

## Kapitel 5: Analytik

### Ziel:

In diesem Kapitel kommen sie in Kontakt mit Analytik anhand quantitativer Nitritbestimmung. Nitrit ist in vielen analytischen Untersuchungen Gegenstand von Interesse. Wir denken unter anderem an Bodenproben im Zusammenhang von Düngung, an Trinkwasserqualität, an Urinproben in Zusammenhang von Stoffwechsel und an Hydrolyseprodukte von Abgasen im Regenwasser. Sie lernen *das prinzipielle Vorgehen* kennen: Methodenwahl – Eichkurvenerstellung – Probennahme – Probenaufbereitung – Messung – kritische Auswertung.

### Lerninhalte:

- sauberes arbeiten
- Evaluation von Daten und Methoden

### Einführung:

Das Hauptaugenmerk in den folgenden Versuchen gilt der Methode. Wie werden analytische Daten erlangt? Oft gibt es verschiedene chemische Wege ans Ziel zu kommen, das Hauptproblem ist es, reproduzierbare, vergleichbare und verlässliche Werte zu erreichen. Ein besonderes Augenmerk gilt der Probennahme und -aufbereitung: Es muss sichergestellt werden, dass weder während der Probenahme noch während der Aufbewahrung und Aufbereitung physikalische, chemische oder biologische Prozesse stattfinden, die die Messung irgendwie verfälschen könnten. Dies würde zu schwer entdeckbaren, systematischen Fehlern führen.

Für die Analyse gilt generell, dass unabhängige Referenzmessungen benötigt werden. Dazu macht man eine „Eichkurve“. Mit der gewählten Methode werden genau bekannte Proben vermessen, die den gesamten durch die *Probe* zu erwartenden bzw. durch die *Methode* limitiert sinnvollen Messbereich abdecken. Für die unbekannte Probe kann der Messwert durch geschickte Interpolation bestimmt werden.

## 1. Experimentserie: „Griess“-Methode (Derivatisierung zum Azofarbstoff)

### a) Anleitung aus dem Analytik-Lehrbuch

Quelle: Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis, 5<sup>th</sup> edition  
1989, Longman Scientific & Technical, GB-Harlow

#### **17.38 Nitrite.**

**Discussion:** General procedures for the determination of nitrites are usually based upon some form of diazotisation reaction, often involving carcinogenic materials such as the naphthylamines. In the following method these compounds are avoided.

In this case the nitrite ion, under acidic conditions, causes diazotisation of sulphanilamide (4-aminobenzenesulphonamide) to occur, and the product is coupled with N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride.

**Reagents:** Sulphanilamide solution (A). Dissolve 0.5 g sulphanilamide in 100 ml of 20 per cent v/v hydrochloric acid.

N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride solution (B). Dissolve 0.3 g of the solid reagent in 100 ml of 1 per cent v/v hydrochloric acid.

**Procedure:** To 10 ml of the neutral sample solution (containing not more than 0.4 mg nitrite) add 0.2 ml of solution A and, after 5 minutes, 0.2 ml of solution B. The pH at this point should be about 1.5. Measure the absorbance after 10 minutes in the wavelength region of 550 nm (yellow-green filter) in a spectrophotometer against a blank solution prepared in the same manner. Calculate the concentration of the nitrite from a calibration plot prepared from a series of standard nitrite solutions.

Zum chemischen Verständnis: Nitrit wird als limitierende Komponente bei einer Synthese eines Farbstoffs verwendet. Letzterer wird dann vermessen. Der entstehende „Azofarbstoff“ hat viele Strukturverwandte bei heute üblichen

Baumwollfarbstoffen. Die Ausbeute der Reaktion ist abhängig von der Reaktionsführung. Stellen Sie sicher, dass alle Nitritlösungen während der Reagenzienzugabe mit dem Magnetrührer gerührt werden (ohne Spritzer) und dass Sie die Reaktion immer gleich durchführen (Wartezeiten, Temperatur,...).

