# 7. E X T R A K Č N Í F O T O M E T R I E

**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 jedná 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 KD:

kde: *KD* je rozdělovací konstanta (Nernstův rozdělovací koeficient),

*corg* je rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle,

*caq* 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 Dc – poměr součtů koncentrací veškerých forem rozdělované látky ve dvou fázích:

kde: *Dc* je rozdělovací poměr,

 *corg,0*  je celková látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle,

 *caq,0* je celková látková koncentrace složky ve vodě.

To umožňuje 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 napsát:

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

 , kde

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:

Účinnost n opakovaných extrakcí:

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 fázi do předem připravené **suché** centrifugační zkumavky. Dbát na to, aby se do centrifugační zkumavky nedostala vodné fáze!

***! NIKDY nepipetovat organickou fázi 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 H3PO4).

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 H3PO4 ve vzorku**

Při výpočtu je třeba respektovat skutečnost, že veškeré látkové množství H3PO4 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 zřeďovacím operacím při zpracování vzorku.

Sestrojit tabulku 7.1 pro kalibrační závislost:

*Tab. 7.1: Data pro kalibrační závislost*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Vpipstandardu 0,001 M H3PO4 | n(H3PO4)v pipetovaném objemu | m(H3PO4)v pipetovaném objemu | absorbance A při 400 nmv 1 cm kyvetě  | poměrný koeficient A / n(H3PO4) |
| [ml] | [mmol] | [μg] |  |  |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,5 |  |  |  |  |
| 1 |  |  |  |  |
| 1,5 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 2,5 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |

Sestrojit kalibrační křivku vynesením závislosti A = f [n(H3PO4)]

*kde:* n(H3PO4) 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(H3PO4) a m(H3PO4)

*Tab. 7.2: Data pro vzorek*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Vpip z roztoku vzorku do extrakčních zkumavekPi | absorbance naměřená pro extrakt Ai | nex(H3PO4) v extraktu | npip(H3PO4) v pipetovaném objemu vzorku | no(H3PO4) v celém objemu vzorku | mi(H3PO4) 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 nex(H3PO4), která byla do extrakčních zkumavek vpravena v pipetovaných objemech vzorku.

Z poměru objemu pipetovaného alikvotního podílu vzorku Pn a celkového objemu vzorku Z vypočteme obsah H3PO4 v celém vzorku, vyjádřený v mmol (n0) a v mg (mi):

 - odečíst z kalibrační křivky,







**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 mi seřadit podle rostoucí velikosti.

2. Vypočítat rozpětí souboru 

3. Zjistit, zda některý z výsledků mi není zatížen hrubou chybou, tj. zda se statisticky významně s určitou pravděpodobností neliší od ostatních paralelních výsledků stanovení. Použít Q-testu, vypočítat hodnoty Q6 a Q1 dle rovnic:

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

4. Je-li Q6 nebo Q1 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 mx jako hodnotu nejbližší správnému výsledku

*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 ki, která je pro daný počet paralelních stanovení i uvedena v tabulce statistických konstant (tab. 7.3)

1. Přesnost měření dále charakterizovat směrodatnou odchylkou průměru sx

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 sr

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

Konstantu Ki odečtíst z tabulky statistických konstant (tab. III) pro daný počet stanovení.

*Tab. 7.3: Statistické konstanty dle Dean-Dixona (pro α = 0,05)*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| počet měřeníi | ki |  | Ki | 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 závisloti A = f [n(H3PO4)].**
2. **Uvést hodnoty nalezených množství H3PO4 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.**