

## Extrakce na pevné fázi

(Ex)

Vyskytuje-li se ve vzorku analyt o koncentraci nižší než je jeho limit stanovení příslušnou analytickou metodou, musíme provést prekoncentraci analytu před jeho stanovením. Velmi častou prekoncentrační metodou je extrakce z kapaliny do kapaliny anebo extrakce z kapaliny na tuhou fázi, tzv. solid phase extraction (SPE). Při extrakci z kapaliny na tuhou fázi proléváme velké objemové množství kapalného vzorku kolonkou naplněnou vhodným pevným adsorbentem, který na svém povrchu zachycuje, a tak i zakoncentrovává, příslušný analyt v malém objemu pevného adsorbentu. Po extrakci veškerého analytu z velkého objemu vzorku na pevné fázi se kolonka promyje vhodným činidlem o malém objemu, které uvolní prekoncentrovaný analyt z pevného adsorbentu a vymyje jej do onoho malého objemu uvolňovacího činidla. Pomocí SPE tedy zakoncentrujeme stanovovanou látku z velkého objemu kapalného vzorku do malého objemu vymývacího roztoku.

Analyt prekoncentrovaný pomocí extrakce na pevné fázi pak můžeme stanovit vhodnou analytickou metodou, jako je plynová či kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza anebo spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti. Při spektrofotometrickém stanovení necháme analyt reagovat s vhodným činidlem, s nímž vytváří přesně definovaný barevný produkt. Intenzita zabarvení roztoku tímto barevným produktem je pak přímo úměrná koncentraci analytu a lze ji změřit spektrofotometrem jako hodnotu absorbance příslušného barevného roztoku. Nejprve proměříme absorpční křivku barevného produktu, což je závislost absorbance ( $A$ ) barevného produktu na vlnové délce ( $\lambda$ ) absorbovaného záření. Z absorpční křivky zjistíme vlnovou délku maxima, tedy vlnovou délku, při níž barevný produkt vykazuje největší absorbanci. Absorbanci při vlnové délce maxima použijeme ke stanovení analytu, neboť při této vlnové délce bude stanovení nejcitlivější. Koncentrace analytu ve vzorku udává jednoznačně koncentraci vzniklého barevného produktu, jehož absorbance je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku podle Lambertova-Beerova zákona

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot d \cdot c$$

v němž  $A_{\lambda}$  je absorbance roztoku při vlnové délce  $\lambda$ ,  $\varepsilon_{\lambda}$  je molární absorpční koeficient barevného produktu [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $d$  je optická dráha paprsku, tedy tloušťka kyvety [cm] a  $c$  je molární koncentrace analytu [ $\text{mol L}^{-1}$ ].

Poněvadž hodnotu molárního absorpčního koeficientu v Lambertově-Beerově zákoně neznáme, neboť ta závisí na konkrétních experimentálních podmínkách, používáme při spektrofotometrických stanoveních metodu kalibrační přímky jako vyhodnocovací metodu. Při metodě kalibrační přímky připravíme několik roztoků barevného produktu o různé intenzitě barevnosti se známým množstvím analytu v barevném roztoku použitím čistého standardu příslušného analytu. Proměříme absorbance těchto roztoků při vlnové délce maxima a vyneseme kalibrační přímku, tedy lineární závislost absorbance roztoku na koncentraci analytu v tomto roztoku.

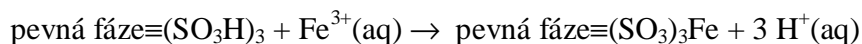
$$A = a + b \cdot c$$

Kalibrační závislost proložíme přímkou a zjistíme regresní koeficienty kalibrační přímky  $a$  a  $b$ . Poté připravíme barevný roztok s analytem ze vzorku a opět proměříme jeho absorbanci při stejné vlnové délce. Dosazením této hodnoty absorbance do regresní rovnice zjistíme koncentraci analytu v barevném roztoku s analytem ze vzorku a přepočítáme ji na koncentraci analytu v původním vzorku před prekoncentrací.