**b) Lösungen A und B werden vom Assistenten vorbereitet.**

**c) Jeder Arbeitsschritt muss im Laborjournal sauber dokumentiert werden.**

**d) Herstellung von Eichreihe:**

Es ist unerlässlich, sauber zu arbeiten und unnötige Kontaminationen der Chemikalien, Proben und Standards zu vermeiden. Chemikalien, insbesondere auch Wasser müssen in der höchsten verfügbaren Qualität verwendet werden. Nehmen Sie deionisiertes oder besser Milli-Q- bzw. Nanopur bzw. destilliertes Wasser. Überschüssige Chemikalien dürfen keinesfalls in den Chemikalienbehälter zurückgeschüttet werden. Es dürfen nur saubere Glaswaren bzw Spatel zum abwägen verwendet werden. Alle verwendeten Pipetten müssen ebenfalls sauber sein. Es werden zwei Nitritstammlösungen (je 1 l) mit einer Nitritkonzentration von je ca. 100 mg Nitrit pro Liter hergestellt. Es müssen zwei unabhängige Einwaagen gemacht werden, um ggf. Wägefehler entdecken zu können. Anschliessend werden durch Verdünnung je 100 ml Lösungen mit "0", 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4 und 8 mg / l Nitrit hergestellt. Berechnen Sie die Konzentrationen auch in mol / l. Die Lösungen werden gemäss Vorschrift zum Azofarbstoff umgesetzt.

**e) Probennahme**

- Bodenprobe: Die Bodenprobe muss frisch sein. Bakterielle Prozesse in der Probe können den Messwert verfälschen! Eine bekannte Menge (Wägen, z.B. 50 g) Erde werden in 150 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wird durch ein Papierfilter abfiltriert. Mit einer Plasikspritze wird diese Lösung durch ein Partikelfilter (0.45  $\mu\text{m}$ ) gepresst.
- Flusswasser/Mineralwasser: ca 150 ml werden mit Partikelfilter (0.45  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Flusswasser sollte möglichst frisch sein.

**f) Grobanalyse einer Probe (Stäbchen)**

Testen Sie den Nitritgehalt mit Teststäbchen (Merckoquant)

### g) Visuelle Analyse

Falls die Konzentration der Probe gemäss Grobanalyse grösser oder gleich 4 mg / l ist, wird die Probe verdünnt (z.B. 10 mal, dokumentieren!).

Die Proben werden genommen und gemäss Analytikhandbuch zum Azofarbstoff umgesetzt.

Nehmen Sie nun zwei gleiche zylindrische Gefässe und stellen sie sie auf ein weisses Blatt. Giessen Sie in das eine ca 10 ml Ihrer Probe. Giessen sie nun in das zweite soviel einer farblich ähnlichen Eichlösung (aus d), bis von oben betrachtet, beide Zylinder den gleichen Farbeindruck vermitteln. Messen sie nun mit einem Massstab die Füllhöhe beider Lösungen.

Die Farbsättigung bei „verdünnten Lösungen“ ist sowohl proportional zur Konzentration des Farbstoffs als auch zur Schichtdicke (Lambert-Beersches Gesetz):

$$\text{Abs}(\lambda) = \sum(\varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot l)$$

Abs: „Absorbanz“, Mass für die Farbsättigung

$\varepsilon_i$ : „Extinktionskoeffizient“, eine Stoffkonstante

$c_i$ : Konzentration von i

l: Schichtdicke, „optische Pfadlänge“

Da bei gleicher Farbsättigung und nur einem Farbstoff  $c \cdot l$  konstant sind gilt:

$$c_1/c_2 = l_2/l_1$$

Da alle Schichtdicken und die Nitritkonzentration der Eichlösung bekannt sind, lässt sich die Nitritkonzentration in der Messlösung und daraus jene in der (Boden-)Probe bestimmen. Schätzen Sie den Fehler ab, indem Sie überprüfen, wie empfindlich Ihr Auge auf eine Änderung der Schichtdicke reagiert. Schätzen sie auch die Fehler durch Einwaage und Verdünnung ab.

