

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 化學科

最佳(鄉土)教材獎

040208

硝魂使者—NO₂性質探討與偵測

學校名稱：國立北港高級中學

作者： 高二 楊家乘 高二 吳郁芬 高二 陳怡穎	指導老師： 陳建志
-----------------------------------	--------------

關鍵詞：Griess Reagent、NO₂、偵測劑

摘要:

本實驗中我們找到 $\text{NO}_{2(g)}$ 的偵測劑：Griess reagent。其吸附 $\text{NO}_{2(g)}$ 會產生偶氮化合物而呈玫瑰紅色。並且發現 $\text{NO}_{2(g)}$ 在不同濃度下具有不同的反應選擇性，但 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 並無此現象。即過量 $\text{NO}_{2(g)}$ 可以根據其反應條件，調節其所產生的反應。

因為 Griess reagent 可以檢測亞硝酸鹽含量，而食品中常添加硝酸鹽用以增色、防腐與抑制細菌生長，所以我們取各式樣本推算其硝酸鹽含量。發現各樣品中自然存在的亞硝酸鹽很少，大都以硝酸鹽形式存在。

我們也發現蔬菜樣品放置越久，其所含的硝酸鹽會快速增加，推測可能是由於細菌產生硝化作用所致，只要隔絕細菌的作用，就可避免硝酸鹽的大量產生。

為了方便偵測、保存和攜帶，我們將 Griess reagent 製作成各式偵測劑，可以更簡易的偵測氣態的 NO_2 與水中的亞硝酸鹽。

壹、研究動機

NO_2 在生活當中的分布廣泛，而且它的特性也相當有趣，所以我們抱持著對 NO_2 的好奇，開始做 NO_2 的相關研究。由於 NO_2 存在自然界很多方面，所以我們希望就氣態的 NO_2 與 NO_2 溶於水產生亞硝酸鹽來加以研究。氣態 NO_2 方面，希望檢驗 NO_2 含量多寡與其偵測劑吸光度關係；亞硝酸鹽方面，希望能藉由 NO_2 偵測劑檢測水庫中、蔬菜中亞硝酸的含量，了解 NO_2 存在自然界與互相轉換的關係。最後我們希望能藉由我們的研究，使大家更了解 NO_2 變化與其所造成的危害。

貳、研究目的

- 一、尋找最佳 NO_2 的偵測劑。
- 二、 NO_2 偵測劑在不同反應條件下的性質變化。
- 三、研究 NO_2 偵測劑加入 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 和 $\text{NO}_{2(g)}$ 反應的變化。
- 四、探討水溶液中硝酸鹽及亞硝酸鹽的性質與轉換。
- 五、探討各種樣本(水庫、蜜餞、香腸)中硝酸鹽及亞硝酸鹽的含量。
- 六、製作更方便、靈敏與便宜的 NO_2 偵測劑。

參、研究設備及藥品

表一：實驗器材

設備	試管(大 x10，小 x50)	滴管 x5
	燒杯(大 x5，小 x5)	棕色瓶 x2
	量筒(大 x5，小 x5)	手套 16 雙
	刮勺 x2	玻璃棒 x1
	秤量紙 x5	電子秤 x2
	抽風櫃 x1	銅線 2 包

	加熱器	定量瓶
	針筒(大 x1，小 x1)	鋼針 2 支
	分光光度計 (SP-830: 光譜帶寬 5nm、波長範圍 320~1100nm、 吸收值 0.0001Abs、穿透率 0.01%T) (本實驗測量值, 採用偶氮化合物的特性吸收波 長 524nm)	UV 燈 (UVGL-25: 短波: 254nm 長 波: 365nm) (本實驗採用短波 254nm 做為 實驗光源)
藥品	純洋菜粉	硝酸(HNO ₃)適量
	冰醋酸(H ₂ SO ₄)	間氨基苯磺酸(C ₆ H ₇ NO ₃ S)
	鹽酸(HCl)	硝酸鈉(NaNO ₂)
	雙氧水(H ₂ O ₂)	純水(H ₂ O)
	鹽酸萘乙二胺(C ₁₂ H ₁₄ N ₂ · 2HCl)	

