

บทที่ 2

วัตถุประสงค์ และ วิธีการ



เครื่องมือ ในการวิเคราะห์ Nitrate (NO_3^-)

1. เครื่องกลั่นชนิด Ground Joint - Exelo
2. เครื่องชั่ง Analytical Balance - Mettler
3. Spectrophotometer - Shimadzu Bausch and Lomb spectronic-210 UV.

สารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. O - Xylenol (1-Hydroxy - 3,4 Dimethylbenzene) "Baker" Grade J.T.Baker Chemical.
2. Silver sulfate (Ag_2SO_4) Reagent grade, May and Baker
3. Bromocresol Green, BDH Chemical Ltd.
4. Potassium Nitrate (KNO_3) AR, May and Baker
5. Ammonium Hydroxide solution (NH_4OH) 28 %
6. Distilled water - N free
7. Sodium Hydroxide (NaOH) G.R. Merck
8. Sulfuric acid (H_2SO_4) N - Free, R-Grade, May and Baker
9. Phosphotungstic acid, G.R.Merck
10. Potassium Permanganate, BDH.

สารละลาย ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Silver ammonium hydroxide solution : ละลาย silver sulfate หนัก 5 กรัม ใน Ammonium Hydroxide 60 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดและวกลงเหลือ 30 มิลลิลิตร จึงยกขึ้นทำให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล

2. Bromocresol Green Indicator : ละลาย Bromocresol green หนัก 0.1 กรัม ในตาง Sodium hydroxide (NaOH) 0.1 N จำนวน 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตรเก็บในขวดหยด

3. Nitrate standard solution : ละลาย Potassium nitrate (Recrystallized) หนัก 0.1805 กรัมในน้ำกลั่นแล้วเติมจนครบ 1 ลิตร
1.0 มิลลิลิตร = 0.25 มิลลิกรัม N (NO_3^-)

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างที่ทำให้เป็นชิ้นละเอียดแล้ว 1 - 10 กรัม ตามความเหมาะสม แล้วเติมน้ำประมาณ 80 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเตาจนร้อนเกือบเดือดระหว่างนั้นต้องคอยคนตัวอย่างให้เข้ากันดี ถ้ายตัวอย่างใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร นำ Flask ไปแช่ในน้ำเดือดนาน 1 ชม. หมั่นเขย่า Flask บ่อย ๆ เมื่อครบเวลาทำให้ Flask เย็นแล้วเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนก้นแล้ว Pipet เอาของเหลวที่อยู่ตอนบนมา 40 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม Bromocresol green indicator 3 หยดเขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีน้ำตาล แล้วเติม H_2SO_4 (1 : 10) ลงไปที่ละหยดจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เติม KMnO_4 (0.2 N) ลงไปที่ละหยด เพื่อไป oxidized NO_2^- เป็น NO_3^-

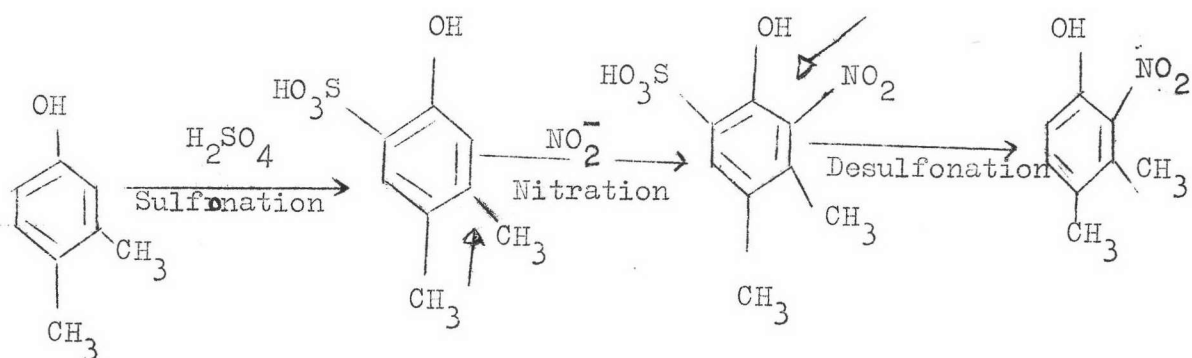
เขย่าจนกระทั่งสีชมพูยังคงอยู่นาน 1 นาที เติม H_2SO_4 (1 : 10) ลงไป 1 มิลลิลิตร เติม Phosphotungstic acid solution (20 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตรเพื่อไปตกตะกอนพวกโปรตีน เติมน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

