การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรทด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมีทรี

A Spectrophotometry for Determination of Nitrite and Nitrate

นายประสิทธิ์ มุกดา

และ

นางสาววิริญรัชญ์ สี่อออก

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
พุทธศักราช 2555

หัวข้อวิจัย การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรทด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมีทรี
A Spectrophotometry for Determination of Nitrite and Nitrate

ชื่อผู้วิจัย นายประสิทธิ์ มุกดา
นางสาววิริญรัชญ์ สื่อออก
คณะ วิทยาศาสตร์
สถาบัน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของไนไตรท์ และไนเตรท จากสารตัวอย่างน้ำที่ง่าย สะดวกและลดมลภาวะที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อม การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ อาศัยปฏิกิริยาคู่ควบระหว่างกรดซัลฟานิลิกกับเมธิลแอนทรานิเลต ในขณะที่การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทจะรีดิวส์ไนเตรท เป็นไนไตรท์ด้วยสังกะสี ก่อนทำการวิเคราะห์หาไนเตรทในรูปของไนไตรท์ต่อไป การวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์อาศัยปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชันของกรดซัลฟานิลิกได้เกลือไดอะโซเนียม จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับเมธิลแอนทรานิเลต เกิดสีย้อมไดอะโซ สีย้อมไดอะโซที่ได้ นำไปสแกนความยาวคลื่นที่ให้ค่าดูดกลืนสูงสุดที่ 538 นาโนเมตร ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกและเมธิลแอนทรานิเลตที่เหมาะสมคือ 0.4 %(w/v) และ 0.6 %(w/v) เมื่อนำวิธีที่ศึกษาไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์จากสารตัวอย่างน้ำจากแหล่ง A B C D E และ F เทียบกับการวิเคราะห์วิธีมาตรฐานได้ผลดังนี้ วิธีที่ศึกษา 0.0515 ± 0.00197, 0.0390 ± 0.00245, 0.0387 ± 0.00279, 0.0397 ± 0.00281, 0.0397 ± 0.00280 และ 0.0375 ± 0.00232 mg/L ตามลำดับ วิธีมาตรฐาน 0.0520 ± 0.00063, 0.0393 ± 0.00117, 0.0387 ± 0.00279, 0.0398 ± 0.00281, 0.0406 ± 0.00342 และ 0.0380 ± 0.00172 mg/L ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์หาไนเตรทในรูปของไนไตรท์สารตัวอย่างน้ำจากทุกแหล่งไม่มีปริมาณไนเตรทเจือปน

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีเปรียบเทียบด้วยวิธี F-test และ t- test ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: เกลือไดอะโซเนียม, การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม, ปฏิกิริยาคู่ควบ, สีย้อมไดอะโซ สเปกโทรโฟโตมิทรี ไนไตรท์ , ไนเตรท

Abstract

The aim of development method is a simple, rapid and reduced pollutant for determination of nitrite and nitrate in water sample. Determination of nitrite is based on the reaction involving sulfanilic acid with methylanthranilate as coupling agents and determination of nitrate is based on their reduction to nitrite in the presence of Zn powder. The produced nitrite is subsequently diazotization with sulfanilic acid then coupled with methyl anthranilate to form an diazo dye. The produced diazo dye was take to scan optimized lambda max(λ_{max}) and optimized λ_{max} is 538 nm. The optimized concentration of sulfanilic acid and methyl anthranilate were 0.4 %(w/V) and 0.6 %(w/v) respectively. The results revealed that the content of nitrite in A. B. C. D. E and F water samples and compared with standard method were 0.0515±0.00197, 0.0390±0.00245, 0.0387±0.00279, 0.0397±0.00281, 0.0397±0.00280 and 0.0375±0.00232 mg/L , standard method ; 0.0520±0.00063, 0.0393±0.00117, 0.0387±0.00279, 0.0398±0.00281, 0.0406±0.00342 and 0.0380±0.00172 mg/L. Determination of nitrate is based on their reduction to nitrite in water samples were not found. The two methods were compared by F-test and t-test and their were not significant difference.

Keywords: Diazonium salt, Diazotization, Coupling, Diazo dye, Spectrophotometry, Nitrite, Nitrate

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ สถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้การสนับสนุนเกี่ยวกับทุนในการวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมีที่ให้การอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายบุญหลาย หวังมี นางสาวยุวญานี จ่าภา นางสาวนิภารัตน์ ศรียางนอก นางสาวบุปผา อักษรณรงค์ นางสาวมะลิ พรมริบุตร นักศึกษาสาขาวิชาเคมี และคุณสว่าง พวงประโคน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างและเตรียมอุปกรณ์ในงานวิจัยครั้งนี้จนประสบผลสำเร็จ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจตลอดเวลา และขอขอบคุณอีกครั้งสำหรับทุกคนที่กล่าวนามมาแล้วข้างต้น และทุกๆคนที่คอยให้คำแนะนำ จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ประสิทธิ์ มุกดา
วิริญรัชญ์ สื่อออก
กันยายน 2555

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 กรอบแนวคิดหรือทฤษฎีของแผนการวิจัย	3
1.4 สมมติฐาน	5
1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น	5
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.8 คำนิยามศัพท์	6
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	9
2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
2.2 เกลือไดอะโซเนียม	10
2.3 UV-VIS Spectrophotometer	12
2.4 การตรวจวัดไนโตรเจนในรูปไนเตรทและไนไตรท์	15
บทที่ 3 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	19
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	19
3.2 สารเคมี	19
3.3 การเตรียมสารละลายเผื่อใช้	20
3.4 วิธีดำเนินการทดลอง	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	24
4.1 การหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืน	24
4.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของรีเจนต์	25
4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน	28
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนไทรต์ในตัวอย่างน้ำ	29
4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในตัวอย่างน้ำ	30
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	34
5.1 สรุปผลการวิจัย	34
5.2 วิจารณ์และข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	39

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 2.1	โครงสร้างของไดอะโซเนียมไอออน (Diazonium ion structure); Benzenediazonium cation	10
รูปที่ 2.2	แผนผังแสดงส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แบบลำแสงเดี่ยว	14
รูปที่ 2.3	แผนผังแสดงส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แบบลำแสงคู่	14
รูปที่ 4.1	การสแกนหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุด (λ_{max})ของ diazo dye	25
รูปที่ 4.2	สเปกตราแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylanthranilate กับค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียม	26
รูปที่ 4.3	สเปกตราแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylanthranilate กับค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียม	27
รูปที่ 4.4	กราฟมาตรฐานของสีย้อมไดอะโซที่ใช้ไนไตรท์ความเข้มข้นต่างๆ	28
รูปที่ 4.5	กราฟมาตรฐานสีย้อมไดอะโซจากการรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	31
รูปที่ ข.1	แสดงการใส่ตัวแปรต่างๆเพื่อคำนวณค่า F-test	46
รูปที่ ข.2	แสดงการใส่ตัวแปรต่างๆเพื่อคำนวณค่า T-test	47
รูปที่ ค.1	เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (model T 60 U)	48
รูปที่ ค.2	สารละลาย Sulfanilic acid มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
รูปที่ ค.3	สารละลาย methylanthranilate มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	50

สารบัญตาราง

		หน้า
ตาราง 4.1	ค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียมเมื่อใช้กรดซัลฟานิลิกที่ความเข้มข้นต่างๆหลังเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ	26
ตาราง 4.2	ค่าการดูดกลืนของ สีย้อมไดอะโซเนียมเมื่อใช้ methylanthranilate ที่ความเข้มข้นต่างๆหลังเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ	27
ตาราง 4.3	ค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียมที่ใช้สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้นต่างๆ	28
ตาราง 4.4	เปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์เฉลียที่ตรวจพบในสารตัวอย่าง 100 mL ที่วัดด้วยวิธีที่ศึกษาและวิธีมาตรฐาน	29
ตาราง 4.5	ศึกษาร้อยละการกลับคืน	30
ตาราง 4.5	การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในรูปของไนไตรท์ (mg/L)	31
ตาราง 4.6	การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในรูปของไนไตรท์ (mg/L)	32
ตาราง 4.7	ศึกษาร้อยละการกลับคืนของการรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์	32
ตาราง ข.1	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธีที่ศึกษา	44
ตาราง ข.2	แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน	45

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารประกอบของไนโตรเจนสามารถเปลี่ยนรูปเป็นไนเตรทได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนและแอมโมเนียเป็นองค์ประกอบ โดยแหล่งปนเปื้อนสารไนเตรทที่สำคัญมาจากของเสียจากการขับถ่ายของคนและสัตว์ นอกจากนี้สารไนเตรทอนินทรีย์ยังมาจากปุ๋ยเคมีที่มีโพแทสเซียมไนเตรท และแอมโมเนียไนเตรท มากกว่าร้อยละ 80 วัตถุระเบิดและดอกไม้ไฟประมาณร้อยละ 16 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าแหล่งการปนเปื้อนส่วนใหญ่ มาจากการชะจากแหล่งดินกสิกรรมที่ใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากดินสามารถดูดซับไนเตรทไว้ได้น้อยมาก ไนเตรทจึงถูกชะและละลายในน้ำได้เป็นอย่างดี ซึ่งถูกสะสมในน้ำผิวดิน เพราะไนเตรทไม่สามารถกลายเป็นไอได้

ไนเตรทจึงคงตัวในน้ำจนกว่าจะมีการนำไปใช้ประโยชน์โดยพืชและสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย การสลายตัว(degradation)ของไนเตรทเกิดได้เร็วในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic conditions) ปริมาณไนเตรทที่สูงเกินค่ากำหนดในแหล่งน้ำ และน้ำดื่มมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ตลอดจนความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เช่น การเปลี่ยนแหล่งน้ำดิบเพื่อการเตรียมน้ำดื่ม เป็นต้นเหตุความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ เป็นผลมาจากน้ำดื่มหรือเป็นผลจากการรับประทานอาหารที่มีไนเตรทสูงเช่น ผักและเนื้อสัตว์ที่มีการเติมสารไนเตรทเพื่อการปรุงและถนอมอาหาร จากผลการวิจัยพบว่าหญิงมีครรภ์ ควรหลีกเลี่ยงการได้รับปริมาณไนเตรทสูงในอาหารและน้ำดื่ม เนื่องจากจะมีผลต่อทารกในครรภ์ ทำให้คลอดก่อนกำหนดและโอกาสแท้งบุตรได้ (birthdefects and miscarriages) นอกจากนี้ยังพบว่าทารกที่มีอายุน้อยกว่า 6 เดือนอาจเกิดโรคที่เรียกว่า Blue Baby Syndrome หรือทางการแพทย์เรียกว่า Methemoglobinemia อาการที่พบในทารกมีค่า pH ในเลือดสูง (higher intestinal pH) ทำให้แบคทีเรียในลำไส้สามารถเปลี่ยนรูปของไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้มากขึ้น โดยไนไตรท์สามารถถูกดูดซับและรวมตัวกับฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็น เมทีโมโกลบิน (methemoglobin) ซึ่งส่งผลให้การลำเลียงออกซิเจนได้ลดลง

