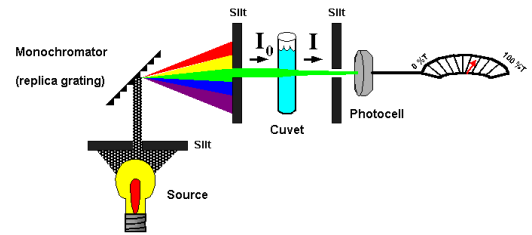


ปฏิบัติการที่ 9

สเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry)



วัตถุประสงค์

ให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในตัวอย่างจริงจากธรรมชาติ ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี

อุปกรณ์

- เตาเผา (Furnace)
- เตาอบ (Oven)
- เครื่องบดตัวอย่าง (Blender)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer ; Spectronic 22)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- ถ้วยกระเบื้อง (Porcelain crucible)
- ทิมทึบ (Thong)
- กรวยกรอง (Funnel)
- กระดาษกรอง No. 1 (Filter paper No. 1)
- ปิเปต (Measuring pipette) ขนาด 2 mL
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 20, 25 และ 1000 mL

สารเคมี

1. Ferrous Ammonium Sulphate
[FeSO₄(NH₄)₂·6 H₂O]
2. 3 M Hydrochloric acid (HCl)
3. 1:10 Hydrochloric acid (HCl)
4. 10 % w/v Hydroxylamine hydrochloride
5. 1% w/v Sodium citrate
6. 0.5% w/v *o*-Phenanthroline monohydrate
7. 0.1 % w/v Bromophenol blue
8. Conc. Sulfuric acid (H₂SO₄)
9. ตัวอย่างพืชอบแห้ง

การดูดกลืนแสงหรือรังสีที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิล (190-800 นาโนเมตร) ของสารตัวอย่างนั้น ส่วนใหญ่ได้แก่พวกสารอินทรีย์ (Organic compound) หรือสารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (Inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สมบัติของสารดังกล่าวนี้ นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอย่างกว้างขวางได้สะดวกรวดเร็ว

เทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า UV-VIS Spectrophotometry แต่ถ้าสารที่ทำการวิเคราะห์ไม่มีสี สารนั้นจะดูดกลืนแสงเฉพาะในช่วงวิสิเบิลเท่านั้น บางครั้งเรียกว่า คัลเลอร์ิเมตรี (Colorimetry)

โดยสีที่ดูดกลืนนั้นสัมพันธ์กับความยาวคลื่นของแสงดังนี้

สีที่มองเห็นด้วยตา	สีที่ถูกดูดกลืน	ความยาวคลื่นที่ถูกดูดกลืน (nm)
Yellow - Green	Violet	400 – 435
Yellow	Blue	435 - 480
Orange	Green – Blue	480 – 490
Red	Blue – Green	490 – 500
Purple	Green	500 – 560
Violet	Yellow – Green	560 – 580
Blue	Yellow	580 – 595
Green – Blue	Yellow	595 – 650
Blue - Green	Red	650 - 750

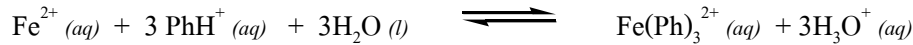
การวิเคราะห์ปริมาณสารในสารละลายด้วยวิธี Spectrophotometry ทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นจากกฎ Lambert – Beer’s Law ดังสมการ

$$\log \frac{P_o}{P} = A = \epsilon bc$$

- เมื่อ P_o, P คือ ความเข้มข้นของแสงที่ตกกระทบสารละลาย และความเข้มข้นของแสงที่ผ่านออกมา
- ϵ คือ สภาพการดูดกลืนแสงของสารในหน่วยโมลาร์
- b คือ ความกว้างของเซลล์บรรจุสารละลายตัวอย่าง หน่วยเซนติเมตร
- c คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างในหน่วยโมลาร์
- A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorption)

