

7. EXTRAKČNÍ FOTOMETRIE

TEORIE

Rozdělování v soustavě kapalina – kapalina je proces, při němž se převádí rozpuštěná látka z jedné kapalné fáze do druhé. Obě fáze, zpravidla voda a organické rozpouštědlo, jsou navzájem nemísitelné, rozpuštěná složka z větší části přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná. Příčinou přechodu rozpuštěné složky z jedné fáze do druhé je její rozdílná rozpustnost v jednotlivých fázích.

Za předpokladu, že rozdělovaná látka se v obou fázích vyskytuje ve stejné formě, lze rovnovážný stav vyjádřit rozdělovací konstantou K_D :

$$K_D = \frac{c_{org}}{c_{aq}}$$

kde: K_D je rozdělovací konstanta (Nernstův rozdělovací koeficient),
 c_{org} je rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle,
 c_{aq} je rovnovážná látková koncentrace složky ve vodě.

Tato rovnice vyjadřuje **Nernstův rozdělovací zákon**, podle nějž je poměr aktivit extrahované složky ve dvou nemísitelných fázích při určité teplotě konstantní.

Jestliže se extrahovaná látka může vyskytovat v některé z obou fází v jiné formě (např. slabá organická kyselina RCOOH je v organické fázi jen jako nedisociovaná molekula RCOOH, zatímco ve vodné fázi v závislosti na pH může existovat i jako disociovaná forma RCOO⁻), pak rovnovážný stav vyjadřuje rozdělovací poměr D_c – poměr součtů koncentrací veškerých forem rozdělované látky ve dvou fázích:

$$D_c = \frac{c_{org,0}}{c_{aq,0}}$$

kde: D_c je rozdělovací poměr,
 $c_{org,0}$ je celková látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle,
 $c_{aq,0}$ je celková látková koncentrace složky ve vodě.

To umožní definovat rovnovážný stav při extrakci v závislosti na faktorech, ovlivňujících přítomnost různých forem extrahované látky v heterogenní soustavě. Např. pro extrahovanou organickou kyselinu RCOOH lze napsat:

$$D_c = \frac{[RCOOH]_{org}}{[RCOOH]_{aq} + [RCOO^-]_{aq}}$$

Po vyjádření závislosti existence formy RCOO⁻ na pH platí pro rozdělovací poměr:

$$D_c = \frac{K_D}{1 + \frac{1}{K_{HA}} [H^+]}, \quad \text{kde} \quad K_{HA} = \frac{[RCOO^-][H^+]}{[RCOOH]}$$

Cílem extrakce je vyextrahovat co nejvíce rozpuštěné složky s co nejmenší spotřebou rozpouštědla, proto volíme rozpouštědlo tak, aby v něm extrahovaná složka byla mnohem více rozpustná než v rozpouštědle, ze kterého ji extrahujeme. Účinnost jedné extrakce E vyjadřujeme jako procentový výtěžek extrakce:

$$E_1 = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (\%)$$
$$E_1 = \left(1 - \frac{m_1}{m_0}\right) \cdot 100 = \left(1 - \frac{V_{aq}}{V_{aq} + K_D V_{org}}\right) \cdot 100 = \frac{K_D}{\frac{V_{aq}}{V_{org}} + K_D} \cdot 100 \quad (\%)$$

Účinnost n opakovaných extrakcí:

$$E_n = \left[1 - \left(\frac{100 - E_1}{100}\right)^n\right] \cdot 100 \quad (\%)$$

Účinnost extrakce je potřeba posuzovat i z hlediska oddělení od ostatních složek v roztoku – hledisko selektivity, proto by měly mít ostatní složky rozdělovací poměry co nejmenší.

POSTUP PROVEDENÍ EXPERIMENTU:

Prakticky všechny fotometrické metody stanovení fosforu vyžadují převedení všech forem fosforu na orthofosforečnan, který jediný reaguje s činidly.

Nejpoužívanější metody jsou založeny na reakci orthofosforečnanu s molybdenanem v prostředí minerální kyseliny, kdy vzniká žlutě zbarvená kyselina molybdátofosforečná, vhodná k fotometrickému stanovení. Ke zvýšení citlivosti a k odstranění některých rušivých vlivů se používá extrakce kyseliny molybdátofosforečné do organických rozpouštědel. Jako rozpouštědla pro extrakci heteropolykyselin se používají ethery ketonů, aldehydů, esterů a alkoholů, tedy kyslíkatých rozpouštědel. V našem případě budeme stanovovat kyselinu fosforečnou jako kyselinu molybdátofosforečnou po extrakci do butanolu.

7.1. Příprava roztoků pro sestrojení kalibrační křivky – vodná fáze

Do 7 extrakčních zkumavek napipetovat 0 - 3,0 ml (po 0,5 ml) standardního roztoku kyseliny fosforečné, čistou pipetou doplnit destilovanou vodou na výsledný objem 5 ml a přidat 5 ml činidla - molybdenové soluce.