นอกจากนี้อาการอื่นๆที่พบคือ ปลายนิ้วมือนิ้วเท้า ริมฝีปาก มีสีเขียวคล้ำ ปวดศีรษะ วิงเวียน หน้ามืดคล้ายจะเป็นลม ช็อกหมดสติและชักกระตุกของกล้ามเนื้อ หรือแม้แต่สมองได้รับอันตรายจากการขาดออกซิเจน และทำให้เสียชีวิตได้การดื่มน้ำที่มีปริมาณไนเตรทสูง หรือน้ำชงนมทารก ที่มีปริมาณไนเตรทสูงนับว่าเป็นอันตรายอย่างยิ่งเพราะความเป็นพิษของไนเตรท

ไนไตรท์ เกิดจากการเปลี่ยนรูปทางเคมี ของสารประกอบไนโตรเจน โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม คีโมออโตโทรป (Chemoautotroph) ที่สามารถดึงออกซิเจนออกจากสารประกอบไนโตรเจน (ไนเตรท) มาใช้เพื่อการดำรงชีพ ในกรณีที่ขาดออกซิเจน หรือออกซิเจนไม่เพียงพอ จนทำให้เกิดการสะสมของไนเตรท นอกจากนี้การใช้ไนเตรททำสีและการถนอมอาหาร เมื่อไนไตรท์เข้าสู่ร่างกายมนุษย์จะทำปฏิกิริยากับเอมีน (amine) และเอไมด์ (amide) ทำให้เกิด ไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic) [1] การวิเคราะห์หาปริมาณของไนเตรทและไนไตรท์มีหลายวิธีเช่น วิธี polarogragpy [2], voltrammetry [3], fluorometry [4] [5], spectrophotometry [6], flow injection [7] และวิธีการมาตรฐานสากล (Standard Methods for the examination of water and waste water, APHA; AWWA; WEF, 1992) ซึ่งแต่ละวิธีที่กล่าวมามีข้อจำกัดของระยะเวลา ในการวิเคราะห์บางวิธีต้องใช้เวลาในการเตรียมสารละลายสีย้อม (diazo dye)นาน และบางวิธีสารละลายสีย้อมที่ได้มีความเสถียรต่ำ มีขั้นตอนการเตรียมก่อนทำการวิเคราะห์ยุ่งยากและซับซ้อน นอกจากนี้ความไว (sensitivity) และขีดต่ำสุดในการตรวจวัด (detection limit) ก็มีความแตกต่างกัน

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิจัยที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วในการวัดเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์โดยใช้ methylanthranilate เป็นสารคู่ควบ(coupling agent) จากการสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียมระหว่างไนไตรท์กับกรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับ methylanthranilate ในสารละลายกรดซึ่งทำให้เกิดสารละลายสีย้อม แล้วนำไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุด (λ_{max}) จากนั้นนำวิธีการที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในสารตัวอย่างน้ำดื่มต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์โดยใช้ methylanthranilate เป็นสารคู่ควบกับกรดซัลฟานิลิก

1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็วและเหมาะสมกับการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์

1.2.3 เพื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเนรตและไนไตรท์ในสารตัวอย่างน้ำประปาและน้ำดื่มบรรจุขวด

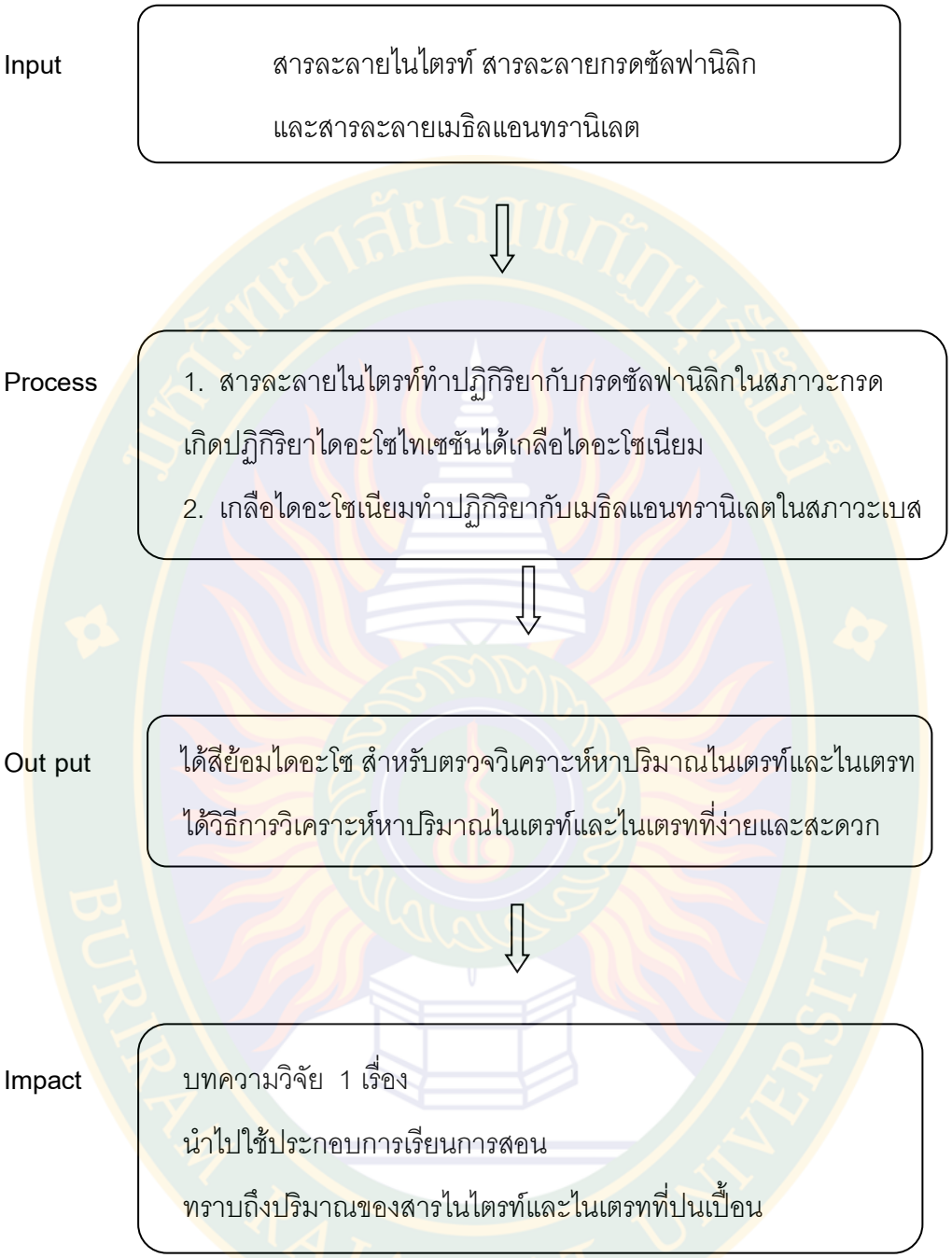
1.2.4 เพื่อนำวิธีวิจัยที่ได้ไปประยุกต์กับการเรียนการสอนในรายวิชาเคมีวิเคราะห์

1.3 กรอบแนวคิดหรือทฤษฎีของแผนการวิจัย

1.3.1 นำสารละลายกรดซัลฟานิลิกมาทำปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชัน (diazotization) กับสารละลายไนไทรท์ ในสภาวะที่เป็นกรดอุณหภูมิประมาณ 0-5 ^{o}C จะได้เกลือไดอะโซเนียม (diazonium salt) ที่ทำหน้าที่เป็นสารมัธยันต์ (intermediate)

1.3.2 นำเกลือไดอะโซเนียมที่ได้จาก 1.4.1 มาทำปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling) กับเมธิลแอนทรานิเลตในสารละลายเบสที่อุณหภูมิห้องจะได้สารสีย้อมไดอะโซ (diazo dye)

1.3.3 นำสารไดอะโซดายที่ได้ไปตรวจหาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุด (λ_{max}) จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไทรต์และไนเทรตในสารตัวอย่างต่อไป


Input
สารละลายไนไตรท์ สารละลายกรดซัลฟานิลิก
และสารละลายเมธิลแอนทรานิเลต
Process
1. สารละลายไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟานิลิกในสภาวะกรด
เกิดปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชันได้เกลือไดอะโซเนียม
2. เกลือไดอะโซเนียมทำปฏิกิริยากับเมธิลแอนทรานิเลตในสภาวะเบส
Out put
ได้สีย้อมไดอะโซ สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท์และไนเตรท
ได้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท์และไนเตรทที่ง่ายและสะดวก
Impact
บทความวิจัย 1 เรื่อง
นำไปใช้ประกอบการเรียนการสอน
ทราบถึงปริมาณของสารไนไตรท์และไนเตรทที่ปนเปื้อน

1.4 สมมติฐาน

กรดซัลโฟนาลิกทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ในสารละลายกรดแล้วนำไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับเมธิลแอนทรานิเลตได้เกลือไดอะโซเนียมพวกสีย้อมดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืน (absorbance) ที่วัดได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของปริมาณไนไตรท์

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การดำเนินการวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยมีขอบเขตการวิจัยดังนี้

ด้านคุณภาพ

1. การสังเคราะห์เกลือ diazonium และปฏิกิริยาคู่ควบ(coupling) ระหว่างกรดซัลฟานิลิกกับเมธิลแอนธานิเลต
2. ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกกับความเข้มของสีและค่าการดูดกลืน

ด้านปริมาณ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณของไนเตรทและไนไตรท์ในสารตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด ที่ผลิตในเขตเทศบาลเมืองบุรีรัมย์และผลิตจากแหล่งอื่นที่จำหน่ายในเขตเทศบาลเมืองบุรีรัมย์
2. การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์จากน้ำประปาของการประปาจังหวัดบุรีรัมย์

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้คณะผู้ดำเนินการวิจัยจะทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความเข้มในการดูดกลืนความยาวคลื่นสูงสุดดังนี้

1. ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิก และเมธิลแอนทรานิเลต
2. เปอร์เซ็นต์การกลับคืนมา (percent recovery) ของวิธีวิเคราะห์ที่ถูกพัฒนาขึ้น
3. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนากับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในสารตัวอย่าง ง่าย สะดวก และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น

1.7.2 เป็นผลงานทางวิชาการเพื่อนำไปเผยแพร่ในวารสารวิชาการ เช่น Analyst, J. of analytical chemistry และวารสารวิชาการของหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องภายในประเทศ

1.7.3 สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์นำผลการวิจัยที่ได้ไปวิเคราะห์หาไนเตรท และไนไตรท์ในสารตัวอย่างชนิดต่างๆ

1.7.4 นำมาใช้ประกอบการสอนนักศึกษาทุกสาขาที่เรียนรายวิชาเคมีวิเคราะห์ โดยเฉพาะนักศึกษาสาขาวิชาเคมี