Pipet สารละลายที่กรองได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ Flask ที่มีจุกปิดสนิท เติม Silver ammonium hydroxide ลงไป 5 มิลลิลิตรเพื่อตกตะกอนพวก Chloride และ Phosphotungstic acid ที่มากเกินไป เติม H_2SO_4 (3 : 1) ลงไป 60 มิลลิลิตร (ประมาณ 3 เท่าของปริมาตร-ของสารละลาย) ปิดจุก เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำให้เป็นลงประมาณ 35 องศาเซลเซียส เติม 0 - Xylenol 0.1 กรัม ซึ่งบดให้ละเอียดแล้วลงไปปิดจุกเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน 30 - 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อให้ได้เกิด Nitration

(ถ้าสารละลายที่โคมีสีเหลือง - น้ำตาล แสดงว่ามี Nitrate ในตัวอย่าง แต่ถาเกิดตะกอนสีแดงแสดงว่า Phosphotungstic acid ยังไม่หมด แต่ถามีเป็นจำนวนน้อย ๆ ก็ไม่มีผลแต่อย่างใด)

หลังจากการทำ Nitration เสร็จแล้วนำเอาสารละลายมากลั่นในเครื่องกลั่นชนิดแกว่วน ซึ่งในภาชนะรองรับใส่สารละลาย Sodium hydroxide (10 กรัม/ลิตร) เอาไว้ 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้สิ่งกลั่นออกมาประมาณ 50 - 60 มิลลิลิตร สารละลายที่โคจะมีสีเหลืองของ Nitroxyleneol นำมาเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดหาค่า Absorbance ที่ 450 nm. โดยใช้ cell ขนาด 1 เซนติเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank ค่า A ที่อ่านได้นำมาหาค่าความเข้มข้นของ N (NO_3^-) จากกราฟมาตรฐาน

ปฏิกิริยา Nitration ของ O - Xylenol



3,4, Dimethyl Phenol
(O - xylenol)

Nitroxyleneol
(Yellow)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

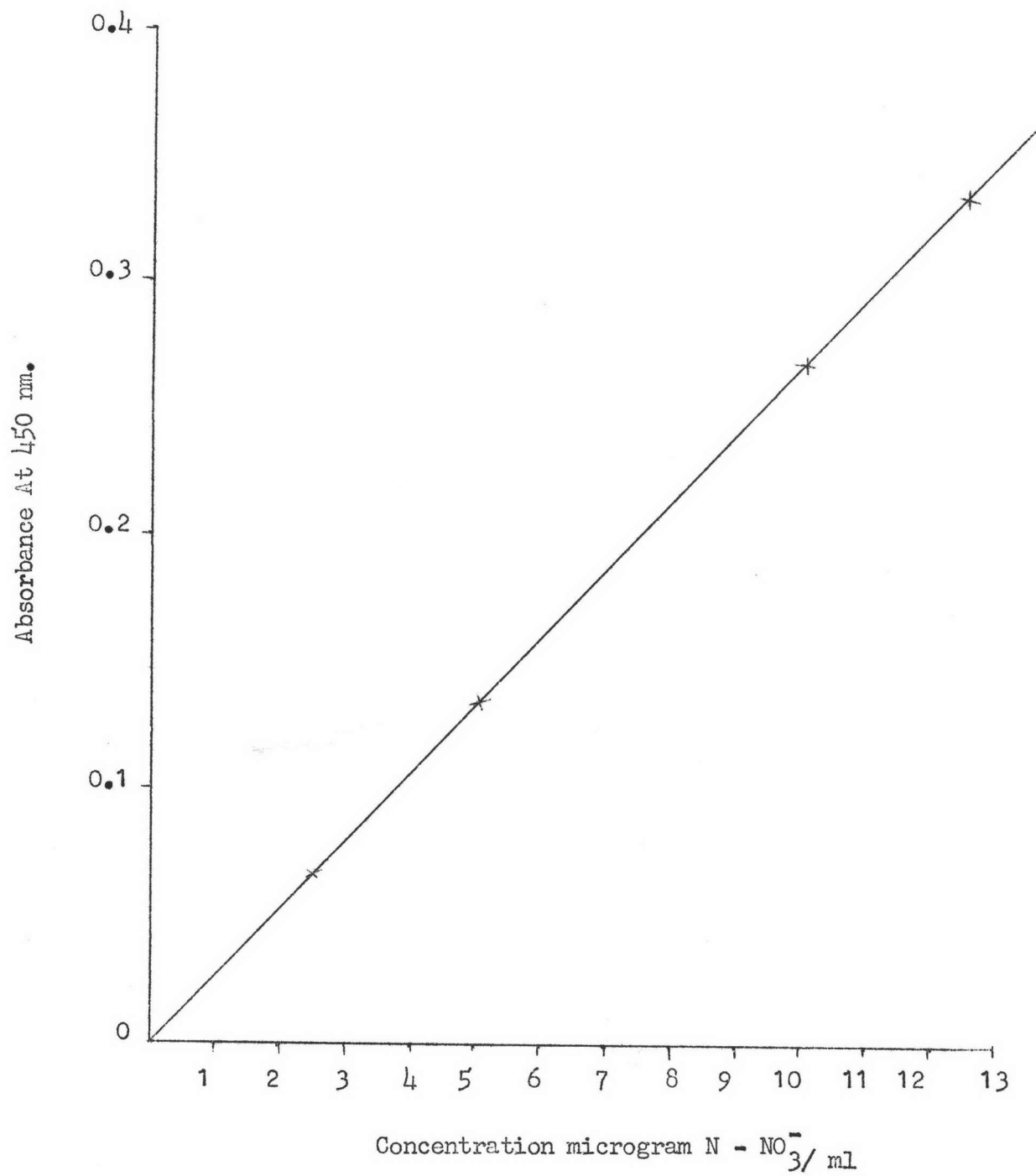
Pipet สารละลายมาตรฐานของ Nitrate 5, 10, 20, 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 (3 : 1) ลงไปเป็นจำนวน 3 เท่า ของตัวอย่างแล้วเติม O - Xylenol ที่บดละเอียด 0.1 - 0.2 กรัม ลงไปเขย่าให้เข้ากัน ทำให้อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปกลั่นด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้ว นำสารที่กลั่นได้มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัด Absorbance ที่ 450 nm. ใช้ cell ขนาด 1 cm.