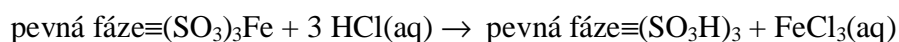
### *Prekoncentrace $\text{Fe}^{3+}$ z minerální vody extrakcí na pevné fázi*

Extrakci železitých kationtů z minerální vody lze provést na katexu neboli kationtovém iontoměnič. Katexy jsou malé kuličky organického polymeru (obvykle kopolymeru styrenu a divinylbenzenu), které mají

na svém povrchu navázané kyselé funkční skupiny. Pro extrakci  $\text{Fe}^{3+}$  použijeme silný katex, který nese kyselé sulfonové skupiny. Před extrakcí převedeme katex do  $\text{H}^+$  cyklu promytím 2 M kyselinou chlorovodíkovou, a tudíž jeho silně kyselé skupiny ponese ionty  $\text{H}^+$ . Pokud potom proléváme touto pevnou fází v kolonce minerální vodu se železitými kationty, dochází na katexu k výměně iontů  $\text{H}^+$  za kationty  $\text{Fe}^{3+}$ , které se na pevné fázi zadržují, zakoncentrovávají a tímto způsobem jsou z minerální vody extrahovány.



Po extrakci železitých iontů z celého objemu vzorku minerální vody promyjeme katex malým objemem 2 M kyseliny chlorovodíkové, čímž uvolníme extrahované ionty  $\text{Fe}^{3+}$  z pevné fáze zpět do malého objemu protékajícího uvolňovacího roztoku.



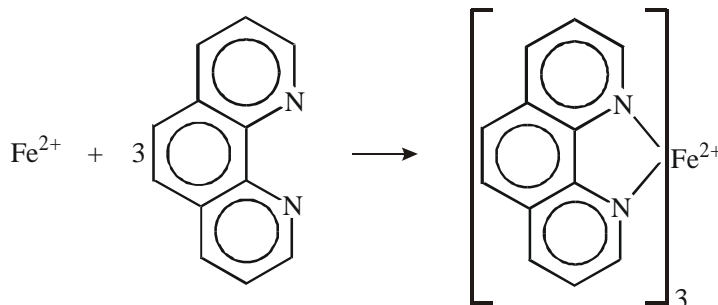
V tomto roztoku, v němž jsou  $\text{Fe}^{3+}$  zakoncentrovány z celého vzorku minerální vody, je pak můžeme stanovit spektrofotometricky.

*Reagencie:* 2 M HCl, katex Dowex 50 W jako pevná fáze

Extrakční kolonka s katexem je nasazena na dělicí nálevce s kohoutem, který umožňuje řídit rychlost protékání kapaliny z dělicí nálevky extrakční kolonkou, popřípadě úplné zastavení jejího toku. Před použitím extrakční kolonky ji nejprve propláchněte dvakrát 5 mL 2 M HCl a následně třikrát 10 mL destilované vody, aby se katex převedl do  $\text{H}^+$  cyklu. Destilovaná voda musí vymýt veškerou kyselinu chlorovodíkovou z extrakční kolonky, o čemž se přesvědčte univerzálním indikátorovým papírkem. Poté extrahujte ionty  $\text{Fe}^{3+}$  z minerální vody na pevnou fázi prolitím 0,5 L vzorku minerální vody z PET láhve kolonkou s katexem nasazené na dělicí nálevce do kádinky určené pro odpad. Po prokapání celého objemu vzorku opláchněte stěny dělicí nálevky destilovanou vodou ze stříčky a opět nechte prokapat extrakční kolonkou. Poté co jsou železité ionty zakoncentrovány na pevné fázi, promyjte katex dvakrát 5 mL 2 M HCl do 25 mL odměrné baňky pro spektrofotometrické stanovení. Po uvolnění iontů  $\text{Fe}^{3+}$  z pevné fáze kyselinou chlorovodíkovou promyjte extrakční kolonku třikrát 10 mL destilované vody do kádinky pro odpad a uzavřete odtok z kolonky tak, aby byl katex uchováván pod vodou a nebyl zavzdušněn.