1.8 คำนิยามศัพท์

เกลือไดอะโซเนียม (Diazonium salt) หรือสารประกอบไดอะโซเนียม(diazonium compound) หมายถึง อนุพันธ์ของเอมีน(amine) มีความเสถียรต่ำนิยมใช้ทำสารมัธยันต์ (intermediate) การสังเคราะห์สาร ซึ่งมีสูตรทั่วไปคือ $R\text{-}N_2^+ X^-$ เมื่อ R- หมายถึงหมู่ อัลคิล(alkyl-) หรือ เอริล(aryl-) และ X^- หมายถึง ไอออนลบ(anion) ของสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ เช่น ไอออนลบของธาตุฮาโลเจน

การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม (Diazotization or diazonium salt synthesis) หมายถึงวิธีการสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม โดยการสังเคราะห์จากการทรีต (Treat) สารประกอบอะโรเมติกเอมีน (amine aromatic compound) กับกรดไนตรัส ตามปกติกรดไนตรัสได้จากโซเดียมไนเตรท์หรือกรดแร่ เกลือไดอะโซเนียมที่ได้จะมีความเสถียรต่ำ ที่อุณหภูมิสูงกว่า $+5^{\circ}C$ หมู่ $\overset{\oplus}{N}\equiv N$ จะสลายตัวเป็นแก๊สไนโตรเจน (N_2) แต่จะมีความเสถียรสูงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแยกมาอยู่ในรูปของเกลือเตตะฟลูออโรบอเรต

ปฏิกิริยาคู่ควบ (Coupling reaction) หมายถึง ปฏิกิริยระหว่างเกลือไดอะโซเนียมกับหมู่เอริล (R-) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือไดอะโซเนียมพวกสีย้อม

Diazo dye (azo dye) สารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น R-N=N-R' เมื่อ R และ R' เป็นหมูเอริล (aryl-) หรือ แอลคิล (alkyl-) IUPAC ให้คำจำกัดความว่า เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบไดเอซีน(diazene compound) หรือไดอิมายด์ (diimide) ; HN=NH เมื่อ ไฮโดรเจนอะตอมถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮโดรคาร์บิล (hydrocarbyl) azo dyeในรูปของสารประกอบ เอริลจะมีความเสถียรสูง

Spectrophotometry หมายถึงเทคนิคที่ใช้การดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงยูวี-วิสิเบิล (200-400 นาโนเมตร) และในช่วงวิสิเบิล (400-800 นาโนเมตร) ของสารอินทรีย์ และอนินทรีย์

เมื่อโมเลกุลดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าจะเกิดการทรานสิชันใน 3 แบบ ตามชนิดของอิเล็กตรอน

1. โมเลกุลที่มี π ,γ และ n อิเล็กตรอน ส่วนมากเป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ที่เป็นอนุมูลแอนไอออน เช่น NO_3^-, SO_4^-

2. โมเลกุลที่มี d ,f อิเล็กตรอนส่วนมากเป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่มีโลหะที่มีในหมู่โลหะทรานสิชัน

3. โมเลกุลที่เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอน เกิดในโมเลกุลสารอนินทรีย์เชิงซ้อน

ไนไตรท์ (Nitrite) สารประกอบอนินทรีย์จำพวกพอลิอะตอมไอออน ที่โมเลกุลประกอบด้วยไนโตรเจนเป็นอะตอมกลางล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจน 2 อะตอม จัดเป็นไอออนที่สมมาตร มีสูตรเคมีเป็น NO_2^-

ไนเตรท (Nitrate) สารประกอบอนินทรีย์จำพวกพอลิอะตอมไอออน ที่โมเลกุลประกอบด้วยไนโตรเจนเป็นอะตอมกลางล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจน 3 อะตอม มีรูปทรงแบบ Trigonal planar มีสูตรเคมีเป็น NO_3^-

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อรนุช เรือนคำ และคณะ (2011) [7] วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธี flow injection chemiluminescence การตรวจวิเคราะห์ไนไตรท์และไนเตรทอาศัยพื้นฐานจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรทไอออนเป็นไนไตรท์ไอออนโดยวิธีออนไลน์โฟโตรีดักชันที่ใช้หลอดยูวีเป็นแหล่งฉายรังสี แทนการใช้แคดเมียม การตรวจวัดปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนส์อาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนไตรท์โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดซ์เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกรดเปอร์ออกซีไนตรัส หลังจากนั้นเปอร์ออกซีไนไตรท์ไอออนจะทาปฏิกิริยากับลูมินอลในสารละลายด่าง ซึ่งความเข้มแสงเคมิลูมิเนสเซนส์ที่เกิดจากปฏิกิริยาจะตรวจวัดโดยใช้ลูมิโนมิเตอร์ที่สร้างขึ้นเอง

Dayananda และคณะ (2007) [8] ทำการวิเคราะห์ไนเตรทและไนไตรท์ การวิเคราะห์ไนไตรท์ จะใช้ 4-aminoazobenzene ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นกรด และโบรไมด์ไอออน ให้อยู่ในรูปของ diazonium ion ทำการ coupling กับ acetyl acetone เกิดเป็น bisazo dye และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 nm

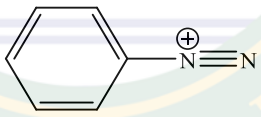
M. J. Ahmed และคณะ (1996) [11] ได้ศึกษาวิธีก๊าซดิฟฟิวชันโฟลอินเจคชัน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธีจีดี-เอฟไอ จะอาศัยการฉีดสารมาตรฐานและ/หรือสารละลายตัวอย่างไนไตรท์ เข้าไปในสารละลายตัวพาโดยไนไตรท์จะเปลี่ยนเป็นกรดไนตรัส จากนั้นสารละลายจะถูกผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ 3-ไนโตรอะนิลีน และ เอ็น -1-แนฟธิลเอธิลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ เกิดเป็นสารประกอบเอโซดายี่มีสีแดง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์อย่างง่ายที่มีความยาวคลื่นในช่วง 500-600 นาโนเมตร

Narayana และ Sunil (2009) [4] ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในแหล่งน้ำดิบ ดิน และยา ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมิทรี ในการวิเคราะห์ไนไตรท์จะใช้กรดซัลฟานิลิกและเมทิลแอนทานิเลท ให้อยู่ในรูปของ azo dye สำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท จะทำการรีดิวซ์ ให้เป็นไนไตรท์ ด้วย Zn/NaCl การวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิทรี ที่ความยาวคลื่น 493 nm

Wang และคณะ (1998) [6] วิเคราะห์ไนเตรท และไนไตรท์ในตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างผลไม้ บางชนิด วิธีที่ใช้ในการวัดไนไตรท์ จะใช้ปฏิกิริยา diazotization - coupling โดยใช้คอลัมน์เพิ่มความเข้มข้นของสาร ปฏิกิริยานี้จะทำปฏิกิริยาคู่กับสาร 3 ชนิด คือ sulfanilamide sulfamethizole และ sulfadimidine ก่อนตรวจวัดด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 543 537 และ 530 ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท จะทำการรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปของไนไตรท์ด้วย Cd–Cu reductor column

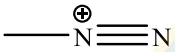
2.2 เกลือไดอะโซเนียม (Diazonium salt)

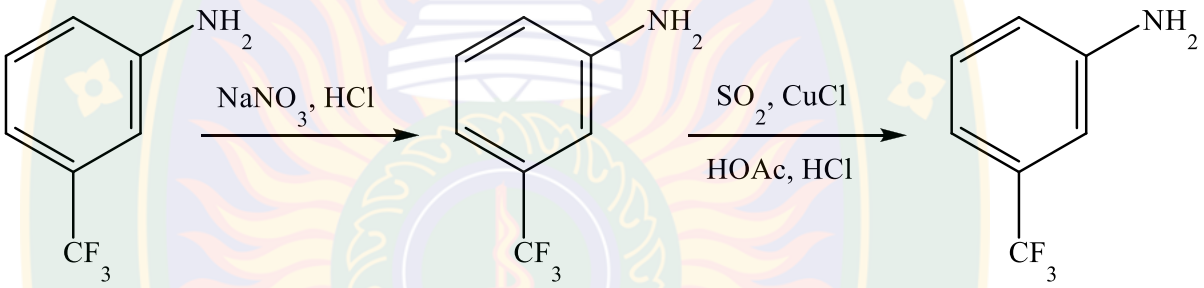
เกลือไดอะโซเนียม หรือสารประกอบไดอะโซเนียม (diazonium compound) เป็นอนุพันธ์ของเอมีน (amine) ซึ่งมีสูตรทั่วไปคือ $R\text{-}N_2^+ X^-$ เมื่อ R- เป็นหมู่ของสารอินทรีย์ เช่น หมู่อัลคิล (alkyl group) หรือเอริล (aryl group) และ X^- คือไอออนลบ (anion) ของสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ เช่น ไอออนลบของธาตุฮาโลเจน ถ้าหมู่ R คือ หมู่เอริลจะมีความสำคัญยิ่งที่จะทำหน้าที่เป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์พวกสีย้อม (azo dye)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไดอะโซเนียมไอออน (Diazonium ion structure); Benzenediazonium cation

2.2.1 **การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม** (Diazonium salt synthesis)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม เรียกว่า ปฏิกิริยาไดอะโซเทชั่น (Diazotation) การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียมโดยทั่วๆไปจะสังเคราะห์จากการทรีต (treat) สารประกอบอะโรเมติกเอมีน (amine aromatic compound) กับกรดไนตรัส ซึ่งกรดไนตรัสได้จากโซเดียมไนเตรท หรือกรดแร่ เกลือไดอะโซเนียมที่ได้จะมีความเสถียรต่ำ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 5 °C หมู่  และจะสลายตัวให้แก๊สไนโตรเจน (N_2) แต่จะมีความเสถียรสูงที่อุณหภูมิห้องเมื่อแยกมาอยู่ในรูปของเกลือเตตระฟลูออโรบอเรต จากสมการแสดงการเตรียมเกลือไดอะโซเนียมในรูปของสารประกอบเอริลซัลฟูนิล



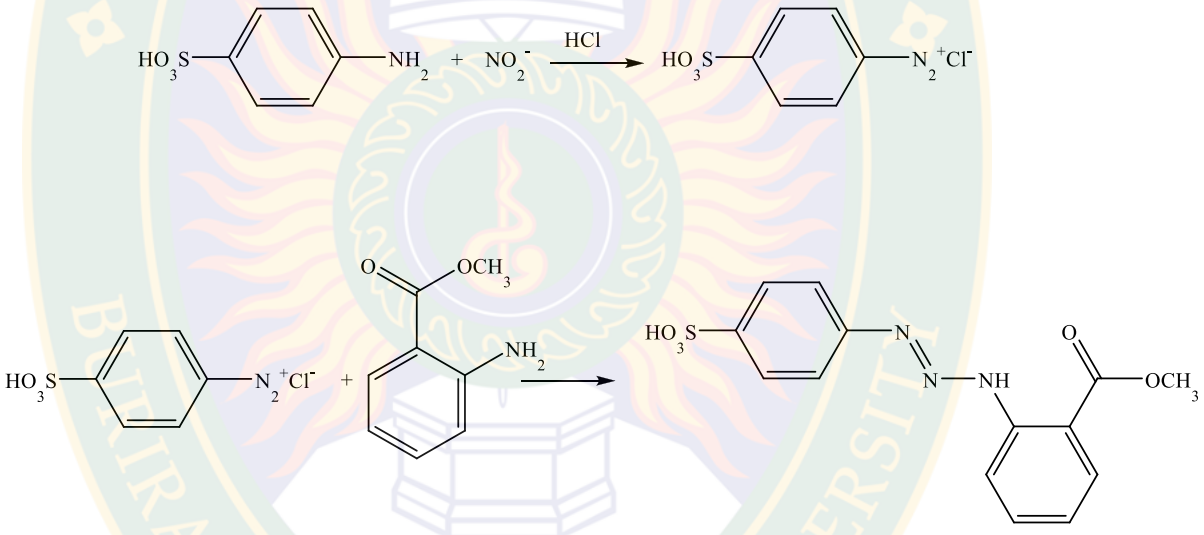
2.2.2 **ปฏิกิริยาคู่ควบ** (Diazonium coupling)

เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญของเกลืออะโรเมติกไดอะโซเนียม โดยเกลือไดอะโซเนียมจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอริลบริเวณที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่น เช่น aniline หรือ phenol ซึ่งผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบพวกอะโซ (azo compound) เป็นสารประกอบจำพวกสีย้อม (azo dye) ดังสมการ

ความเข้มของสีย้อมที่ได้ขึ้นอยู่กับพันธะที่คอนจูเกตกัน เช่น aniline yellow (สีเหลืองโลหะ) เกิดจาก aniline กับ เกลือไดอะโซเนียม ที่อุณหภูมิต่ำ ได้เป็นของแข็งสีเหลือง napthalen – 2 - ol (ตะกอนสีแดงส้ม)

การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียมจากกรดซัลฟานิลิก (Diazonium synthesis from sulfanilic acid)

การสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียมด้วยกรดซัลฟานิลิกในสารละลายกรด โดยให้กรดซัลฟานิลิกทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ในสารละลายกรด ตามด้วยปฏิกิริยาคู่ควบกับ methyl anthranilate ในสารละลายด่างจะได้ azo dyes ซึ่งจะดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 493 นาโนเมตร ดังสมการ



azo dye

2.3 UV-VIS Spectrophotometer

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า Intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ [10,11]

ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

2.3.1 **แหล่งกำเนิดแสง** (Light Source)

แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสง ช่วง UV ใช้หลอด ไฮโดรเจน (H_2) และ ดิวทีเรียม (D_2) lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 160-380 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV molecular absorption และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2.3.2 **โมโนโครเมเตอร์** (monochromator)

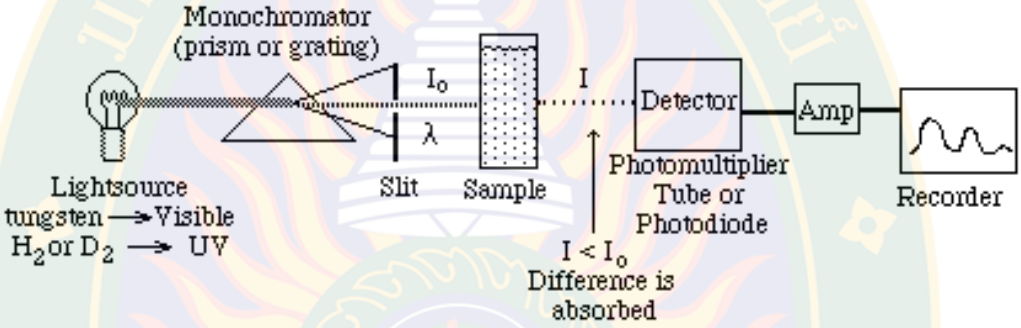
ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์(กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

2.3.3 **เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง** (Sample Cell)

เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

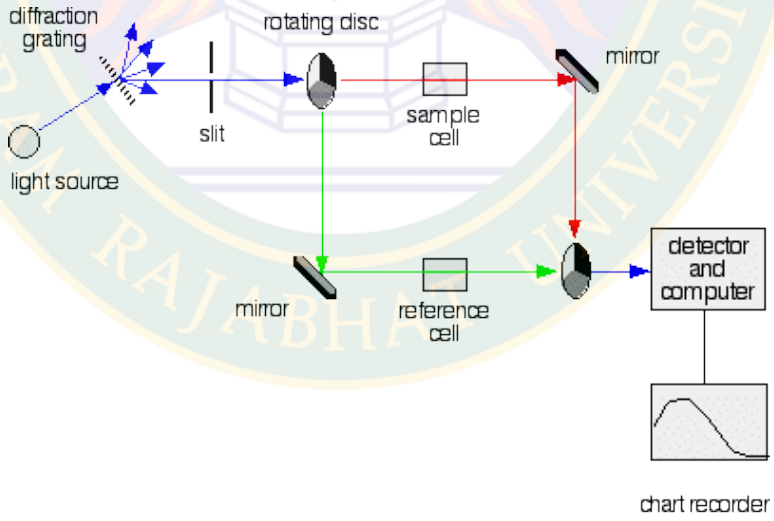
2.3.4 **อุปกรณ์ตรวจจับ** (Detector)

ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)



รูปที่ 2.2 แผนผังแสดงส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แบบลำแสงเดี่ยว

(ที่มา: http://www.sci.sdsu.edu)



รูปที่ 2.3 แผนผังแสดงส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แบบลำแสงคู่

(ที่มา: http://www.chemguide.co.uk)

2.4 ไนเตรทและไนไตรท์ (Nitrate and Nitrite)

ไนโตรเจนเป็นหนึ่งในสามของสารอาหารสำคัญที่พืชต้องการ พืชส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปที่เป็นโมเลกุล (N_2) ได้ ในระบบนิเวศที่เป็นน้ำ พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนให้กลายเป็นแอมโมเนีย (NH_3) และไนเตรท ซึ่งพืชน้ำสามารถนำไปใช้ได้ สัตว์ที่กินพืชน้ำเหล่านี้นำไนโตรเจนที่ได้ไปสร้างโปรตีน เมื่อพืชและสัตว์ตายลง โมเลกุลของโปรตีนจะถูกย่อยให้เล็กลงโดยแบคทีเรียกลายเป็นแอมโมเนีย จากนั้นแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะออกซิไดซ์แอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์ และไนเตรท แต่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนหรือมีออกซิเจนในปริมาณน้อย พบว่าไนเตรทจะเปลี่ยนรูปโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ กลายเป็นแอมโมเนีย (NH_3) และนั่นคือ การเริ่มต้น วัฏจักรของไนโตรเจนอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นไนโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำที่สำคัญมีอยู่ 2 รูป คือ ไนเตรท (NO_3^-) และไนไตรท์ (NO_2^-) ไนโตรเจนในรูปไนเตรทจัดว่ามีความสำคัญมากที่สุดในน้ำ

ไนโตรเจนในรูปไนเตรท มักพบในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำค่อนข้างต่ำ ไนเตรทเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและพืชน้ำทั้งหลายและสามารถตรวจพบในน้ำได้ในปริมาณที่สูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับปริมาณการรับไนเตรทจากแหล่งต่างๆ สู่แหล่งน้ำ โดยปกติ ระดับของไนโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติจะค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า 1 ppm ของไนโตรเจนในรูปของไนเตรท) เกิดจากกระบวนการย่อยสลายของเสียจากสัตว์และซากพืชซากสัตว์ที่ตายแล้ว ซึ่งพืชจะนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว ในแหล่งน้ำที่มีระดับไนโตรเจนค่อนข้างสูง อาจจะทำให้เกิดกระบวนการยูโทรฟิเคชั่นได้ ระดับไนโตรเจนอาจจะสูงขึ้นเนื่องจากผลตามธรรมชาติหรือเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ หรือเป็ดและห่านทำให้ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งน้ำที่พวกมันอาศัยอยู่มีปริมาณสูงขึ้นได้จากการถ่ายมูลลงน้ำ ไนโตรเจนที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ ได้แก่ การทิ้งขยะหรือของเสียลงแม่น้ำ ปุ๋ยเคมีที่ถูกชะล้างลงสู่ลำน้ำต่างๆ ซึ่งอาจปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำใต้ดินได้ตลอดจนน้ำไหลชะจากการเลี้ยงสัตว์บางชนิด และคอกสัตว์ เป็นต้น

2.4.1 ความสำคัญของไนเตรทและไนไตรท์

จากการที่ในแหล่งน้ำมีไนโตรเจนและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนให้กลายเป็นแอมโมเนีย (NH_3) ได้นั้น แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในขบวนการเผาผลาญพลังงาน (Anaerobic Bacteria) จะใช้แอมโมเนียในการเผาผลาญอาหาร ผลที่ได้คือ

ไนไตรท์ และหลังจากนั้นแบคทีเรียที่ใช้ไนไตรท์ในการเผาผลาญอาหารก็จะเปลี่ยนให้ไนไตรท์กลายเป็นไนเตรท ซึ่งไนเตรทจะกลายเป็นแก๊สไนโตรเจน และบางส่วนจะถูกดูดซึมกลายเป็นอาหารของพืชน้ำ

จากแหล่งน้ำที่มีไนโตรเจนกลายเป็นแอมโมเนียที่อยู่ในสภาวะกรดจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออน ดังสมการ

$$NH_3 \xrightarrow{H^+} NH^{4+}$$

การเกิดไนไตรท์และไนเตรทจะมีขบวนการสำคัญคือ กระบวนการไนตริฟิเคชั่น (Nitrification) และกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น (Denitrification) โดยแต่ละกระบวนการมีรายละเอียดดังนี้

- **ไนตริฟิเคชั่น** (Nitrification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนีย เป็นสารประกอบไนเตรท ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของแบคทีเรียเป็นในดิน สำหรับกระบวนการไนตริฟิเคชั่นมี 2 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นแรก</u> ไนโตรซิฟิเคชั่น (Nitrosification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ ดังสมการ

$$2NH_4^+ \longrightarrow 2NO_2^- + 4H^+ + \text{Energy} + 2H_2O$$

<u>ขั้นที่สอง</u> ไนตริฟิเคชั่น เป็นการเปลี่ยนแปลงไนไตรท์เป็นไนเตรท ดังสมการ

$$2NO_2^- + O_2 \longrightarrow 2NO_3^- + \text{Energy}$$

- **ดีไนตริฟิเคชั่น** (Denitrification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงไนเตรทเป็นแก๊สไนโตรเจน ดังสมการ

$$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$$

2.4.2 การตรวจวัดไนเตรทและไนไตรท์

การตรวจวัดไนโตรเจนในแหล่งน้ำ จะวัดไนโตรเจนในรูปไนเตรทและไนไตรท์ แต่การตรวจวัดไนเตรทโดยตรงนั้นทำได้ค่อนข้างยากเพราะไนเตรทสามารถถูกรีดิวซ์ให้กลายเป็นไนไตรท์ได้ง่าย ดังนั้นจึงเป็นการตรวจวัดปริมาณไนไตรท์แทนที่จะตรวจวัดปริมาณไนเตรท ผลการตรวจวัดจึงมักจะเป็นความเข้มข้นของไนไตรท์ (ถ้ามีอยู่ในแหล่งน้ำ) รวมกับไนเตรท