ค่า A ที่ได้นำมา plot กับค่า concentration จะได้กราฟมาตรฐาน

ปริมาณน้ำยามาตรฐาน Nitrate (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ N (NO_3^-) เป็น Microgram/ml	A ที่ 450 nm.
5	2.5	0.067
10	5.0	0.136
20	10.0	0.270
25	12.5	0.335

Standard curve of Nitrate

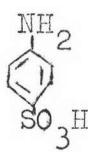
Determination of Nitrate by Nitration of O - Xylenol



เครื่องมือ ในการวิเคราะห์ Nitrite (NO_2^-)

1. Spectrophotometer - Shimadzu Bausch and Lomb Spectronic 210 UV
2. Analytical balance - Mettler

สารเคมี

1. Sulfanilic acid  G.R. - Merck
2. α -Naphthylamine ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}$), AR - E Merck
3. Acetic acid, glacial - RPE, Carlo Erba
4. Sodium Nitrite, AR - E Merck
5. Distilled Water (N - Free)

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Modified Griess Reagent : ละลาย Sulfanilic acid 0.5 กรัมใน Acetic acid (15 % V/V) 150 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายที่ 1 ซึ่ง α -Naphthylamine 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาไฟฟ้าให้ละลายจนหมดแล้วรีบเทลงใน Acetic acid (15 % V/V) 150 c.c. ได้สารละลายที่ 2 นำสารละลาย 1 และ 2 เติรวมกัน กรอง เก็บในขวดแก้วสีน้ำตาล
2. Nitrite standard solution : หนึ่ง Sodium nitrite (A.R.E - Merck) 0.0493 กรัม ใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่า

จนละลาย แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร pipet มา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

$$1 \text{ มิลลิลิตร} = 1 \text{ ไมโครกรัม } N (\text{NO}_2^-)$$

วิธีการวิเคราะห์

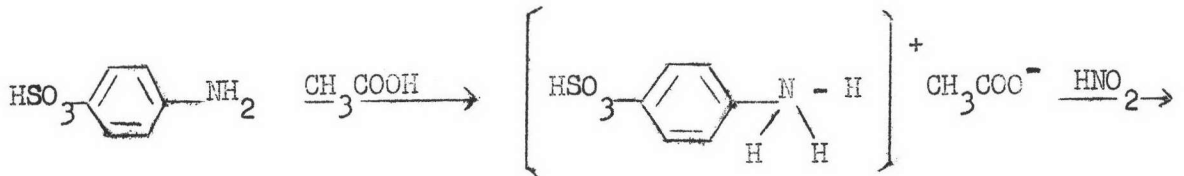
นำตัวอย่างที่ทำให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็ก ๆ (โดยการสับ หั่น โขลก) มาตุลกลวดให้เข้ากันแล้วชั่งมา 1 - 5 กรัม (ตามความเหมาะสม) ตมกับน้ำกลั่นให้ร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส แล้วจึงถ่ายลงในขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำจนครบปริมาตรแล้วเอาขวดปริมาตรนั้นแช่น้ำเดือดนาน 1 ชั่วโมง หมั่นเขย่าให้เข้ากัน