การวิเคราะห์ปริมาณ Fe^{2+} ในสารละลาย

เหล็ก Fe^{3+} สามารถรีดิวส์ให้เป็น Fe^{2+} ได้ด้วย Hydroxylamine hydrochloride ซึ่ง Fe^{2+} จะเกิด complex กับ ortho-Phenanthroline เป็นสีแดงส้มดังสมการ



และเพื่อเป็นการป้องกันการตกตะกอนของเกลือบางชนิด ควรให้สารละลายมี pH อยู่ในช่วง 3-4 สารที่จะส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ได้แก่ Mo Cu Ni Sn ส่วน Cd Hg Zn เป็น complex ที่ไม่มีสี

วิธีการทดลอง**การทดลองที่ 9.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเหล็ก (0.100 mg/mL)**

ละลาย 0.5144 กรัม $FeSO_4(NH_4) \cdot 6H_2O$ ด้วยน้ำกลั่น และเติม H_2SO_4 เข้มข้น 1 mL ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1,000 mL ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 mL สารละลายนี้จะมีค่าเข้มข้นเหล็ก 0.100 mg / mL (เจ้าหน้าที่เตรียมให้)

การทดลองที่ 9.2 การทำกราฟมาตรฐาน

- 9.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานเหล็ก 0.5 mL ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 mL เติมสารละลาย Bromophenol blue ลงไป 5-6 หยด ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 3-4 โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย Sodium citrate ที่ละลายจาก Graduate pipette จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวใบไม้แห้ง หรือเขียวขี้ม้า (สารละลายจะมี pH อยู่ในช่วง 3-4)
- 9.2.2 บันทึกปริมาตรของสารละลาย Sodium citrate เพื่อนำไปใช้ในข้อ 9.2.3 และเทสารละลายทิ้งไป
- 9.2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานเหล็กมาใหม่ 0.2 , 0.4 , 0.6 mL ใสลงในขวดวัดปริมาตร 20 mL 3 ใบ แต่ละใบเติมสารละลาย Hydroxylamin hydrochloride 0.25 mL เติมสารละลาย o-Phenanthroline 0.5 mL แล้วเติมสารละลาย Sodium citrate ปริมาตรเท่ากับที่บันทึกไว้ในข้อ 9.2.2 เขย่าแล้ว
- 9.2.4 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีด จะได้สารละลายปริมาตร 20 mL
- 9.2.3 เตรียมสารละลาย Blank ในขวดวัดปริมาตร 20 mL โดยไม่ใส่สารละลายมาตรฐานของเหล็กลงไป แต่เติมสารละลายต่าง ๆ เหมือนในข้อ 9.2.- 9.3
- 9.2.4 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 508 nm โดยใช้สารละลาย Blank เป็นตัวปรับค่าศูนย์ การวัดค่าการดูดกลืนแสง(A) ของสารตัวอย่าง ควรอยู่ระหว่าง 0.1A – 1.0 A
- 9.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสง (A) กับความเข้มข้นของเหล็ก (mg/mL) ไปเขียนกราฟมาตรฐาน