2.4.3 ความเป็นพิษของไนเตรทและไนไตรท์

การได้รับไนเตรท ไนไตรท์ในรูปของเกลือโพแทสเซียมไนเตรท ปริมาณ 30 - 35 กรัมต่อกิโลกรัม หรือ โซเดียมไนเตรท ปริมาณ 20 - 23 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพียงครั้งเดียวสามารถทำให้เสียชีวิตได้ทันที หากได้รับพิษในปริมาณเพียงเล็กน้อยอาจทำให้เกิดอาการเขียวคล้ำตามร่างกาย ที่เรียกว่า Methemoglobinemia[12] เป็นภาวะที่ร่างกายมี Methemoglobin เกินกว่าที่จะกำจัดได้ โดย EPA ได้กำหนดให้ค่ามาตรฐานของไนเตรทและไนไตรท์ในน้ำดื่ม เท่ากับ 10 ppm. และ 1 ppm. ตามลำดับ และ US. FDA ได้กำหนดค่าไนไตรท์สูงสุดในอาหารจำพวกปลา และเนื้อสัตว์รมควัน ย่าง หรือ แปรรูปอื่นๆ ประมาณ 200 ppm. European Food Safety Authority (EFSA) ได้พบว่า การใช้โซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 50 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้[13]

กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทยได้ออกประกาศกระทรวงฉบับที่ 281 กำหนดปริมาณการใช้เกลือไนเตรท หรือไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยให้ใช้เกลือโซเดียมไนไตรท์ได้ปริมาณ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโซเดียมไนเตรท 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม[14,15] โดยตัวสารไนเตรทปกติแล้ว ไม่เป็นพิษ แต่เมื่อกินเข้าไปแล้วจะถูกแบคทีเรียในกระเพาะอาหารและลำไส้เปลี่ยนสารไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ที่มีผลต่อฮีโมโกลบิน(Hemoglobin) ในเลือด โดยไนไตรท์สามารถถูกดูดซับและรวมตัวกับฮีโมโกลบิน เป็นเมทีโมโกลบิน(Methemoglobin)[16] ที่จะส่งผลให้การลำเลียงออกซิเจนได้ลดลง ในคนปกติจะมีเมทีโมโกลบินในเลือดประมาณ 0.5 – 2 % ถ้ามีค่าสูงกว่า 10 % จะทำให้ผิวหนัง และริมฝีปากเขียวคล้ำได้ และถ้ามีปริมาณมากกว่า 25 % จะทำให้อ่อนเพลีย ตัวเขียว หัวใจเต้นเร็ว หรือถ้ามีปริมาณสูงถึง 50 - 60 % จะทำให้หมดสติและ

เสียชีวิตได้ โดยเฉพาะในเด็ก หากได้รับสารไนเตรท และไนไตรท์นานๆ แม้เพียงปริมาณเล็กน้อย ก็อาจทำให้เกิดอาการปัสสาวะบ่อย หรือมากกว่าปกติ และเลือดออกในม้ามได้[17]

บทที่ 3
การดำเนินวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Instruments and apparatus)

3.1.1 UV-Visible spectrophotometer (model T 60 U) PG. Instruments.

3.1.2 pH meter (model multi 350 i) WTW.

3.1.3 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 25.0, 50.0, 100.0 และ 150.0 mL

3.1.4 ปิเปต (Pipette)

3.1.5 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.6 บิวเรต (Burette)

3.2 สารเคมี (Reagents) สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้งหมดใช้ AR. grade

3.2.1 Sulfanilic acid, Fluka AG.

3.2.2 Methyl anthranilate, SIGMA-ALDRICH chemie.

3.2.3 Sodium nitrite, Ajax Finechem.

3.2.4 Potassium nitrate, Ajax Finechem.

3.2.5 Zinc granule, Univar.

3.2.6 Sodium chloride pellate, Mallinckrodt Inc.

3.2.7 Sodium hydroxide, Carlo Erba

3.2.8 Sulfuric acid, Fluka AG.

3.2.9 น้ำกลั่น (Distilled water)

3.3 การเตรียมสารละลายเผื่อใช้ (Stock solution)

3.3.1 การเตรียมสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 1000 mg/L ชั่ง $NaNO_2$ 0.1500 g นำไปละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

3.3.2 การเตรียมสารละลาย NO_3^- เข้มข้น 1000 mg/L ชั่ง KNO_3 0.7220 g นำไปละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

3.3.3 การเตรียมสารละลาย 0.5% sulfanilic acid ชั่ง sulfanilic acid 0.5 g ละลายน้ำ 100 mL

3.3.4 การเตรียมสารละลาย 0.5% methylanthranilate ปิเปต methylanthranilate 0.5 ml แล้วนำไปละลายในเอธานอลจนมีปริมาตรครบ 100 mL

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 ศึกษาค่าการดูดกลืน (Absorbtion spectra)

1. ปิเปต 10 mg/L NO_2^- มา 1.25 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.0 mL จากนั้นเติม 0.5% sulfanilic acid 1.0 mL และ 2.0 mol/L H_2SO_4 2.0 mL นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0 - 5 °C เขย่าประมาณ 5 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา diazotization

2. จากนั้นนำสารในข้อ 1 เติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL และ 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL จากนั้นนำไปตรวจวัดหาค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนสูงสูงสุด

3.4.2 ศึกษาความเข้มข้นเหมาะสมของรีเอเจนต์ (Optimized concentration of reagent)

<u>ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิก</u>

1. เตรียมสารละลายกรดซัลฟานิลิกความเข้มข้น 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปิเปตเอาสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาอย่างละ 1.0 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 25.0 mL จำนวน 6 ใบ

2. เติมสารละลาย 10 mg/L NO_2^- 1.25 mL และ 2.0 mol/L H_2SO_4 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 °C ประมาณ 5 นาที

3. จากนั้นเติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL จากนั้นนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรเพื่อหาค่าการดูดกลืนสูงสูงสุด

ความเข้มข้นของ methylanthranilate

1. เตรียมสารละลาย methylanthranilate เข้มข้น 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาอย่างละ 1.0 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 25.0 mL จำนวน 6 ใบ

2. เติมสารละลาย 10 mg/L NO_2^- 1.25 mL และ 2.0 mol/L H_2SO_4 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 °C ประมาณ 5 นาที

3. จากนั้นเติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL จากนั้นนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรเพื่อหาค่าการดูดกลืนสูงสูงสุด

3.4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของไนไตรท์

1. เตรียมสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ1.0 mg/L โดยปิเปตสารละลายจากสารละลายเผื่อใช้ NO_2^- เข้มข้น 10 mg/L มา 0.00, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 25.0 mL จำนวน 6 ในตามลำดับ

2. เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.5% ลงไปใบละ 1.0 mL และ 2.0 mol/L H_2SO_4 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 °C ประมาณ 5 นาที

3. จากนั้นเติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL แล้วนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนไทรต์ในน้ำดื่มบรรจุขวดและน้ำประปา (Determination of nitrite in Drinking water and watertap)

1. ปิเปตน้ำตัวอย่างมา 2.0 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.0 mL เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.5% ลงไปใบละ 1.0 mL และ 2.0 mol/L HCl 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 ^{o}C ประมาณ 5 นาที

2. เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.5% ลงไปใบละ 1.0 mL และ 2.0 mol/L H_2SO_4 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 ^{o}C ประมาณ 5 นาที

3. จากนั้นเติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL แล้วนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

3.4.5 การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ (Reduction nitrate to nitrite)

ปิเปตสารละลายไนเตรทจากสารละลายเผื่อใช้มา 10 mLลงในขวดรูปชมพู่ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 mL Zn granule 1.0 g และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 mL คนด้วยเครื่อง magnetic stirrer แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สารละลายไนเตรทจะเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whattman) ลงในขวดวัดปริมาตร 100 mL แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL จากนั้นนำสารละลายที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานเช่นเดียวกับ 3.4.3 ต่อไป

3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในน้ำดื่มบรรจุขวดและน้ำประปา (Determination of nitrate in Drinking water and watertap)

1. ปิเปตสารตัวอย่างมา 5.0 mL เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.5% ลงไปใบละ 1.0 mL และ 2.0 mol/L HCl 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0 - 5 ^{o}C ประมาณ 5 นาที

2. เติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL แล้วนำไปตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร แต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.4.7 **การศึกษาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน** (Percent recovery)

1. ปิเปตสารตัวอย่างมา 5.0 mL ใส่งลงในขวดรูปชมพู่เติมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 10 mL/L มา 1.25 mL สารละลายกรดซัลฟานิลิกเข้มข้น 0.5% 1.0 mL และ 2.0 mol/L HCl 2.0 mL ลงไป เขย่าปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 $^{\circ}$C ประมาณ 5 นาที

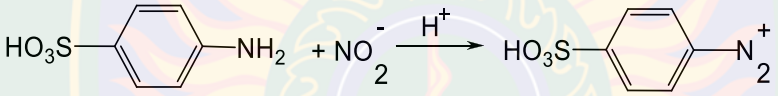
2. เติม 0.5% methylanthranilate 1.0 mL 2.0 mol/L NaOH 1.0 mL สังเกตการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำสารละลายไปปรับปริมาตรจนครบ 25.0 mL แล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร แต่ละตัวอย่างทำการวัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

บทที่ 4

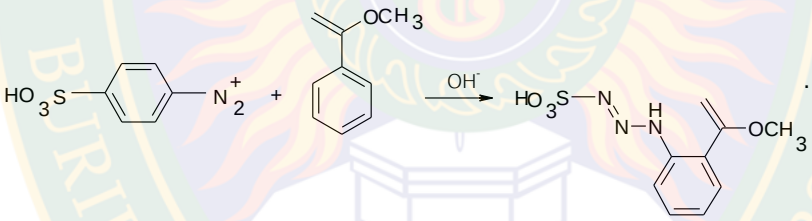
ผลการทดลอง

4.1 การหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืน (Absorption Spectra)

การวิจัยเป็นการสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซเนียมเนียม (diazonium dye) จากปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชัน(diazotization) ระหว่างกรดซัลฟานิลิกกับไนไตรท์ไอออนในสภาวะกรด ได้เกลือไดอะโซเนียมดังสมการ 4.1 จากนั้นนำเกลือไดอะโซเนียมที่ได้ทำปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling) กับเมธิลแอนทรานิเลตในสภาวะเบสได้สารสีชมพูของสีย้อมไดอะโซเนียม (diazo dye) ดังสมการ 4.2

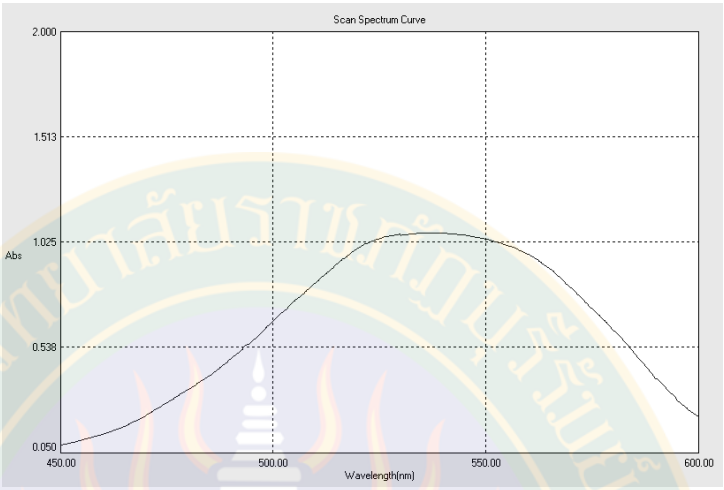


.....(4.1)