7.2. Úprava neznámého vzorku před extrakcí

Vzorek v 50 ml odměrné baňce doplnit po rysku destilovanou vodou, promíchat. Z odměrné baňky pipetovat do 6 extrakčních zkumavek po 3 ml roztoku, doplnit na 5 ml destilovanou vodou a přidat 5 ml činidla - molybdenové soluce.

7.3. Extrakce kalibračních roztoků a roztoku vzorku do n-butanolu, ustavení rovnováhy

Do extrakčních zkumavek se standardními roztoky a roztoky vzorku přidat pomocí automatického pístoventilového dávkovače, příp. pomocí dávkovacího kohoutu (špačku) 10 ml n-butanolu. Tyto operace provést pečlivě, přesnost výrazně ovlivňuje výsledek analýzy.

Extrakční zkumavky uzavřít dobře těsní

cími zátkami (skleněnými se zábrusem nebo polyethylenovými). Směsi třepat 3x po dobu 2 minut, s 5 minutovými přestávkami. Dalších 15 minut nechat extrakční zkumavky stát ve stojanu, až se zakalený roztok postupně vyčeří a je zřetelně vidět rozhraní mezi horní žlutou butanolovou fází a dolní bezbarvou vodnou fází.

7.4. Oddělení butanolové fáze od vodné a příprava ke spektrofotometrickému měření extraktu

Pomocí pipetovacího nástavce s nasazenou skleněnou pipetkou (příp. polyethylenovou pipetkou) nasát z každé extrakční zkumavky žlutě zbarvenou butanolovou fází do předem připravené **suché** centrifugační zkumavky. Dbát na to, aby se do centrifugační zkumavky nedostala vodná fáze!

! NIKDY nepipetovat organickou fází ústy, je to zdraví ŠKODLIVÉ !

Centrifugační zkumavky vložit do centrifugy (vždy sudý počet), dbát na to, aby zkumavky v protilehlých pozicích byly naplněny přibližně stejným množstvím roztoku. Centrifugovat po dobu 5 minut, až se organická fáze vyčeří a zbaví zákalu a bublinek. Zkontrolovat, zda jsou roztoky průhledné a čiré, případně centrifugování zopakovat. Zákal by způsobil zvýšení absorpce světla. Příčinou nesprávných výsledků v této úloze je obvykle nedbalé provádění těchto operací !!

7.5. Spektrofotometrické měření kalibračních roztoků a extraktů vzorku, sestrojení kalibrační křivky

U spektrofotometru VIS Helios Epsilon zvolit modrý filtr vlnové délky 400 nm a přístroj nastavit podle návodu na obsluhu. Ve skleněné kyvetě proměřit vzestupně barevné kalibrační extrakty a poté extrakty vzorku proti blanku (extrakt s nulovým obsahem H_3PO_4).

Vždy zkontrolovat, zda roztoky v kyvetě jsou čiré. Kyvetu před naplněním dalším butanolovým extraktem vždy 1–2 krát propláchnout malým objemem tohoto extraktu.

! Jakékoliv vniknutí i stop vodné fáze z centrifugační zkumavky do kyvety způsobí zákal a chybu výsledku !

7.6. Vyhodnocení a výpočet obsahu H_3PO_4 ve vzorku

Při výpočtu je třeba respektovat skutečnost, že veškeré látkové množství H_3PO_4 napipetované původně do vodné fáze přejde při předpokládané kvantitativní reakci do organické fáze, jejíž objem podle alternativního zadání úlohy nemusí být totožný s objemem výchozí vodné fáze. Proto je u extrakcí nejvýhodnějším způsobem vyhodnocení (jak kalibrační závislosti, tak i obsahu analytu ve vzorku) postup vycházející ze vztahu mezi látkovým množstvím stanovované látky v organické fázi a naměřenými absorbancemi s přihlédnutím ke zředňovacím operacím při zpracování vzorku.

Sestrojit tabulku 7.1 pro kalibrační závislost:

Tab. 7.1: Data pro kalibrační závislost

V_{pip} standardu 0,001 M H_3PO_4	$n(H_3PO_4)$ v pipetovaném objemu	$m(H_3PO_4)$ v pipetovaném objemu	absorbance A při 400 nm v 1 cm kyvetě	poměrný koeficient $A / n(H_3PO_4)$
[ml]	[mmol]	[μ g]		
0	0	0	0	0
0,5				
1				
1,5				
2				
2,5				
3				

Sestrojit kalibrační křivku vynesáním závislosti $A = f [n(H_3PO_4)]$

kde: $n(H_3PO_4)$ je látkové množství kyseliny fosforečné v mmol.