### ***Spektrofotometrické stanovení železitých iontů***

Při spektrofotometrickém stanovení se ionty  $\text{Fe}^{3+}$  nejprve zredukuje hydroxylaminem na kationty  $\text{Fe}^{2+}$  v slabě bazickém prostředí octanu amonného a ty se nechají reagovat s 1,10-fenanthrolinem (fen), s nímž vytvářejí komplex  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$  o intenzivním červeném zabarvení.



*Reagencie:* standardní roztok  $\text{Fe}^{3+}$  o koncentraci  $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,1% roztok 1,10-fenantrolinu v dávkovací láhvi, 10%  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  v dávkovací láhvi, 20%  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

Použitím standardního roztoku  $\text{Fe}^{3+}$  o koncentraci  $180 \mu\text{mol L}^{-1}$  připravte 5 standardních roztoků komplexu  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$  o známé koncentraci analytu (tedy kationtů  $\text{Fe}^{3+}$ ). Do pěti 25 mL odměrných baněk odpipetujte dělenou pipetou 1, 3, 5, 7 a 10 mL standardního roztoku  $\text{Fe}^{3+}$ . Do každé z těchto pěti odměrných baněk dále přidejte ve stejném pořadí 2 mL 10%  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  pro redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ , 3 mL 0,1% 1,10-fenantrolinu pro vznik barevného komplexu a odměrnou baňku doplňte 20%  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  na 25,0 mL pro vytvoření slabě bazického prostředí. Roztoky důkladně promíchejte a ponechte je 15 minut stát pro dokonalé vybarvení komplexu.

Do šesté 25 mL odměrné baňky odměřte pouze činidla (tedy  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  a 1,10-fenantrolin), roztok doplňte 20%  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  na 25,0 mL, pečlivě promíchejte a ponechte 15 minut stát, čímž získáte slepý vzorek. Do 25 mL odměrné baňky s extrahovaným analytem z minerální vody také přidejte ve stejném pořadí 2 mL 10%  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  pro redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  a 3 mL 0,1% 1,10-fenantrolinu pro vznik barevného komplexu. Roztok doplňte 20%  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  na 25,0 mL, pečlivě promíchejte a opět ponechte 15 minut stát.

Podle *Návodu k obsluze spektrofotometru Agilent 8453* s použitím slepého vzorku proměřte spektra (v rozsahu 350 – 700 nm) všech pěti standardních roztoků červeného komplexu obsahujících známé koncentrace  $\text{Fe}^{3+}$  a roztoku červeného komplexu připraveného s analytem prekoncentrovaným z minerální vody.

Z proměřených a vytištěných absorpčních křivek a tabulky absorbancí určete vlnovou délku maxima, tedy  $\lambda$  odpovídající maximální absorbanci červeného komplexu  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ . Absorbance standardních roztoků červeného komplexu  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$  při vlnové délce maxima použijte ke konstrukci kalibrační křivky. Jak již bylo uvedeno, spektrofotometrické stanovení při této vlnové délce je nejcitlivější a poskytuje tedy kalibrační přímkou s maximální směnicí neboli regresním parametrem  $b$ . Do získané kalibrační přímky dosad'te absorbanci roztoku červeného komplexu připraveného s extrahovaným analytem z minerální vody a odeč'tete koncentraci  $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ , která zároveň odpovídá koncentraci železnatých, respektive železitých, iontů v tomto prekoncentrovaném roztoku. Tuto koncentraci přepočítejte na koncentraci železitých kationtů v analyzované minerální vodě z PET láhve a vyjádřete obsah  $\text{Fe}^{3+}$  v minerální vodě v hmotnostních procentech, pokud hustota minerální vody je  $1 \text{ g mL}^{-1}$ .  $A_r(\text{Fe}) = 55,85$

**Z provedené praktické úlohy vypracujte přehledný protokol, jenž na začátku příštího praktického cvičení odevzdejte.**

## Návod k obsluze SPEKTROFOTOMETRU AGILENT 8453


Spektrofotometr Agilent 8453 je špičkový moderní přístroj určený ke spektrofotometrickým měřením roztoků ve viditelné (VIS) a ultrafialové (UV) oblasti spektra v rozsahu 190 – 1100 nm s přesností 1 nm. Spektrofotometr je plně řízen osobním počítačem pomocí ovládacího programu UV-Visible ChemStation, ver. 9.01.