.....(4.2)

ไดอะโซดายที่ได้นำไปสแกนความยาวคลื่นที่ให้ค่าดูดกลืนสูงสุด (λ_{max}) ได้ความยาวคลื่น 538 nm ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 การสแกนหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุด (λ_{max})ของ diazo dye

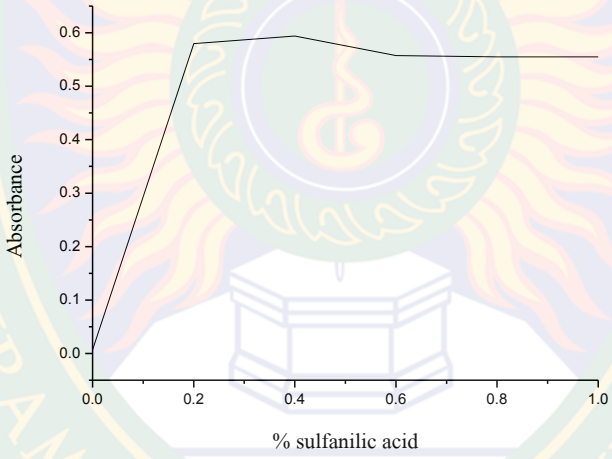
4.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของรีเจนต์ (Effect of Reagents concentration)

4.2.1 ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid)

เมื่อได้ค่า λ_{max} ของสีย้อมไดอะโซเนียมที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุด จากนั้นนำค่าที่ได้ไปศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 % ให้ความเข้มข้นของเมธิลแอนทรานิเลตคงที่ ที่ 0.5% หลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความาวคลื่น 538 nm ดังตาราง 4.1 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟดังรูปที่ 4.2 จากกราฟพบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกที่ให้ค่าการดูดกลืนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.4%

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียมเมื่อใช้กรดซัลฟานิลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ

ความเข้มข้นกรดซัลฟานิลิก (%w/v)	**ค่าการดูดกลืน** (Abs)			**เฉลี่ย**
	1	2	3	
0.000	0.007	0.005	0.009	0.007
0.200	0.590	0.570	0.579	0.580
0.400	0.607	0.591	0.584	0.594
0.600	0.556	0.554	0.562	0.557
0.800	0.556	0.546	0.563	0.555
1.000	0.555	0.545	0.565	0.555



รูปที่ 4.2 สเปกตราแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylanthranilate กับค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียม

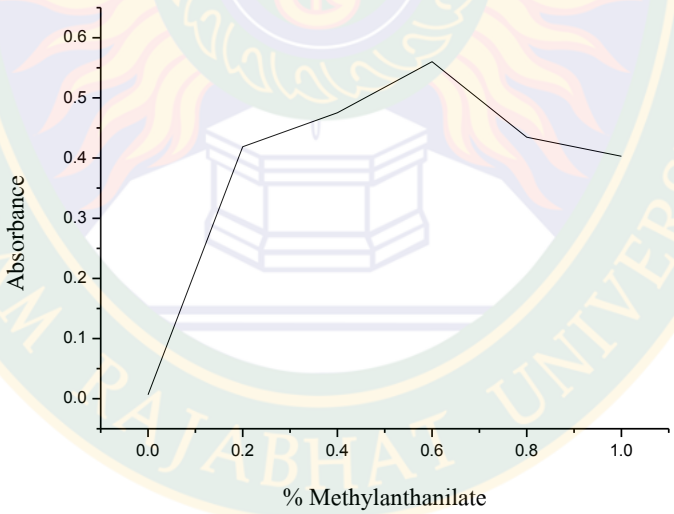
4.2.2 **ความเข้มข้นของ** methylanthranilate

ศึกษาผลความเข้มข้นของ methylanthranilate ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 % ให้ความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกคงที่ ที่ 0.4% หลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 538 nm ดังตาราง 4.2 จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟ

ดังรูปที่ 4.3 จากกราฟพบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกที่ให้ค่าการดูดกลืนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.6%

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนของ สีย้อมไดอะโซเนียมเมื่อใช้ methylanthranilate ที่ความเข้มข้นต่างๆหลังเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ

ความเข้มข้นของ methylanthanilate (%w/v)	**ค่าการดูดกลืน** (Abs)			**เฉลี่ย**
	1	2	3	
0.000	0.008	0.005	0.007	0.007
0.200	0.421	0.409	0.426	0.419
0.400	0.474	0.464	0.488	0.475
0.600	0.565	0.548	0.568	0.560
0.800	0.433	0.424	0.447	0.435
1.000	0.407	0.395	0.407	0.403



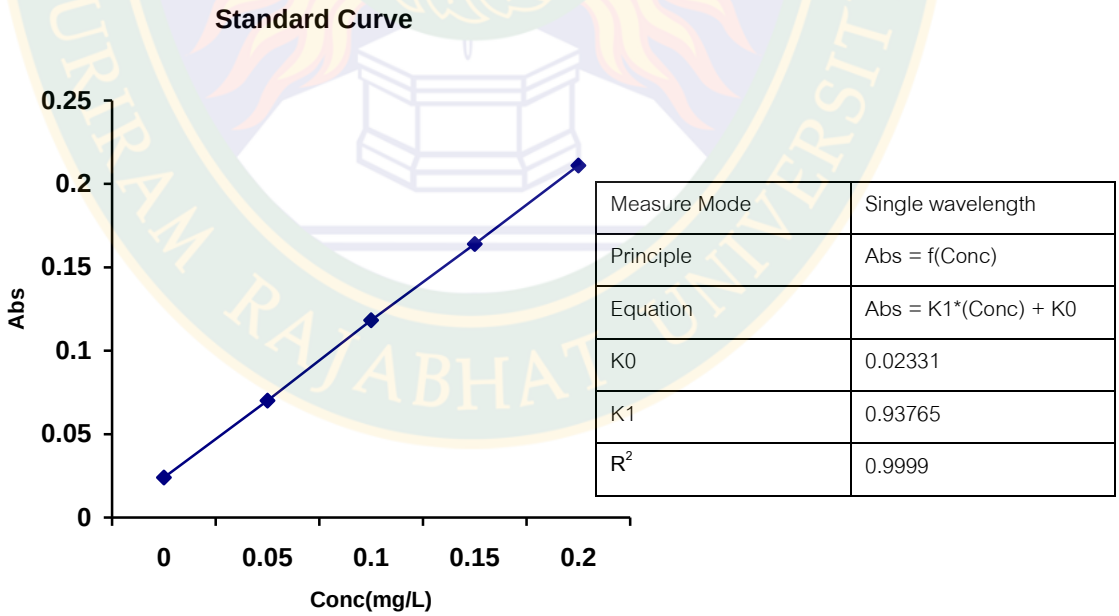
รูปที่ 4.3 สเปกตราแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylanthranilate กับค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียม

4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

หลังจากสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซเนียมและได้ค่า λ_{max} ก่อนนำสีย้อมไดอะโซเนียมไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรท ในการวิเคราะห์หาปริมาณอาศัยกฎของเบียร์ (Beer'S Law) ซึ่งวัดความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของไนไตรท์กับค่าการดูดกลืนดังตาราง 4.3 จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปพล๊อตกราฟดังรูปที่ 4.4

ตาราง 4.3 ค่าการดูดกลืนของสีย้อมไดอะโซเนียมที่ใช้สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับที่	Conc [mg/l]	Abs
1	0.0000	0.024
2	0.0500	0.070
3	0.1000	0.115
4	0.1500	0.164
5	0.2000	0.211



รูปที่ 4.4 กราฟมาตรฐานของสีย้อมไดอะโซที่ใช้ไนไตรท์ความเข้มข้นต่างๆ

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนไทรต์ในตัวอย่างน้ำ

หลังจากศึกษาการสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซและได้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษา จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนไตรท์ในสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานสากล (Standard Methods for the examination of water and waste water, APHA; AWWA; WEF, 1992) ดังตาราง 4.4

ตาราง 4.4 เปรียบเทียบปริมาณไนไตรท์เฉลี่ยที่ตรวจพบในสารตัวอย่าง 100 mL ที่วัดด้วยวิธีที่ศึกษาและวิธีมาตรฐาน

สารตัวอย่าง	ปริมาณไนไตรท์(mg/L) ±SD		F-test	t-test
	วิธีศึกษา	วิธีมาตรฐานสากล		
A	0.0515±0.00197	0.0520±0.00063	0.026	0.568
B	0.0390±0.00245	0.0393±0.00117	0.130	0.883
C	0.0387±0.00279	0.0387±0.00279	1.000	1.000
D	0.0397±0.00281	0.0398±0.00281	1.000	1.000
E	0.0397±0.00280	0.0406±0.00342	0.670	0.857
F	0.0375±0.00232	0.0380±0.00172	0.531	0.584

จากนั้นทำการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ระหว่างวิธีที่ศึกษากับวิธีมาตรฐานสากลโดยวิธี F-test และ วิธี t-test ได้ผลการทดลองดังตาราง 4.4 เมื่อนำค่าที่คำนวณได้เทียบกับค่าในตาราง F-test และ t-test ที่รับความเชื่อมั่น 95% ปรากฏว่าค่าที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่าในตาราง

ตาราง 4.5 ศึกษาร้อยละการกลับคืน

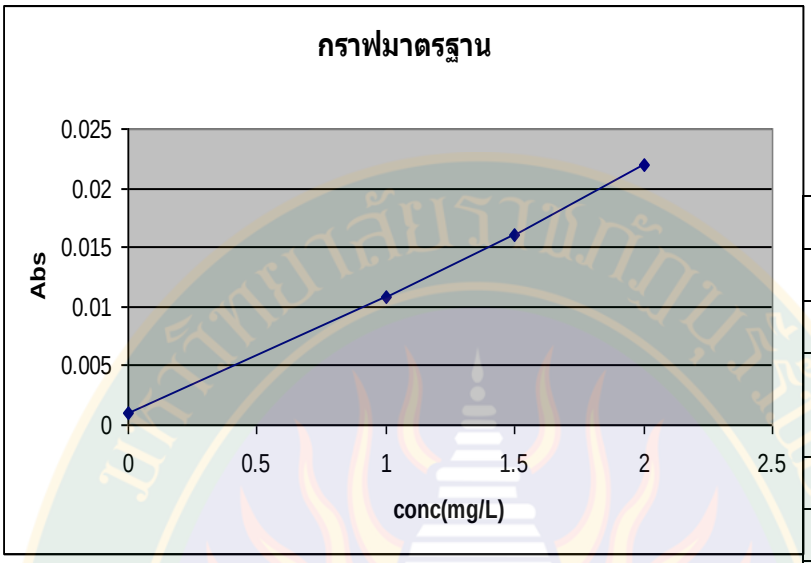
สารตัวอย่าง	วิธีที่ศึกษา			วิธีมาตรฐานสากล		เปรียบเทียบ 2 วิธี	
	ปริมาณไนไตรท์ที่เติม (mg/L)	ปริมาณไนไตรท์ที่พบ (mg/L)*	%recovery	ปริมาณไนไตรท์ที่พบ (mg/L)*	%recovery	F-test	t-test
A	0.5000	0.5490	99.50	0.5970	109.00	0.026	0.568
B	0.5000	0.5833	108.86	0.5553	103.12	0.130	0.883
C	0.5000	0.5020	92.66	0.5030	92.86	1.000	1.000
D	0.5000	0.5370	99.86	0.5390	99.84	1.000	1.000
E	0.5000	0.5413	100.32	0.5400	99.88	0.670	0.857
F	0.5000	0.5190	96.30	0.5300	98.40	0.531	0.584

