

Protokoll zur Übung Ionenchromatographie

im Rahmen des Praktikums
Instrumentelles und Bioanalytisches Laboran der TU Wien

Durchgeführt bei
Univ.Ass. Dipl.-Ing. Karin Kassin

Verfasser des Protokolls: **Gwendolin Korinek 0625083 & Daniel Bomze 0726183**

Versuche durchgeführt am 14.12.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen	3
1.1	Aufgabenstellung	3
1.2	Ionenchromatographie	3
1.2.1	Funktionsweise	3
1.2.2	Anwendungsgebiete	4
2	Praktischer Versuch	5
2.1	Benutzte Chemikalien und Geräte bzw. Parameter	5
2.2	Herstellung der Kalibrationslösungen	6
2.3	Probenvorbereitung	6
2.4	Durchführung	7
3	Auswertung	8
3.1	Bestimmung der Kalibrationsfunktionen	8
3.1.1	F-Test	12
3.1.2	T-Test	13
3.2	Bestimmung des Ionengehalts der Brunnenwasserprobe	13
3.3	Bestimmung der Trennstufenzahl	15
4	Fehlerbetrachtung	16
5	Zusammenfassung	17

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Aufgabenstellung

Aufgabe war es mittels Ionenchromatographie eine Trinkwasserprobe auf den Gehalt an folgenden Ionen zu bestimmen Sulfat (SO_4^{2-}), Nitrat (NO_3^-), Chlorid (Cl^-). Dazu wurden mittels Standards bekannter Konzentration eine Kalibrationsgerade erstellt und an Hand derer die Konzentration der Ionen im Wasser bestimmt. Zusätzlich wurde die Probe mit einem Referenzstandard, der zu Verfügung gestellt wurde, gemessen. Das Wasser entstammt einem (Trink)wasserbrunnen aus dem Marchfeld. Weiters sollte die selbst erstellte Kalibration mit der Referenzkalibration verglichen werden.

1.2 Ionenchromatographie

1.2.1 Funktionsweise

Die Analytlösung wird über ein Probenaufgabeventil aufgegeben und vom Eluenten zu einer Vorsäule transportiert, diese soll die eigentliche Trennsäule vor Verunreinigungen schützen. In weiterer Folge gelangt der Analyt dann in die Trennsäule wo die Analytmoleküle mit den geladenen Gruppen der Säulenoberfläche in Wechselwirkung treten. Hierbei konkurrieren mobile und stationäre Phase um die Wechselwirkung mit dem Analyten. Je nach Ladung und Ionengröße ist Retention durch die Säule für das Ion stärker oder schwächer. Dem entsprechend ist die Retention für größere Ionen oder Ionen mit höherer Ladung größer. Die vom Eluenten von der Säule eluierten Analyt-Ionen gelangen anschließend in den sog. *Supressor*. Dieser funktioniert als Ionentauscher und soll die Grundleitfähigkeit des Eluenten erniedrigen und die Leitfähigkeit des Analyten erhöhen. Dazu wird der sog. *Regenerent* im Gegenstrom über einer semipermeablen Membran zum Analytstrom geleitet. Dadurch, dass die Membran nur von H^+ -Ionen durchdrungen werden kann, entsteht aus dem Analyten somit eine Säure und aus dem Eluenten Wasser und Kohlendioxid (bei der Verwendung von Natriumhydrogencarbonat-Lösung als Eluenten).

Nach diesem Schritt wird die Lösung in den Detektor gepumpt. Der Detektor ist ein Leitfähigkeitsdetektor. Bei bekanntem Strom und Spannung kann der *spezifische Widerstand* des Analyten berechnet werden und weiters hängt die Leitfähigkeit bei geringen Konzentrationen linear von der Ionenkonzentration ab. Somit lässt sich damit und mit einer entsprechenden Kalibration der Gehalt an Ionen im Analyten bestimmen.

1.2.2 Anwendungsgebiete

Anwendungsgebiete sind beispielhaft die Analytik von Lebensmittel, Wasser sowie Umweltproben. Auch in der medizinischen Analytik wird die Ionenchromatographie eingesetzt.