Cena spektrofotometru je **515 000 Kč** a všichni uživatelé jsou žádáni, aby na tuto skutečnost brali zřetel při práci s přístrojem a dodržovali popsany postup měření.

### *Zapnutí přístroje a příprava ovládacího programu k měření*

O zapnutí počítače ovládajícího spektrofotometr požádejte pedagogický dozor. Zapněte spektrofotometr hlavním vypínačem umístěným v levé spodní části přístroje. Po zapnutí přístroje se na předním panelu rozsvítí žlutě kontrolní dioda. Spektrofotometr se samočinně testuje, což se projevuje slyšitelným zvukem otvírání a zavírání clony. Po ukončení testu se kontrolní dioda rozsvítí zeleně a přístroj je připraven k měření.



V dalším kroku spusťte ovládací program dvojitým kliknutím levým tlačítkem myši na ikonu


*Instrument 1 online*  , čímž se objeví okénko pro zadání jména operátora a hesla.



Jméno operátora a heslo neměňte a potvrďte je pouze tlačítkem **OK**, načež se otevře hlavní okno ovládacího programu. Nejprve zkontrolujte, že program má otevřenu metodu VIS01.M, což je indikováno v horní části obrazovky výpisem **VIS01.M** v zeleném okénku za slovem **Method**. Není-li tomu tak, je třeba si tuto metodu otevřít kliknutím na menu **File – Load Method ...** a vybrat metodu VIS01.M v seznamu metod. Metoda VIS01.M umožňuje proměřit spektra roztoků a nalézt hodnoty vlnových délek a absorbancí absorbančního maxima v oblasti 350–700 nm.

## Proměření spekter

Skleněnou kyvetu se slepým vzorkem vložte do kyvetového držáku. Při vkládání kyvety musí být černá páčka kyvetového držáku v horní poloze. Po zasunutí kyvety do držáku kyvetu upevněte přepnutím páčky do dolní polohy. **Manipulujte s páčkou držáku jemně bez jakéhokoliv násilí!** Spektrum slepého vzorku proměřte kliknutím na softwarové tlačítko **Blank**  v levé dolní části obrazovky. Proměření spektra trvá několik vteřin a změřené spektrum se zobrazí v nově vytvořeném okénku označeném **Last Blank Spectrum**. Spektrum si pozorně prohlédněte a okénko minimalizujte kliknutím na ikonu .

V dalším kroku vložte do kyvetového prostoru kyvetu s měřeným roztokem. Nezapomeňte, že černá páčka kyvetového držáku musí být v horní poloze při vkládání kyvety a po jejím zasunutí do držáku je nutno kyvetu upevnit přepnutím páčky do dolní polohy. **S páčkou držáku manipulujte jemně bez jakéhokoliv násilí!** Spektrum proměřte kliknutím na softwarové tlačítko **Sample**  v levé dolní části obrazovky. Proměření spektra trvá několik vteřin a změřené spektrum se zobrazí v horním okénku označeném **Overlaid Sample Spectra**. Hodnota vlnové délky a absorbance absorbančního maxima změřeného spektra se zobrazí v dolním okénku **Sample/Result Table**.

Obdobným způsobem proměřte spektra dalších roztoků a vzorků. Příslušné hodnoty vlnových délek a absorbancí absorbančních maxim jsou zobrazovány v tabulce v dolním okénku **Sample/Result Table**. Čísla řádků v tabulce odpovídají pořadí měřených roztoků. Pro větší přehlednost si poznamenejte popis měřených roztoků a vzorků do kolonek sloupce **Name** v tabulce.

## Vytištění získaných dat a ukončení práce s přístrojem

Získané výsledky vytiskněte kliknutím na menu **File – Print – Results**. Ovládací program ukončete kliknutím na menu **File – Exit ChemStation**, čímž se objeví okénko **Close UV-Visible ChemStation**, v němž své rozhodnutí potvrďte kliknutím na tlačítko **OK**.