Do tabulky 7.2 uvést schéma postupu při zpracování vzorku, naměřené hodnoty absorbancí u 6 extraktů z alikvotů vzorku a vypočítat odpovídající hodnoty pro $n(H_3PO_4)$ a $m(H_3PO_4)$

Tab. 7.2: Data pro vzorek

V_{pip} z roztoku vzorku do extrakčních zkumavek P_i	absorbance naměřená pro extrakt A_i	$n_{ex}(H_3PO_4)$ v extraktu	$n_{pip}(H_3PO_4)$ v pipetovaném objemu vzorku	$n_o(H_3PO_4)$ v celém objemu vzorku	$m_i(H_3PO_4)$ v celém objemu vzorku
[ml]		[mmol]	[mmol]	[mmol]	[mg]
3					
3					
3					
3					
3					
3					

Vzorek byl naředěn na objem Z ml.

Výpočet vychází z logické úvahy, že z naměřených hodnot absorbancí získáme grafickým vyhodnocením pomocí kalibrační křivky odpovídající látková množství $n_{ex}(H_3PO_4)$, která byla do extrakčních zkumavek vpravena v pipetovaných objemech vzorku.

Z poměru objemu pipetovaného alikvotního podílu vzorku P_n a celkového objemu vzorku Z vypočteme obsah H_3PO_4 v celém vzorku, vyjádřený v mmol (n_0) a v mg (m_i):

n_{ex} - odečíst z kalibrační křivky,

$$n_{pip} = n_{ex}$$

$$n_0 = \frac{n_{ex}}{P_i} \cdot Z$$

$$m_n = n_0 \cdot M(H_3PO_4)$$

7.7. Statistické vyhodnocení analýzy

Pro statistické testování výsledků analýzy použít matematicko-statistického postupu dle **Dean-Dixona**, který se používá pro zpracování malých souborů paralelních výsledků, jež jsou obvykle k dispozici při analýzách praktických vzorků.

1. Výsledky m_i seřadit podle rostoucí velikosti.
2. Vypočítat rozpětí souboru $R = m_6 - m_1$
3. Zjistit, zda některý z výsledků m_i není zatížen hrubou chybou, tj. zda se statisticky významně s určitou pravděpodobností neliší od ostatních paralelních výsledků stanovení. Použít Q-testu, vypočítat hodnoty Q_6 a Q_1 dle rovnic:

$$Q_6 = \frac{m_6 - m_5}{R}$$

$$Q_1 = \frac{m_2 - m_1}{R}$$

Porovnat je s kritickou hodnotou $Q(6; 0,05)$ z tabulky statistických konstant (tab. 7.3).

4. Je-li Q_6 nebo Q_1 větší než $Q(6; 0,05)$, znamená to, že příslušná hodnota je zatížena hrubou chybou a musí být ze souboru vyřazena.
5. Vypočítat průměrnou hodnotu m_x jako hodnotu nejbližší správnému výsledku

$$m_x = \frac{\sum m_i}{i}$$

kde: i je 6 (počet stanovení)

6. Vyhodnotit míru přesnosti stanovení - vypočítat směrodatnou odchylku s podle Dean-Dixona z rozpětí R s pomocí tabelované konstanty k_i , která je pro daný počet paralelních stanovení i uvedena v tabulce statistických konstant (tab. 7.3)

$$s = R \cdot k_i$$

7. Přesnost měření dále charakterizovat směrodatnou odchylkou průměru s_x

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{i}} = \frac{R \cdot k_i}{\sqrt{i}}$$

8. Protože se směrodatná odchylka vztahuje k určitému definovanému provedení analýzy a obvykle závisí i na obsahu stanovované složky, vyjadřuje se přesnost ve vztahu ke stanovovanému množství jako relativní směrodatná odchylka s_r

$$s_r [\%] = \frac{s}{m_x} \cdot 100$$

9. Jako výsledek analýzy definovat interval (v jednotkách výsledku), v němž s danou

pravděpodobností leží správný výsledek. Jde o definici intervalu spolehlivosti, s použitím Dean-Dixonova postupu vypočítat interval spolehlivosti z rozpětí dosazením do vztahu, který určuje horní a dolní mez tohoto intervalu

$$m_x \pm K_i \cdot R$$

Konstantu K_i odečtíš z tabulky statistických konstant (tab. III) pro daný počet stanovení.

Tab. 7.3: Statistické konstanty dle Dean-Dixona (pro $\alpha = 0,05$)

počet měření i	k_i	$\frac{1}{\sqrt{i}}$	K_i	Q
2	0,086	0,71	6,4	
3	0,591	0,58	1,3	0,941
4	0,486	0,50	0,72	0,765
5	0,430	0,45	0,51	0,642
6	0,395	0,41	0,40	0,560
7	0,370	0,38	0,33	0,507
8	0,351	0,35	0,29	

7.8. Vyhodnocení extrakční fotometrie

Při vyhodnocení extrakční fotometrie v protokolu do závěru uvést:

1. Sestrojit graf kalibrační závislosti $A = f [n(\text{H}_3\text{PO}_4)]$.
2. Uvést hodnoty nalezených množství H_3PO_4 a vyplněné tabulky 7.1. a 7.2.
3. Provést statistické vyhodnocení extrakční fotometrie, všechny statistické parametry uvést do protokolu.
4. Zdůvodnit příčiny možného chybného stanovení.