2 Praktischer Versuch

2.1 Benutzte Chemikalien und Geräte bzw. Parameter

- Natriumchlorid p.a.
- Natriumnitrat p.a.
- Natriumsulfat p.a.
- 2N Schwefelsäure
- Natriumcarbonat p.a.
- Natriumhydrogencarbonat p.a.
- Milli-Q-Wasser
- Referenz-Standard-Lösung (von Assistenten zu Verfügung gestellt)

Als Regenerent kam eine 72 mN Schwefelsäure zur Anwendung, als Eluent eine Lösung von 8 mM/L Natriumcarbonat und 1 mM/L Natriumhydrogencarbonat. Sämtliche Spül-, Verdünnungs- und Waschvorgänge wurden ausschließlich mit Milli-Q-Wasser durchgeführt um eine Kontamination durch Ionen zu vermeiden. Weiters wurde darauf geachtet, Verunreinigungen durch Kontakt mit den Fingern oder der Hand der Untersuchenden zu vermeiden, da dies zu starker Kontamination der Proben und Standards geführt hätte.

Gerät	ICS-90
Pumpe	DIONEX PEEK Einkolbenpumpe mit Pulsdämpfer
Probenaufgabe	Über ein 6-Wege-Ventil
Vorsäule	DIONEX AG 14A („Guard Column“)
Trennsäule	DIONEX AS 14A („Separation Column“)
Supressor	DIONEX AMMS III
Detektion	DIONEX DS5 Detection Stabilizer
Software	Chromleon

Tabelle 2.1: Benutzte Komponenten des ICS

Die Grundleitfähigkeit betrug $26,59 \mu S$, der Druck betrug 1684 psi (= 116 Bar) und der Durchfluss betrug $998 \mu L/min$ bzw gerundet 1 mL/min . Grundleitfähigkeit und Druck konnten an der Software abgelesen werden. Der Durchfluss wurde durch Auslitern mit einer 10 mL -Mensur bestimmt.

Die Probenaufgabemenge betrug stets $1 \mu L$.

2.2 Herstellung der Kalibrationslösungen

Es wurden eine Standardstammlösung mit einer Ionenkonzentration von 1000 mg/L der Ionen Nitrat, Sulfat und Chlorid hergestellt. Für die Herstellung der Standardstammlösung wurden folgende Chemikalien eingewogen und mit Milli-Q-Wasser in einem Messkolben auf 100 mL aufgefüllt

Chemikalie	Einwaage [mg]
Natriumchlorid p.a.	164,2
Natriumnitrat p.a.	136,3
Natriumsulfat p.a.	147,9

Tabelle 2.2: Einwaagen für die Standardstammlösung

Aus dieser Standardstammlösung wurden durch Verdünnen mit Milli-Q-Wasser 3 Standards mit folgenden Ionen-Konzentrationen hergestellt

Ion	Konzentration [mg/L]		
	Standard 1	Standard 2	Standard 3
Chlorid	0,5	1	1,5
Nitrat	0,5	2,5	1
Sulfat	0,5	2,5	1

Tabelle 2.3: (theoretische) Konzentrationen der hergestellten Standardlösungen

Da die Einwaagen nicht hundertprozentig den berechneten Einwaagen entsprachen musste die Konzentration der Standards bei der Berechnung berücksichtigt werden.

2.3 Probenvorbereitung

Da davon ausgegangen werden konnte, dass die gesuchten Anionen in der Brunnenwasserprobe in sehr hohen Konzentrationen vorliegen, wurde die Wasserprobe 1:100 mit Milli-Q-Wasser verdünnt und anschließend gut homogenisiert um Konzentrationsschwankungen möglichst zu vermeiden.