### h) Spektrophotometrische Analyse

Die gleiche Messung kann mit einem „Spektrophotometer“ durchgeführt werden. Wir werden dieses Gerät für den Versuch als „black box“ behandeln, da die Theorie über den Vorlesungsstoff hinausgeht. Wichtig für das Verständnis ist, dass eine wellenlängenabhängige Absorbanzmessung durchgeführt wird. In heute üblichen Zweistrahngeräten wird die Absorbanz in Beziehung zu einer Referenz („Nullwert“) bestimmt. Der Assistent hat die Bedienung der Geräte (es sind verschiedene Typen

im Einsatz) zu erklären. Messen Sie nun die Spektren der Eichlösungen und der Probe zwischen 450 und 650 nm. Tragen sie Konzentration vs. Absorbanz der Eichlösungen an einer geeigneten Wellenlänge auf und bestimmen Sie eine geeignete Funktion  $F(\text{Absorbanz}) = \text{Konzentration}$ . Nun können Sie aus der Absorbanz der Messlösung die Nitritkonzentration bestimmen und daraus die Originalkonzentration in Ihrer Probe.

Für eine aussagekräftige Analyse müssen mindestens aus zwei Proben drei Messlösungen unabhängig umgesetzt und vermessen werden. Zwei Eichreihen aus zwei Einwaagen sind zu verwenden.

Versuchen Sie auch hier eine Fehlerabschätzung.

### **i) Schnelltest (Aquaquant)**

Verwenden Sie nun zu einer weiteren Analyse den Schnelltest. Gehen Sie gemäss Gebrauchsanleitung vor!

### **Aufgaben:**

- Beschreiben Sie die Mathematische Beziehung zwischen der Absorbanz einer Lösung und der Konzentration eines darin gelösten Farbstoffes
- Beschreiben Sie einem Satz die Idee der „Griess“-Methode

## 2. Experimentserie: Chromatographie (Ionenchromatographie)

### Chromatographie allgemein

Chromatographie ist zu einem der wichtigsten Analyseverfahren geworden. Die meisten heute käuflichen Geräte zeichnen sich durch einfache Handhabbarkeit und grosse Robustheit aus, was eine hohe Reproduzierbarkeit der Resultate begünstigt. Grundsätzliche Voraussetzung ist, dass verschiedene Inhaltsstoffe einer Probe bei bestimmten Bedingungen unterschiedliches Adsorptionsverhalten an Festkörpern besitzen. Die Probe wird einem Träger (Gas oder Flüssigkeit) zugegeben und von diesem mitgenommen. Wenn nun Träger und Probe durch den Festkörper („Säulenmaterial“) geleitet werden, werden die Inhaltsstoffe verschieden effizient zurückgehalten und so voneinander getrennt. Unter gleichen Bedingungen ist die Laufzeit zwischen Zugabe und Detektion immer konstant, die Laufzeit ist also (unter gegebenen Bedingungen) ein Charakteristikum eines bestimmten Inhaltsstoffes. Verschiedenste Detektoren werden eingesetzt: Absorptions- und Fluoreszenzspektrophotometer, Leitfähigkeitsdetektoren, Elektrochemische Zellen, Massenspektrometer.

### a) Experiment: Visualisierung des Prinzips

Schneiden Sie aus einem Löschblatt zwei rechteckige Streifen (5 x 10 cm) aus. Ziehen Sie an beiden Schmalseiten mit einem Lineal 1 cm vom Rand einen Bleistiftstrich. Nehmen Sie drei verschiedene Filzstifte (Schwarz, Grün, Rot) und machen Sie auf beiden Streifen auf einem Bleistiftstrich mit jeder Farbe einen Punkt. Tip: Verschiedene Studenten sollten Filzstifte verschiedener Hersteller verwenden!