*จากการทดลอง 6 ครั้ง

จากค่า F-test และ t-test ที่คำนวณได้นำไปเทียบกับค่าในตารางปรากฏว่าค่าที่คำนวณมีค่าน้อยกว่าค่าในตาราง แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในตัวอย่างน้ำ

ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในสารตัวอย่างโดยการรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ด้วยอลูมิเนียม ผง จากนั้นำสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซแล้วนำไปพลอตกราฟมาตรฐานดังรูป 4.5 หลังจาก วิเคราะห์หาไนเตรทในรูปของไนไตรท์จากตัวอย่างน้ำดังตาราง 4.5 (วิธีที่ศึกษา) และตาราง 4.6 (วิธีมาตรฐาน)



Measure Mode	Single wavelength
Principle	Abs = f(Conc)
Order of Curve	1st
Equation	Abs = K1*(Conc) + K0
K0	-0.0015
K1	0.01149
R^2	0.9994

รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานสีย้อมไดอะโซจากการรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

ตาราง 4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในรูปของไนไตรท์ (mg/L)

ชนิดสารตัวอย่าง	ครั้งที่(วิธีที่ศึกษา)						เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND*
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND* = non detected

จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างน้ำทั้ง 6 แหล่งไม่พบมีไนเตรทเจือปนอยู่ ทั้งการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี และเมื่อนำวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไปศึกษาร้อยละการกลับคืนได้ผลดังตาราง 4.7

ตาราง 4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในรูปของไนไตรท์ (mg/L)

ชนิดสารตัวอย่าง	**ครั้งที่(วิธีมาตรฐาน)**						**เฉลี่ย**
	1	2	3	4	5	6	
A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตาราง 4.7 ศึกษาร้อยละการกลับคืนของการรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

สารตัวอย่าง	**วิธีที่ศึกษา**			**วิธีมาตรฐานสากล**		**เปรียบเทียบ 2 วิธี**	
	ปริมาณไนไตรท์ที่เติม (mg/L)	**ปริมาณไนไตรท์ที่พบ (mg/L)±SD**	%recovery	**ปริมาณไนไตรท์ที่พบ (mg/L) ±SD**	%recovery	F-test	T-test
A	0.5000	$0.4875\pm7.64\times10^{-5}$	97.50	$0.4921\pm8.16\times10^{-5}$	98.42	0.0569	7.12×10^{-14}
B	0.5000	$0.4840\pm9.44\times10^{-5}$	96.80	$0.4952\pm7.64\times10^{-5}$	99.04	1.0000	8.55×10^{-11}
C	0.5000	$0.4775\pm2.11\times10^{-4}$	95.50	$0.4975\pm2.11\times10^{-4}$	99.50	0.1007	0.0063
D	0.5000	$0.4771\pm8.98\times10^{-5}$	95.42	$0.4892\pm5.77\times10^{-5}$	97.84	0.0127	1.45×10^{-9}
E	0.5000	$0.4783\pm9.43\times10^{-5}$	95.65	$0.4914\pm3.73\times10^{-5}$	98.27	0.0763	6.74×10^{-8}
F	0.5000	$0.4791\pm7.45\times10^{-5}$	95.82	$0.4934\pm5.77\times10^{-5}$	98.67	0.3055	1.51×10^{-20}

จากตาราง 4.7 จากค่า F-test และ t-test ที่คำนวณได้นำไปเทียบกับค่าในตารางปรากฏว่าค่าที่คำนวณมีค่าน้อยกว่าค่าในตาราง แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทโดยใช้กรดซัลฟานิ-ลิกทำปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชันกับไนไตรท์ เกิดเกลือไดอะโซเนียม แล้วนำเกลือไดอะโซเนียมที่ได้ไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับเมธิลแอนทรานิเลตได้สีย้อมไดอะโซเนียม จากนั้นนำสีย้อมไดอะโซเนียมที่ได้ไปตรวจหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์และไนเตรทต่อไป

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซเนียมเนียม จากปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชัน ระหว่างกรดซัลฟานิลิกกับไนไตรท์ไอออนในสภาวะกรดที่อุณหภูมิประมาณ 0 - 5 องศาเซลเซียสได้เกลือไดอะโซเนียม จากนั้นนำเกลือไดอะโซเนียมที่ได้ทำปฏิกิริยาคู่ควบ กับเมธิลแอนทรานิเลตในสภาวะเบสได้สารสีชมพูของสีย้อมไดอะโซเนียม และนำไปวัดหาความยาวคลื่นหาค่าดูดสูงสุดได้ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

2. สภาวะความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิกที่เหมาะสมในการวิจัยที่ให้ค่าการดูดกลืนสูงสุดคือ 0.4 %(w/v) ส่วนเมธิลแอนทรานิเลตความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.6%(w/v)

3. นำวิธีที่ศึกษาไปวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์จากสารตัวอย่างน้ำทั้งหมด 6 แหล่ง A B C D E และ F คือ 0.0515 ± 0.00197, 0.0390 ± 0.00245, 0.0387 ± 0.00279, 0.0397 ± 0.00281, 0.0397 ± 0.00280 และ0.0375 ± 0.00232 mg/L ตามลำดับ และวิธีมาตรฐานพบปริมาณไนไตรท์ 0.0520 ± 0.00063, 0.0393 ± 0.00117, 0.0387 ± 0.00279, 0.0398 ± 0.00281, 0.0406 ± 0.00342 และ 0.0380 ± 0.00172 mg/L ตามลำดับ

4. เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีเปรียบเทียบโดยค่า F- test และ t – test ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5. การศึกษาร้อยละการกลับคืนมาของวิธีที่ศึกษาคือ 99.50, 108.86, 92.66, 99.86, 100.32 และ 96.30 วิธีมาตรฐานคือ 109.00, 103.12, 92.86, 99.84, 99.88 และ 98.40 ตามลำดับ

6. นำวิธีที่ศึกษาและวิธีมาตรฐานไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตโดยรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรท์จากสารตัวอย่างน้ำทั้งหมด 6 แหล่ง พบว่าไม่มีไนไตรท์เจือปนอยู่

7. การศึกษาร้อยละการกลับคืนมาของวิธีที่ศึกษาคือ 97.50, 96.80, 95.50, 95.42, 95.65 และ 95.82 วิธีมาตรฐานคือ 98.42, 99.04, 99.50, 97.84,98.27 และ 98.67 ตามลำดับ

8. เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีเปรียบเทียบโดยค่า F- test และ t – test ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5.2 วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิธีการสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซโดยให้กรดซัลฟานิลิกทำปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชันกับไนไตรท์ ซึ่งในขั้นตอนที่ปฏิกิริยาจะเกิดเป็นเกลือไดอะโซเนียมผู้ศึกษาจะต้องควบคุมที่อุณหภูมิระหว่าง 0 – 5 องศาเซลเซียส ในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ศึกษาปัจจัยเกี่ยวผลของอุณหภูมิเนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มควรมีการศึกษาเกี่ยวผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียม เมื่อนำเกลือไดอะโซ-เนียมที่ได้ไปทำปฏิกิริยาคู่ควบกับเมธิลแอนทรานิเลตได้สารละลายสีชมพูของสีย้อมไดอะโซ นำสีย้อมไดอะโซที่ได้ไปสแกนหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุดที่ 538 นาโนเมตร

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์เกลือไดอะโซเนียมอีกปัจจัยที่ผู้สนใจจะดำเนินการต่อนอกเหนือความเข้มข้นของกรดซัลฟานิลิก และเมธิลแอนทรานิเลต ควรศึกษาอิทธิพลไอออนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับขบวนการในการสังเคราะห์

หลังจากได้วิธีการสังเคราะห์สีย้อมไดอะโซเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนไตรท์และไนเตรท จากนั้นนำวิธีที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนไตรท์และไนเตรทในสารตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานสากลพบว่าบางตัวอย่างได้ค่าร้อยละการกลับคืนมากกว่าร้อยละร้อย ทั้งนี้อาจเกิดจากการเกิดอินเตอร์แอคชันของสารบางชนิดที่มีในสารตัวอย่างกับสารที่ใช้ใน

กระบวนการสังเคราะห์แล้วทำให้เกิดปริมาณไนไตรท์ขึ้นในระบบ ทำให้ผลการตรวจวัดได้ค่ามากเกินความเป็นจริงได้

เอกสารอ้างอิง

[1] กองวิเคราะห์และทดสอบ กรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ.**อันตรายจากการปนเปื้อนของไนเตรทในน้ำดื่ม ความสำคัญของการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทและการควบคุมคุณภาพน้ำ**. สืบค้นวันที่ 25 พฤศจิกายน 2554,/จาก http://www.navy.mi.th/science/Webpage/newdocument/ni_water.htm

[2] Kimberly S. Cleaves.2003. **Spectrophotometry on the Rise**. Today's Chemist at Work. pp.17-18

[3] Vandenberg C M G and Li H. 1988. **The determination of nanomolar levels of nitrite in fresh and seawater using cathodic stripping voltrammetry.** Anal.Chem. Acta, 212:31.

[4] Badiadka Narayana and Kenchaiah Sunil. 2009. **A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate**. Eurasian J. Anal. Chem. 4(2): 204-214

[5] Borcherding R, et.all. 2000. **Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by nad(p)h fluorescence with a microtiter plate reader**. Anal. Biochem. 281:1.

[6] Wang G F., Satake M. and Horita K. 1998. **Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in water and some fruit samples using columnpreconcentration**. Talanta. 64:671.

[7] อรนุช เรือนคำ เสถียร พีระกุล และสายสุนีย์ เหลืองเรืองวิทย์.//**การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี**Flow injection **Chemiluminescence**.//ค้นเมื่อ 16 พฤศจิกายน 2554,/จาก www.Scisoc.or.th/stt/35/sec_c/paper/STT35.c1_C0187.pdf

[8] Dayananda B P, Revanasiddappa H D. 2007. **Determination of nitrites by the formation of bisazo dye**. Chem. Pap., 61: 446

[9] M. J. Ahmed, C. D. Stalikas, S. M. Tzouwara-Karayanni and M. I. Karayannis. 1996. **Determination of Nitrite and Nitrate in Food Products by Gas Diffusion-Flow Injection Technique Utilizing a Simple LED spectrometric Detector.** Talanta. 43:1009-1018.

