tørreskab ved 110°C i ca. 30 minutter. Efter afkøling føres diglens indhold ved hjælp af varmt vand og en »gummi-spatel« over i en 100 ml målekolbe. Der tilsættes 20 ml salpetersyre I og fyldes op til mærket med destilleret vand. Efter henstand i ca. $\frac{1}{2}$ time filtreres. Af filtratet udtage 50 ml, som overføres til en 100 ml målekolbe. Derefter tilsættes reagenserne i samme mængde og rækkefølge som anført i forrige afsnit, og der fyldes op til mærket med vand. Efter et døgn's henstand kolorimetres opløsningerne.

Analyseresultater.

I tabel 2 er analyseresultaterne fra fosforsyrebestemmelserne efter F i n d P o u l s e n s modificerede Lorenz-metode og vanadat-molybdatmetoden sammenlignet. Undersøgelsen omfatter ialt 42 prøver, nemlig 13 kærne, 16 halm, 1 græs, 1 lucerne, 5 lucerneensilage, 4 roetop og 2 roetopensilage. Hver prøve er efter begge metoder, på enkle undtagelser nær, analyseret in duplo, og det fremgår tydeligt af tabellen, at analyseusikkerheden er den samme for begge metoder — omkring 1 pct. Sammenlignes derimod pct. P i tørstoffet, bestemt efter de to metoder, finder man, at procentindholdet overvejende er lidt lavere efter vanadat-molybdatmetoden end efter den gamle metode.

Da analyseprøvens tilberedelse: tørring og foraskning af tørstof er den samme efter begge metoder, stammer forskellen ikke herfra. Den gravimetriske metodes lidt højere resultat skyldes snarere, at den empiriske faktor 0,3295, der anvendes ved omregningen af det udfældede ammoniumfosfor-molybdat til $\text{g P}_2\text{O}_5$, er lidt for høj end en systematisk fejl ved den kolorimetriske metode. Den fundne forskel mellem resultaterne af de to metoder er dog ganske uden betydning for vanadat-molybdat-metodens praktiske anvendelse.

Tabel 2. Analyseresultater fra fosforsyrebestemmelser efter Find Poulsens modificerede Lorenz—metode og vanadat—molybdetmetoden.