2.4 Durchführung

Insgesamt wurden 12 Messungen durchgeführt. Eine davon war eine *Blank*-Messung mittels Milli-Q-Wasser. Diese diente der Kontrolle der Sauberkeit des Systems. Außerdem wurde Milli-Q-Wasser über die Finger der Durchführenden gespült um aufzuzeigen wie leicht eine Kontamination mit Ionen bei diesem Verfahren passieren kann. Diese beiden Messungen wurden jedoch für die Auswertung nicht herangezogen. Außerdem wurden die drei Referenzstandards vermessen sowie die drei selbst hergestellten Standards. Die eigentliche Probe wurde vier mal gemessen.

Die jeweils zu analysierende Lösung wurde mit einer 10 mL Spritze aufgegeben wobei immer rund 1,5-2 mL in die Probenaufgabeschleife gespritzt wurden. Somit wurde eine Kontamination durch die vorhergehende Lösung verhindert. Nach der Aufgabe der Probelösung wurde die Messung gestartet, wobei die Spritze bis zum Ende der Messung auf dem Aufgabeadapter stecken gelassen wurde.

3 Auswertung

3.1 Bestimmung der Kalibrationsfunktionen

Wie bereits vorher erwähnt, mussten aus den tatsächlichen Einwaagen die tatsächlichen Konzentrationen der eigenen Standardlösungen berechnet werden. Tabelle 3.1 zeigt die tatsächlichen Konzentrationen der eigenen Standards.

Ion	Konzentration [mg/L]			
	Stammlsg.	Standard 1	Standard 2	Standard 3
Chlorid	996,420	0,498	0,996	1,495
Nitrat	994,165	0,497	2,485	0,994
Sulfat	1000,203	0,500	2,501	1,000

Tabelle 3.1: Konzentrationen der Ionen in den hergestellten Standardlösungen

Da die Einwaage nur auf eine Kommastelle genau vorgenommen werden konnte, wäre es sinnvoll, auch hier nur maximal eine Nachkommastelle anzugeben. Jedoch würden die angegebenen Werte dann exakt mit den vorgegebenen theoretisch gewünschten Konzentrationen übereinstimmen. Um die jeweiligen Abweichungen zu veranschaulichen, wurden daher mehr Nachkommastellen angegeben.

Unter Berücksichtigung der berechneten Konzentrationen aus Tabelle 3.1 und mittels der Peakflächen konnten nun die Kalibrationsfunktionen für die eigenen Standards erstellt werden. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass ein erhaltenes Bestimmtheitsmaß von 1 nicht sinnvoll ist, dieser Wert aber dennoch in den folgenden Darstellungen der Kalibrationsfunktionen angegeben wird. Der Wert von 1 lässt sich dadurch erklären, dass die Abweichung sehr gering ist und erst nach der vierten Kommastelle auftritt. Der Übersichtlichkeit halber wurden jedoch nur Abweichungen bis zur vierten Kommastelle in den folgenden Diagrammen dargestellt. Ein möglicher Grund für das hohe Bestimmtheitsmaß ist die Tatsache, dass jeweils nur drei Punkte zur Erstellung der Kalibrationsgeraden verwendet wurden. Eine höhere Anzahl von Messpunkten hätte sicher eine Verschlechterung des Bestimmtheitsmaßes zur Folge. Die Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 zeigen die mittels eigener Standards erstellten Kalibrationsfunktionen.