肆、研究過程與方法

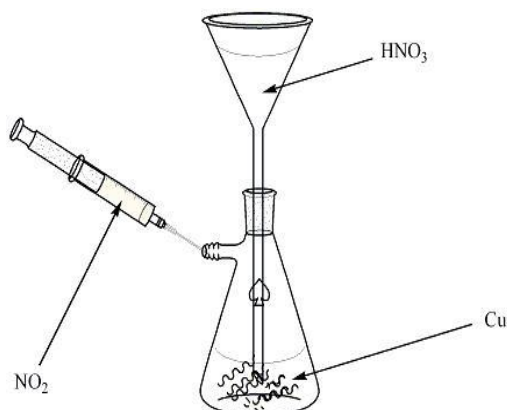
一、NO₂的製作

(一)由參考資料可知濃 HNO₃ 與 Cu 可產生 NO_{2(g)}



所以本實驗及採用此方法獲取 NO_{2(g)}

(二)將錐形瓶、薊頭漏斗、塞子組裝，如下圖:



圖一：製作 NO_{2(g)}與抽取 NO_{2(g)}方法

- 1.將銅線剪成段狀，將適量的銅線放入錐形瓶中後，塞上塞子。
- 2.倒入適量的硝酸，輕輕的搖晃錐形瓶，直至瓶中顏色漸漸變成橘色。
- 3.以針筒抽取 NO₂時，需緩慢抽取，而且至抽取適當濃度時停留數秒待針筒內壓力與外壓(1atm)相等時候才打入試劑做實驗，而由於抽風櫃會產生壓力差，所以我們以垃圾袋與膠帶自製簡易的乾燥箱(dry box)以維持一大氣壓。



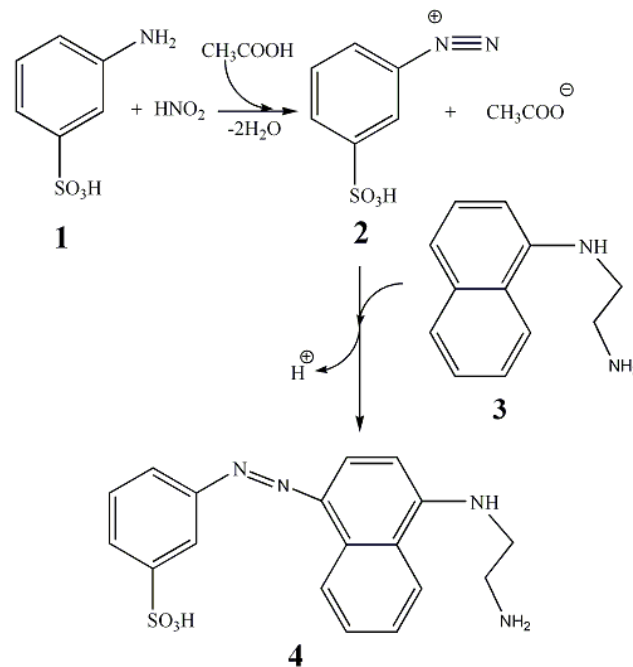
圖二：自製簡易的乾燥箱(dry box)

二、NO₂偵測劑：Griess reagent 調配

(一)研究構思：

根據過去研究報告和資料中得知：亞硝酸鹽類可藉由和 Griess reagent 產生反應而有顏色變化，而過去常常當成染料來使用(偶氮染料)，或是亞硝酸鹽類的偵測劑。由於 NO₂ 溶於水可以產生 HNO₃ 和 HNO₂，因為產生亞硝酸根(NO₂⁻)所以我們就想到以 Griess reagent 當成我們 NO₂ 的偵測劑。