ทำให้ขวดปริมาตรเย็นลงเติมน้ำกลั่นครบปริมาตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้ว pipet สารละลายที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วทดสอบ เติม Griess reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดสีนาน 25 นาที นำตัวอย่างไปวัด Absorbance ที่ 520 nm ใช้ cell ขนาด 1 cm. ใส่น้ำกลั่น + Griess reagent เป็น blank ถ้า filtrate มีสีก็ให้ filtrate เป็น blank โดยไม่ต้องเติม Griess reagent.

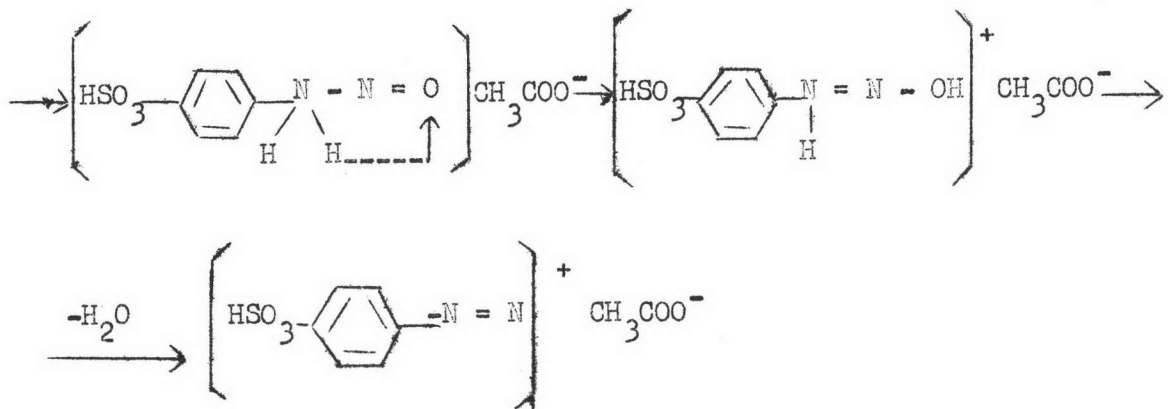
ค่า A ที่อ่านได้นำมาหาค่าความเข้มข้นของ $N (\text{NO}_2^-)$ จากกราฟมาตรฐาน

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีดังนี้

Diazotization of sulfanilic acid

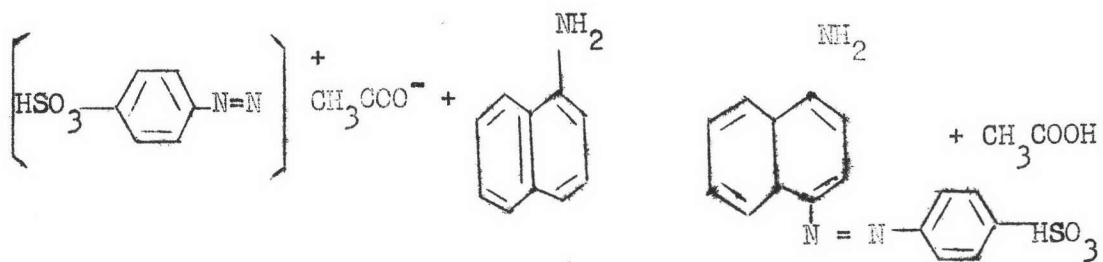


Sulfanilic acid



Diazonium salt (colorless, soluble in water)

Coupling with α -naphthylamine



1 - Amino, 4 - Naphthalene Azobenzene

sulfonic acid เป็น amino azo compound สีแดง
ละลายในน้ำ

๘

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

Pipet น้ำยามาตรฐาน Nitrite มา 1, 2, 5, 10, 15 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน เติม Griess reagent ลงไปขวดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ให้เกิดสี 25 นาที นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 520 nm. ใช้ cell ขนาด 1 cm. น้ำกลั่น + reagent เป็น blank ค่า A ที่อ่านได้นำไป plot กับค่าความเข้มข้นของ N (NO_2^-) จะได้กราฟมาตรฐาน

ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐานมิลลิลิตร	ความเข้มข้นของ N (NO_2^-) เป็น Microgram N/50 ml.	A ที่ 520 nm
1	1	0.052
2	2	0.109
5	5	0.282
10	10	0.532
15	15	0.768

Standard Curve of Nitrite

Determination of Nitrite by Griess - Ilosvay Reaction