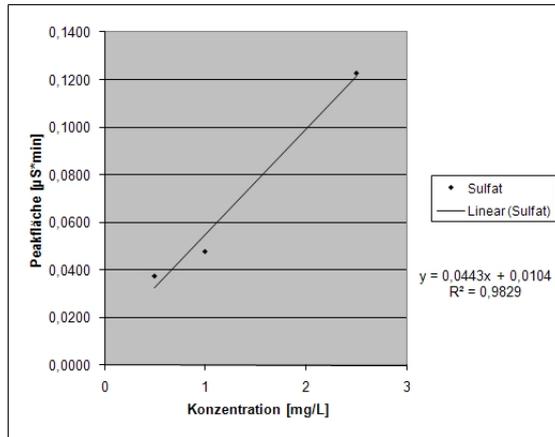


Abbildung 3.1: Kalibrationsgerade des hergestellten Sulfat-Standards

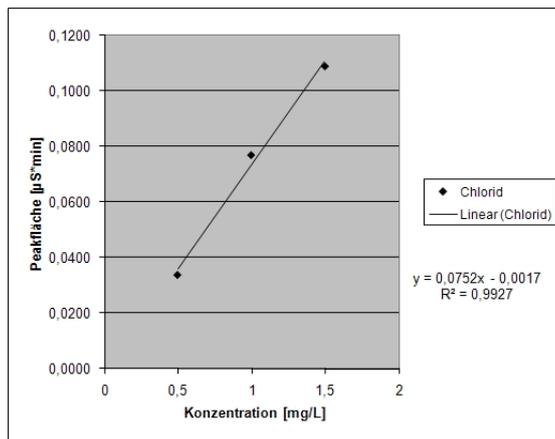


Abbildung 3.2: Kalibrationsgerade des hergestellten Chlorid-Standards

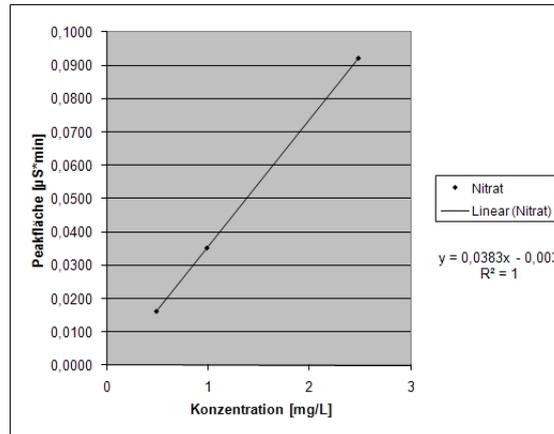


Abbildung 3.3: Kalibrationsgerade des hergestellten Nitrat-Standards

Es wird ersichtlich, dass der beobachtete Zusammenhang zwischen Messsignal und Konzentration der Ionen in der Probe, in diesem Konzentrationsbereich, sehr gut linear übereinstimmt.

Zusätzlich zu den mittels eigener Standards erstellten Kalibrationsfunktionen wurden auch drei Kalibrationsfunktionen mittels Referenzstandards bekannter Konzentration erstellt. Tabelle 3.2 zeigt die Konzentrationen der Ionen Chlorid, Nitrat und Sulfat der Referenz-Standards.

Ion	Konzentration der Ionen[mg/L]		
	Standard 1	Standard 2	Standard 3
Chlorid	0,6	1	3
Nitrat	0,6	3	7
Sulfat	0,6	3	7

Tabelle 3.2: Konzentration der Ionen in den Referenzstandards

Die Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen die Kalibrationsgeraden der Referenzstandards.