Afgørde	% P i tørstof gl. metode		% P i tørstof ny metode		Diffe- rens	Afgørde	% P i tørstof gl. metode		% P i tørstof ny metode		Diffe- rens
	enk. best.	gns.	enk. best.	gns.			enk. best.	gns.	enk. best.	gns.	
Byg- halm	0.066		0.064			Byg- kærne	0.421		0.422		
—	0.066	0.066	0.064	0.064	+0.002	—	0.424	0.423	0.422	0.422	+0.001
—	0.022		0.022			—	0.323		0.324		
—	0.022	0.022	0.022	0.022		—	0.321	0.322	0.324	0.324	+0.002
—	0.020		0.020			—	0.245		0.240		
—	0.020	0.020	0.020	0.020		—	0.248	0.244	0.241	0.241	+0.003
—	0.184		0.184			—	0.263		0.258		
—	0.184	0.184	0.184	0.184		—	0.264	0.264	0.256	0.257	+0.007
—	0.055		0.054			—	0.229		0.229		
—	0.055	0.055	0.052	0.053	+0.002	—	0.230	0.230	0.227	0.228	+0.002
—	0.031		0.030			—	0.233		0.234		
—	0.031	0.031	0.030	0.030	+0.001	—	0.233	0.233	0.231	0.233	
—	0.125		0.127			—	0.262		0.257		
—	0.125	0.125		0.127	+0.002	—	0.261	0.262	0.256	0.257	+0.005
—	0.203		0.200			Kløver- græs	0.452		0.446		
—	0.202	0.203	0.199	0.200	+0.003	—	0.453	0.453	0.445	0.446	+0.007
—	0.219		0.218			—	0.271		0.270		
—	0.219	0.219	0.215	0.217	+0.002	Lucerne Bederoe- top	0.271	0.271	0.271	0.271	
—	0.208		0.207			—	0.245		0.237		
—	0.209	0.209	0.208	0.208	+0.001	—	0.244	0.244	0.237	0.237	+0.007
—	0.165		0.161			—	0.240		0.243		
—	0.165	0.165	0.162	0.162	+0.003	—	0.240	0.240	0.243	0.243	+0.003
—	0.206		0.209			—	0.241		0.242		
—	0.206	0.206	0.209	0.209	+0.003	—	0.242	0.242	0.243	0.243	+0.001
—	0.228		0.225			—	0.259		0.254		
—	0.228	0.228	0.227	0.226	+0.002	—	0.259	0.259	0.255	0.255	+0.004
—	0.233		0.230			Lucerne- ensilage	0.279		0.277		
—	0.234	0.234	0.231	0.231	+0.003	—	0.278	0.279	0.277	0.277	+0.002
—	0.209		0.210			—	0.330		0.328		
—	0.210	0.210	0.209	0.210		—	0.330	0.330	0.326	0.327	+0.003
—	0.227		0.226			—	0.410		0.409		
—	0.227	0.227	0.223	0.225	+0.002	—	0.412	0.411	0.409	0.409	+0.002
Byg- kærne	0.254		0.249			—	0.412		0.408		
—	0.254	0.254	0.249	0.249	+0.005	—	0.407	0.410	0.408	0.408	+0.002
—	0.222		0.222			—	0.336		0.329		
—	0.225	0.224	0.220	0.221	+0.003	—	0.337	0.337	0.332	0.331	+0.006
—	0.205		0.205			Roetop- ensilage	0.194		0.193		
—	0.205	0.205	0.202	0.204	+0.001	—	0.194	0.194	0.193	0.193	+0.001
—	0.224		0.223			—	0.209		0.207		
—	0.223	0.224	0.221	0.222	+0.002	—		0.209	0.208	0.208	+0.001
—	0.365		0.357			—					
—	0.363	0.364	0.356	0.357	+0.007	—					
—	0.286		0.280			—					
—	0.288	0.287	0.281	0.281	+0.006	—					

Summary.

The phosphoric acid content of plants can be determined colorimetrically by means of the Beckman spectrophotometer in nitric acid medium by addition of ammonium vanadate and ammonium molybdate. This phosphovanadomolybdate method has been compared with the Lorenz method as modified by Find Poulsen (2), in 42 different samples of dry matter. The results agree very well and the colorimetric method is considerably faster.

Litteraturoversigt.

1. Arbejdsmetoder for kemiske undersøgelser 1941. Side 47.
2. *Poulsen, J. Find.* Om metoder til bestemmelse af kali, fosforsyre og kalk. Tidskr. f. Pl., 296. Beretn. 41. Bind, 1936 (459—486).
3. *Madsen, E. Rancke.* Analytisk Kemi 1940.
4. *Kitson, R. E. and Mellon, M. S.* Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadaphosphoric Acid. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 1944 (379—83).
5. *Misson, G.* Colorimetrische Phosphorbestimmung in Stahl. Chem. Ztg. B. 32, 1908, 633.
6. *Maksimova and Koglovsky, J. I.* anal. Chem. Russ. 2, 1947, 353.
7. *Murray, W. M. and Ashley, S. E. Q.* Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 10, (1938), 1.
8. *Willard, H. H. and Center, E. J.* Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 1941, 816.
9. *Koenig, R. A. and Johnson, C. R.* Ibid 14, 1942, 155.
10. *Rauterberg, E.* Eine colorimetrische Makromethode zur Phosphorsäurebestimmung, Zeitschrift für Pfl. B. 53, 1951 (149—155).
11. *Center, E. J. and Willard, H. H.* Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 1942, 287.