[10] แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม. 2539. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่อง มือ** ชวนพิมพ์. 33-107.

[11] Diallo s, et.all. 1996. **A new spectrofluorimetric microdetermination of nitrite in water after derivatization with 4-methyl-7-aminocoumarin**. Talanta, 43:359.

[12] Morris G, William B. 1944. **Outbreak of Sodium Nitrite Poisoning**, American Journal of Public Health. 35: 1217-20

[13] Osvaldo Matteucci, et al. 2008. **Two case of Methemoglobinemia caused by suspected sodium nitrite poisoning.** Vet Ital j. 44 (2): 447-53.

[14] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์-การแพทย์ **พิษภัยจากสารโซเดียมไนไตรท์และโซเดียมไนเตรทในอาหาร**. [สืบค้นวันที่ 20 ส.ค. 2555] จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_food/a_fd_4_00t.asp?info_id=518

[15] Sabharwal s. 1990. **Determination of nitrite ion by differential-pulse polarography using N-(1-naphthyl) ethylenediamine.** Analyst, 115: 1305.

[16] Ann Kaplan, et al. 1990. **Methemoglobinemia due to accidental sodium nitrite poisoning**. S Afr med J. : 300-301.

[17] W.J gowas. 1990. **Fetal methemoglobinemia in a dental nurse, a case of sodium nitrite poisoning**. British journal of general practice, November. 470-2.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สัญลักษณ์แหล่งเก็บน้ำตัวอย่าง

สัญลักษณ์	แหล่งน้ำตัวอย่าง
A	น้ำฝน หมู่บ้านสะแกซำ อ.เมือง จ.บุรีรัมย์
B	น้ำฝน ชุมชนหนองปรือ อ.เมือง จ.บุรีรัมย์
C	น้ำฝน หมู่บ้านหนองสะนาม อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์
D	น้ำประปา หมู่บ้านสะแกซำ
E	น้ำบาดาล ศูนย์สงเคราะห์ผู้สูงอายุ จ.บุรีรัมย์
F	น้ำประปา หมู่บ้านหนองสะนาม อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การเตรียมสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 1000 mg/L จาก $NaNO_2$

มวลโมเลกุลของ $NaNO_2$ = 23 + 14 + (16 x 2)

= 69 g/mol

ต้องการเตรียมสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 1000 mg/L

ถ้าต้องการ NO_2^- 46 กรัม ต้องใช้ $NaNO_2$ 69 กรัม

ถ้าต้องการ NO_2^- 1 กรัม ต้องใช้ $NaNO_2$ $\frac{69 \times 1}{46}$ = 1.500 กรัม

สารละลาย 1000 mL ต้องใช้ $NaNO_2$ 1.500 กรัม

ถ้าสารละลาย 100 mL ต้องใช้ $NaNO_2$ $\frac{1.500 \times 100}{1000}$ = 0.1500 กรัม

แสดงว่า ต้องชั่ง $NaNO_2$ มา 0.1500 กรัม ละลายน้ำจนมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สำหรับการเตรียมสารละลาย NO_3^- เข้มข้น 1000 mg/L จาก KNO_3 ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกันนี้

2. การเจือจางสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ1.0 mg/L จากสารละลายเผื่อใช้ NO_2^- เข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร 25.0 mL

ตัวอย่างการคำนวณ การเจือจางสารละลาย NO_2^- เข้มข้น 0.20 mg/L จากสารละลายเผื่อใช้ NO_2^- เข้มข้น 10 mg/L

จากสมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

แทนค่า $10\ mg/L \times V_1 = 0.20\ mg/L \times 25.0\ mL$

$$V_1 = \frac{0.20\,mg/L \times 25.0\,mL}{10\,mg/L}$$

$V_1 = 0.5\ mL$

ปิเปตสารละลายเผื่อใช้ มา 0.5 mL แล้วปรับปริมาตรจนเป็น 25 mL ในขวดวัดปริมาตร สำหรับการเจือจางสารที่ความเข้มข้นอื่นๆ และสารอื่นๆก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

3. การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากสมการ $S.D. = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N}}$

เมื่อ S.D. คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

x คือ ค่าของข้อมูล

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูล

N คือ จำนวนข้อมูล

ตัวอย่างการคำนวณ การหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารตัวอย่าง A ที่วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยทำการศึกษาเป็นจำนวน 6 ครั้ง

หาค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ของตัวอย่าง

$$\bar{x} = \frac{0.0500 + 0.0540 + 0.0500 + 0.0500 + 0.0540 + 0.0510}{6}$$

$$= 0.0515$$

แทนค่าในสมการการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$S.D. = \sqrt{\frac{(0.0500-0.0515)^2 + (0.0540-0.0515)^2 + (0.0500-0.0515)^2 + (0.0500-0.0515)^2 + (0.0540-0.0515)^2 + (0.0510-0.0515)^2}{6}}$$

$$= 0.00197$$

สำหรับค่าเฉลี่ยและค่าการเบี่ยงเบนของการวิเคราะห์ไนไตรท์ของตัวอย่างและวิธีอื่นๆก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ ข.1 และ ข.2

ตาราง ข.1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธีที่ศึกษา

สาร ตัวอย่าง	ครั้งที่(วิธีศึกษา)						เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5	6		
A	0.0500	0.0540	0.0500	0.0500	0.0540	0.0510	0.0515	0.00197
B	0.0350	0.0410	0.0380	0.0410	0.0410	0.0380	0.0390	0.00245
C	0.0350	0.0420	0.0390	0.0420	0.0420	0.0390	0.0387	0.00279
D	0.0350	0.0430	0.0390	0.0390	0.0420	0.0390	0.0397	0.00281
E	0.0350	0.0420	0.0400	0.0420	0.0420	0.0419	0.0397	0.00280
F	0.0410	0.0380	0.0350	0.0380	0.0360	0.0350	0.0375	0.00232

ตาราง ข.2 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ไนไตรท์ในน้ำตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน

ชนิดสารตัวอย่าง	ครั้งที่(วิธีมาตรฐาน)						เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5	6		
A	0.0520	0.0520	0.0530	0.0520	0.0520	0.0510	0.0520	0.00063
B	0.0380	0.0390	0.0380	0.0410	0.0390	0.0380	0.0393	0.00117
C	0.0350	0.0420	0.0390	0.0420	0.0420	0.0390	0.0387	0.00279
D	0.0350	0.0430	0.0390	0.0390	0.0420	0.0390	0.0398	0.00281
E	0.0350	0.0420	0.0390	0.0450	0.0420	0.0419	0.0406	0.00342
F	0.0410	0.0380	0.0370	0.0380	0.0360	0.0370	0.0380	0.00172

4. การหาค่า F-test และ T-test

ค่า F-test และ T-test เป็นค่าทางสถิติ สามารถหาได้จากสมการดังนี้

การหาค่า F-test

จากสมการ $F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$

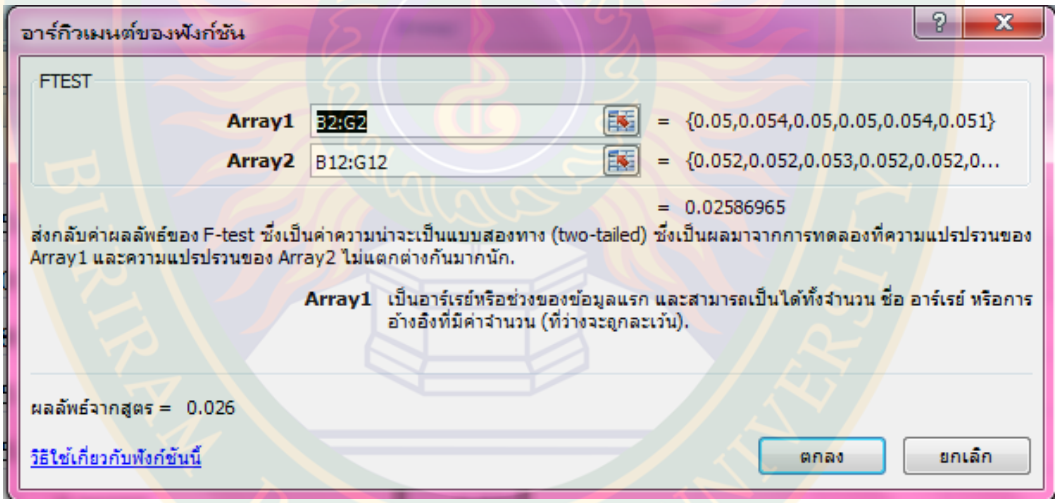
การหาค่า T-test

จากสมการ

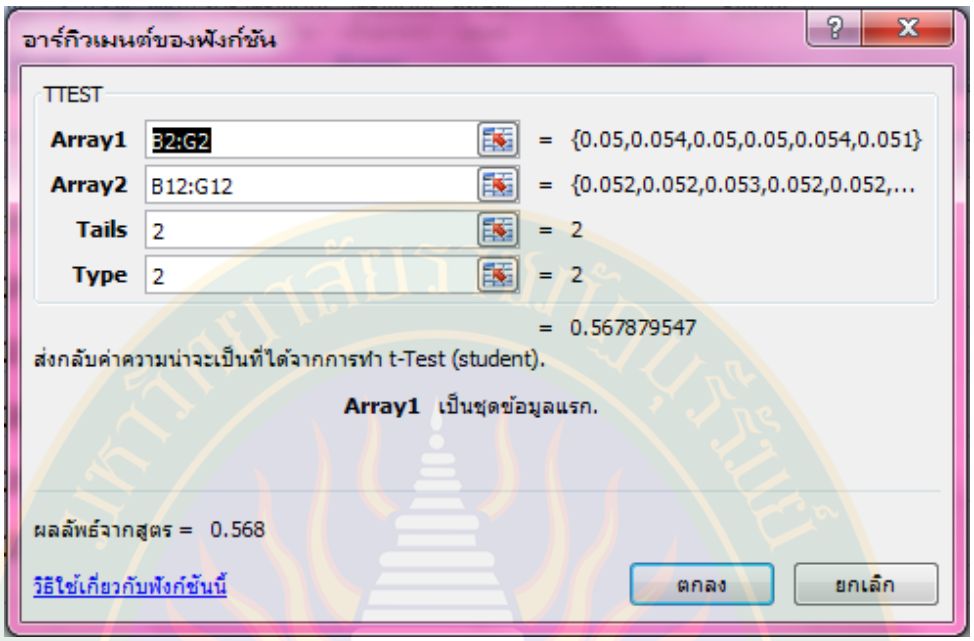
$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2+n_3}\left\{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}\right\}}}$$

$$df = n_1 + n_2 - 1$$

ทำการคำนวณโดยใช้โปรแกรม Microsoft excel โดยกำหนดค่าตัวแปรต่างๆดังรูป



รูปที่ ข.1 แสดงการใส่ตัวแปรต่างๆเพื่อคำนวณค่า F-test



รูปที่ ข.2 แสดงการใส่ตัวแปรต่างๆเพื่อคำนวณค่า T-test

ภาคผนวก ค

ภาพประกอบ

รูปที่ ค.1 เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (model T 60 U)

รูปที่ ค.2 สารละลาย Sulfanilic acid มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ ค.3 สารละลาย methylanthranilate มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