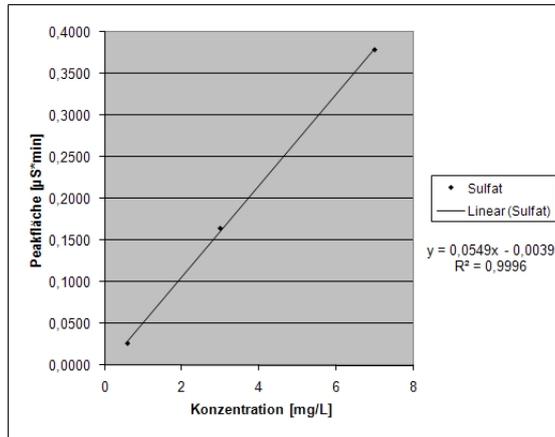


Abbildung 3.4: Kalibrationsgerade des Referenz-Sulfat-Standards

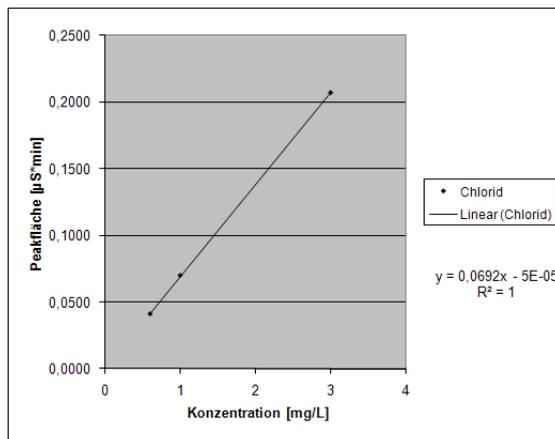


Abbildung 3.5: Kalibrationsgerade des Referenz-Chlorid-Standards

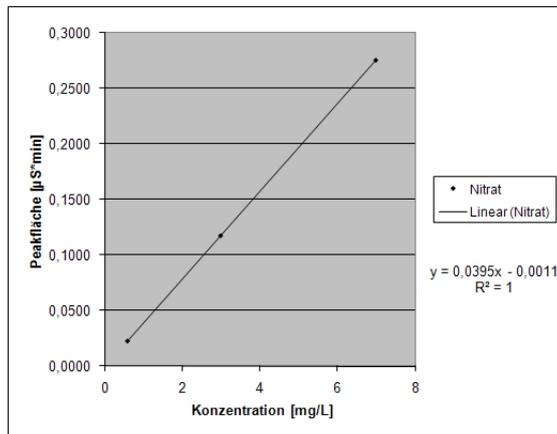


Abbildung 3.6: Kalibrationsgerade des Referenz-Nitrat-Standards

Auch hier zeigt sich eine sehr gute lineare Übereinstimmung zwischen Messsignal und Konzentration im untersuchten Konzentrationsbereich. Zu beachten ist, dass die Kalibrationsfunktionen der Referenzstandards über einen größeren Konzentrationsbereich erstellt wurden, während jene der eigenen Standards gezielt in jenem Konzentrationsbereich erstellt wurde, in dem sich die Konzentration der unbekannt Probe befand. Für alle drei Messreihen, die jeweils mit eigenem Standard und Referenzstandard ausgewertet wurden, wurde ein t-Test sowie ein F-Test durchgeführt.

3.1.1 F-Test

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Dabei steht s_i^2 für die Varianzen der jeweiligen Messreihen. Die Nullhypothese lautet $H_0 : s_1 = s_2$. Sie wird abgelehnt, falls $F > F_{\frac{\alpha}{2}}$. α wurde mit 5% gewählt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Ion	F	$F_{\frac{\alpha}{2}}$
Chlorid	1,1809282	< 9,277
Nitrat	1,06364485	< 9,277
Sulfat	1,5358091	< 9,277

Tabelle 3.3: Ergebnisse der F-Test Berechnungen zwischen hergestelltem und Referenzstandard

Da alle F-Werte unter dem tabellierten Wert liegen, kann angenommen werden, dass sich die Varianzen der Regressionen nicht signifikant unterscheiden.

3.1.2 T-Test

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Dabei steht $\bar{x}_{1,2}$ für die Mittelwerte, s_d^2 für die gewichtete Varianz und $n_{1,2}$ für die Anzahl der Messungen. Die Nullhypothese lautet $H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$. Die Nullhypothese muss abgelehnt werden, wenn $t > t_{\frac{\alpha}{2}}$. α wurde mit 5% gewählt. Dabei wurden beim T-Test folgende Ergebnisse erhalten:

Ion	t	$t_{\frac{\alpha}{2}}$
Chlorid	2,87440782	> 2,447
Nitrat	2,67121156	> 2,447
Sulfat	1,20740868	< 2,447

Tabelle 3.4: Ergebnisse der T-Test Berechnungen zwischen hergestelltem und Referenzstandard

Nur die Mittelwerte für die Sulfat-Werte sind nicht signifikant verschieden. Die Mittelwerte für Chlorid und Nitrat unterscheiden sich voneinander jedoch signifikant. Daher wurde die Probe in weiterer Folge sowohl mit den Referenzkalibrationsfunktionen als auch mit den Kalibrationsfunktionen der eigenen Standards ausgewertet.