Nehmen Sie nun zwei Bechergläser, die höher als 10 cm sind. In das eine schütten Sie 0.8 cm deionisiertes Wasser, ins andere 0.8 cm Ethanol. Stellen sie in jedes Glas ein Löschblatt mit Farbpunkten nach unten und warten Sie, bis das Laufmittel (Trägerflüssigkeit) die obere Bleistiftmarke erreicht. Nehmen Sie nun die Löschblätter aus den Gläsern. Beschreiben Sie Ihre eigenen Beobachtungen. Vergleichen Sie mit den Resultaten der anderen Studenten!

## **Ionenchromatographie**

Ionenchromatographie ist ein Standardwerkzeug in der Wasseranalytik. Meist werden Anionen untersucht. Als Säulenmaterial wird dann ein Anionentauscher verwendet. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um ein poröses Polymer, an das quaternäre Ammoniumionen gebunden sind. Da quaternäre Ammoniumionen positiv geladen sind, besteht eine elektrostatische Anziehung zwischen diesen und den negativ geladenen Anionen. Aufgrund des Elektroneutralitätsprinzips müssen immer Anionen die Ladung des Anionentauschers neutralisieren. Wenn nun eine Probe mit reinem Wasser auf die Säule gegeben würde, würden die enthaltenen Anionen die Anionen auf der Säule verdrängen (Massenwirkungsprinzip) und klebenbleiben, auch wenn mit viel reinem Wasser nachgespült würde. Das Elektroneutralitätsprinzip muss gewahrt bleiben. Deshalb werden dem Laufmittel geeignete Anionen in geeigneter Konzentration beigegeben, damit die Probe mit der Zeit wieder von der Säule heruntergewaschen wird. Aus diesem Grund hat sich auch die Bezeichnung „Eluent“ für das Laufmittel eingebürgert. Gemessen wird mit einem Leitfähigkeitsdetektor, der kleinste Leitfähigkeitsänderungen der Probe misst. Das Integral der Leitfähigkeitsänderung über die Zeit ist ein Maß für die Ionenmenge. Alle Ionen haben eine spezifische Leitfähigkeit. Um exakte Mengenbestimmungen durchführen zu können, müssen Eichmessungen für „Retentionszeit“ (Laufzeit) und Antwortsignal auf bestimmte Konzentrationen durchgeföhrt werden (siehe oben).

### **b) Erstellen einer Eichkurve für Nitrit**

- Assistent
  - Stellen Sie Eichlösungen her: 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$
  - Erstellen Sie Chromatogramme mit diesen Lösungen.
  - Werten Sie die Chromatogramme aus („korrekte“ Integration)
  - Drucken Sie die Chromatogramme mit der Integration aus
- Studierende
  - Prüfen Sie, in welchem Bereich sie symmetrische Peaks erhalten (Wenn die Peaks verzerrt sind, wurde die Säulenkapazität überschritten)

**c) Analysieren Sie Ihre Probe**

- Erstellen Sie ein Chromatogramm mit einer gemäss 1e) erstellten Probe und werten Sie sie aus! Kontrollieren sie die automatische Integration der Peaks – Intelligente Software kann einen intelligenten Benutzer niemals schlagen! Spekulieren Sie mit Hilfe des Handbuchs über zusätzliche Komponenten in Ihrer Probe.
- Berechnen Sie die Nitritkonzentration in ihrer Probe. Falls die Konzentration über den linearen Bereich hinausgeht, müssen Sie ihre Probe geeignet verdünnen und neu analysieren.

**3. Diskussion der Methoden und statistische Auswertung  
(Auswertungshalbtag)**

Vergleichen Sie die verschiedenen Methoden. Versuchen Sie für alle Methoden eine Fehlerabschätzung. Diskutieren Sie Stärken und Schwächen.