การทดลองที่ 9.3 การเตรียมตัวอย่าง

- 9.3.1 นำตัวอย่างสดมาตากแห้งหรืออบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (เจ้าหน้าที่เตรียมให้)
- 9.3.2 บดตัวอย่างที่อบแห้งแล้วให้ละเอียด (เจ้าหน้าที่เตรียมให้)
- 9.3.3 ชั่งตัวอย่างแห้ง 1.0000 - 2.0000 gm ลงในถ้วยกระเบื้อง (เจ้าหน้าที่เตรียมให้)
- 9.3.4 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500-550 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง (เจ้าหน้าที่เตรียมให้)
- 9.3.5 หลังจากปิดเตาเผาประมาณ 1 ชั่วโมง นำถ้วยกระเบื้องออกมา ทิ้งไว้ให้เย็น
- 9.3.6 เติม 3 M HCl 1 mL ลงในถ้วยกระเบื้องและอุ่นใน water bath ในตู้ควัน ประมาณ 10 นาที
- 9.3.7 กรองสารละลายจากถ้วยกระเบื้องลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 20 mL
- 9.3.8 ล้างถ้วยกระเบื้องด้วย 1:10 HCl 3 mL 2 ครั้ง แต่แต่ละครั้งกรองลงในขวดวัดปริมาตรเดิม
- 9.3.9 ล้างถ้วยกระเบื้องด้วยน้ำร้อนอีก 2 ครั้ง แต่แต่ละครั้งที่ล้างให้กรองลงในขวดวัดปริมาตรเดิม
- 9.3.10 ปรับปริมาตรให้ครบ 20 mL โดยเติมน้ำกลั่นให้ถึงระดับขีด

การทดลองที่ 9.4 การหาปริมาณเหล็กในสารละลายตัวอย่าง

- 9.4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 2.00 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 20 mL เติมสารละลาย Bromophenol blue ลงไป 5-6 หยด แล้วค่อยๆ เติมสารละลาย Sodium citrate ลงไปที่หยดจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียวใบไม้แห้ง (เขียวจืด) เหมือนข้อ 9.2.1
- 9.4.2 ใ้บันทึกปริมาตรของ Sodium citrate ใ้ไว้ในข้อ 9.4.2 และเทสารละลายทิ้งไป
- 9.4.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 2.00 mL ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 mL เติม สารละลาย Hydroxylamine hydrochloride 0.25 mL และเติมสารละลาย o-Phenanthroline 0.50 mL เติม สารละลาย Sodium citrate ปริมาตรเท่ากับที่บันทึกไว้ในข้อ 9.4.2 เขย่าแล้ว
- 9.4.4 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ เติมน้ำกลั่นจนถึงขีด จะได้สารละลายมีปริมาตร 20 mL (เทสารละลายนี้เก็บไว้ในบีกเกอร์) ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- 9.4.5 นำสารละลายทั้งสองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 508 nm แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณ Fe ในตัวอย่าง
- 9.4.6 นำค่าทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย

หมายเหตุ 9.3.1 – 9.3.5 เจ้าหน้าที่เตรียมไว้ให้แล้ว ให้ น.ศ. ทำ 9.3.6 เป็นต้นไป

ปฏิบัติการที่ 9

สเปกโตรโฟโตเมทรี

(Spectrophotometry)

รหัสประจำตัว.....ชื่อ - สกุล.....
 หมายเลขตู้.....วันที่ทำการทดลอง.....เวลา.....น.

การทดลองที่ 9.2 การทำกราฟมาตรฐาน

ปริมาตรสารละลายมาตรฐานเหล็ก (mL)	ความเข้มข้น Fe ²⁺ (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\max} = 508$

เขียนกราฟมาตรฐาน (Standard curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็ก



การทดลองที่ 9.4 การหาปริมาณเหล็กในสารละลายตัวอย่าง

ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง (mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (A)

จากกราฟ: อ่านปริมาณ Fe^{2+} ได้ = mg/mL

ตัวอย่าง.....กรัม มี Fe^{2+} = mg/mL

ตัวอย่าง.....กรัม มี Fe^{2+} =mg %(w/v)

ตัวอย่าง.....กรัม มี Fe^{2+} =mg %(w/w)

แสดงการคำนวณ ความเข้มข้นของ Fe^{2+} ในหน่วย mg %(w/v) และ mg %(w/w)

$$mg\%(w/v) = \frac{mg \text{ ของ } Fe^{2+}}{mL \text{ ของตัวอย่าง}} \times 100$$

$$mg\%(w/w) = \frac{mg \text{ ของ } Fe^{2+}}{gram \text{ ของตัวอย่าง}} \times 100$$

(ส่งภายในชั่วโมงปฏิบัติการ)