3.2 Bestimmung des Ionengehalts der Brunnenwasserprobe

Die Brunnenprobe konnte nun mittels der erstellten Kalibrationsfunktionen ausgewertet werden. Aus den vier Messungen wurde der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die relative Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert (RSD) bestimmt.

	Konzentration der Ionen [mg/L]		
	Chlorid	Nitrat	Sulfat
	Eigener Standard		
Mittelwert	61,7	67,3	99,9
Standardabweichung	1,4	3,7	8,7
RSD	2,3	5,5	8,7
	Referenzstandard		
Mittelwert	64,7	60,4	106,6
Standardabweichung	1,5	3,6	7
RSD	2,3	5,9	6,6

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Brunnenwasseruntersuchung mit dem Referenzstandard und dem hergestellten Standard

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Messungen sind gut reproduzierbar, die höchste relative Standardabweichung (Sulfat mittels eigenen Standards) liegt unter 10%. Die Abweichungen der Messergebnisse zueinander betragen für Chlorid 4,6%, für Nitrat 10,2 % und für Sulfat 6,3%. Diese Abweichungen sind durchaus akzeptabel. Da es sich um Konzentrationen im mg/L-Bereich handelt, also sehr niedrige Konzentrationen, sind die beobachteten Abweichungen vertretbar. Probleme könnten aber dann auftreten, wenn die Konzentration der untersuchten Probe genau im Bereich der erlaubten Grenzwerte liegt und zuverlässig bestimmt werden soll, ob der Grenzwert überschritten wurde oder nicht.

In der untersuchten Brunnenprobe wurde eine erhöhte Nitratkonzentration gefunden, während die Werte für Sulfat und Chlorid die österreichischen Qualitätskriterien für Trinkwasser erfüllen würden, der Grenzwert hier also nicht überschritten wurde. Die Grenzkonzentrationen für Trinkwasser sind den ermittelten Ergebnissen in Tabelle 3.6 gegenübergestellt.

	Konzentration [mg/L]		
	Chlorid	Nitrat	Sulfat
Grenzwerte	200	50	250
ermittelte Werte	61,7 ± 1,4	67,3 ± 3,7	99,9 ± 8,7

Tabelle 3.6: Vergleich der gesetzlichen Grenzwerte für Trinkwasser in Österreich und der ermittelten Werte der Brunnenwasserprobe

Für den Vergleich der Werte wurden die Ergebnisse aus der Bestimmung mit eigenen Standards gewählt, da sich die zugehörigen Kalibrationsfunktionen über einen kleineren Konzentrationsbereich erstrecken und die Konzentrationen der untersuchten Probe somit

genauer bestimmt werden können.

Der über der Grenzkonzentration liegende Nitratwert ist fett hervorgehoben. Ein Wert von $67,3 \pm 3,7$ mg/L entspricht einer Überschreitung des zulässigen Grenzwertes um knapp 35%.

3.3 Bestimmung der Trennstufenzahl

Aus den Retentionszeiten und den Peakbreiten in halber Höhe sollte weiters noch die Trennstufenzahl des Systems berechnet werden. Diese ergibt sich aus folgender Formel

$$N_i = 5,54 * \left(\frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

Die Trennstufenzahl ist von der Säule, den Trennbedingungen sowie der aufzutrennenden Substanz abhängig. Sie gilt als Maß für die Bandenverbreiterung, die durch das Trennsystem entsteht.

	Chlorid	Nitrat	Sulfat
N_i	5199	5620	7144
Stdabw.	135	242	258

Tabelle 3.7: Trennstufenzahlen der der Säule bezogen auf die untersuchten Analyten

Aus Tabelle 3.7 kann gelesen werden dass die Trennstufenzahl des Systems mit fortschreitender Elution ansteigt. Da es im Laufe einer chromatographischen Trennung immer mehr zur Bandenverbreiterung kommt, ist dieser Trend plausibel.

4 Fehlerbetrachtung

Interessant wäre, worauf das Nichtbestehen des t-Tests zurückzuführen ist. Hier sind verschiedene Fehlerquellen zu nennen.

Der Hauptfehler besteht vermutlich darin, dass für die Probenaufgabe jedes Mal dasselbe Becherglas und dieselbe Spritze verwendet wurden. Während durch mehrmaliges Auswaschen mit Milli-Q-Wasser versucht wurde, die Spritze sowie das Becherglas möglichst gut zu reinigen, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass etwaige Verunreinigungen nicht entfernt werden konnten und somit zu einer Verfälschung des Messergebnisses geführt haben.

Als weitere Fehlerquelle ist der Wägefehler zu nennen. Dieser wird auf $\pm 0,1$ mg geschätzt.

Der Pipettierfehler dürfte sich nicht maßgeblich auf das Messergebnis auswirken, da dieser bei relativ großen Volumina sehr gering ist.

Eine potentielle Fehlerquelle konnte dadurch eliminiert werden, dass die Spritze für die Aufgabe der Probe während der ganzen Messung auf dem Aufgabeventil stecken gelassen wurde. Wäre die Spritze während einer Messung entfernt worden, so hätte dies zu einem Fehler im Messergebnis führen können.

Wie man an der „Finger“-Messung sehen konnte, die mit Milli-Q-Wasser, das über die Fingerkuppen gespült worden war, durchgeführt wurde, wirkten sich Berührungen mit den Fingern stark auf die Messergebnisse aus. Es wurde darauf geachtet, sauber zu arbeiten, jedoch kann auch dieser Einfluss nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Kontaminationen durch das für die Standards und Referenzstandards sowie alle Probenvorbereitungsschritte verwendete Wasser können ausgeschlossen werden, da es sich beim verwendeten Milli-Q-Wasser um hochreines Wasser handelt.

5 Zusammenfassung

Tabelle 5.1 listet die zusammengefassten Ergebnisse der Untersuchung der Brunnenwasserprobe aus dem Marchfeld auf.

	Chlorid		Nitrat		Sulfat	
	Eigen	Referenz	Eigen	Referenz	Eigen	Referenz
Konz. [mg/L]	61,7 ± 1,4	64,7 ± 1,5	67,3 ± 3,7	60,4 ± 3,6	99,9 ± 8,7	106,6 ± 7,0
RSD [%]	2,3	2,3	5,5	5,9	8,7	6,6
Max ¹ [mg/L]	200	200	50	50	250	250
N_i []	5199 ± 135		5620 ± 242		7144 ± 258	

Tabelle 5.1: Zusammengefasste Ergebnisse der Untersuchung der Brunnenwasserprobe

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in der Brunnenwasserprobe mit beiden Standards (Referenz + hergestellt) eine erhöhte Nitratkonzentration gefunden wurde, die Grenzwerte für Sulfat und Chlorid jedoch nicht überschritten wurden. Während das analysierte Wasser daher zwar keine Trinkqualität mehr aufweist, kann es dennoch als Nutzwasser verwendet werden. Die Nitratbelastung im Brunnenwasser dürfte auf die starke landwirtschaftliche Nutzung und damit einhergehende Düngung des Bodens im Raum Marchfeld zurückzuführen sein. Da der gefundene Nitratwert zwar ein Drittel über dem gesetzlichen Grenzwert liegt, die Absolutkonzentrationen jedoch gering sind, wäre eine Verwendung des Brunnenwassers als Trinkwasser in Notfällen gesundheitlich vermutlich nicht allzu bedenklich. Die Reproduzierbarkeit der Messmethode ist relativ gut. Die IC eignet sich sehr gut als Analysemethode für Wasserproben, auch dank der raschen Durchführung.

¹Max entspricht dem maximal zulässigen Grenzwert für die angeg. Ionen laut der derzeit in Österreich gültigen Trinkwasserverordnung Anlage 1, Quelle: <http://www.ris.bka.gv.at>