本實驗利用間氨基苯磺酸和鹽酸萘乙二胺製作出 Griess reagent，再利用此試劑檢測二氧化氮濃度。由過去的研究資料，將其反應機構繪製成圖三，可知間氨基苯磺酸(化合物 1)與 HNO₂ 反應產生化合物 2，而化合物 2 再與鹽酸萘乙二胺(化合物 3) 產生偶氮化合物(化合物 4)，化合物 4 即為玫瑰紅色的偶氮化合物。而 Griess reagent 即由化合物 1 與化合物 3 混合而成的溶液。



圖三：Griess reagent 與亞硝酸產生偶氮化合物

(二)試劑調配

1. 在電子秤上放置一張秤量紙，秤得間氨基苯磺酸 2.5g，將其倒入燒杯中，分次加水 (共 350ml)，使用玻璃棒攪拌，直至完全溶化。
2. 秤得鹽酸萘乙二胺 0.030g 將其倒入燒杯中，攪拌直至完全溶化。
3. 倒入冰醋酸 30ml，攪拌片刻。
4. 將半成品到入定量瓶中，加水至 500ml，蓋上塞子，搖晃定量瓶片刻，最後將其倒入棕色瓶中。

三、Griess reagent 性質檢測

(一)氧化劑中 Griess reagent 性質變化

倒出 5ml Griess reagent 於 A、B 兩試管，將 A 試管加 1ml $\text{H}_2\text{O}_{2(\text{aq})}$ ，B 試管為對照組(再加入 1ml Griess reagent)，反應 5 分鐘後，兩試管分別加入 1ml $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，將 A、B 兩管測其吸光度。

(二)光照下 Griess reagent 性質變化

分別倒出 5ml Griess reagent 於 A、B、C、D 試管，將 A、B、C、D 試管加蓋。A、B 試管置於紫外燈管下反應 10 分鐘與 30 分鐘；C、D 試管為對照組。再分別加入 1ml $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，測其吸光度。

(三)高溫下 Griess reagent 性質變化

分別倒出 5ml Griess reagent 於 A、B 兩試管。將 A 試管置於 100°C 沸水中 30 分鐘，B 試管置於室溫(25°C)作為對照組。兩試管再分別加入 1ml $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，測其吸光度。

(四)酸性溶液中 Griess reagent 性質變化

分別倒出 5ml Griess reagent 於 A、B 兩試管分別加入 1ml 的 $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，再取 A 試管加 1ml、2ml 與 3ml 的 $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (12M)，B 試管為對照組(加入 1ml、2ml 與 3ml 的 Griess reagent)，測其吸光度。

(五)鹼性溶液中 Griess reagent 性質變化

分別倒出 5ml Griess reagent 於 A、B 兩試管，取 A 試管加 1ml $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ (12M)，B 試管為對照組(再加入 1ml Griess reagent)，再各加入 1ml 的 $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，測其吸光度。

四、Griess reagent 的反應

(一)Griess reagent 在不同 NO_2 體積下反應

取 10 支試管各加入 5ml Griess reagent 蓋上血清塞並以鋼針置於液面下，分別打入 0.2ml $\text{NO}_{2(\text{g})}$ 並逐次增加 0.2ml，並由 0.2ml 測至 2ml，分別測其吸光度。

(二)Griess reagent 在不同 $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ 濃度下反應

取 7 支試管各加入 5ml Griess reagent，分別打入 1ml $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ ，並調整 $\text{NaNO}_{2(\text{aq})}$ 濃度為 1M、 10^{-1}M 、 10^{-2}M 、 10^{-3}M 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-6}M ，分別測其吸光度。

(三)Griess reagent 在不同 $\text{NaNO}_{3(\text{aq})}$ 濃度下反應

將 10ml 濃度分別為 10^{-3}M 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 的 $\text{NaNO}_{3(\text{aq})}$ 加入鋅粉過濾，並分別取出 1ml 的濾液，分別加入 5ml Griess reagent，最後測量其吸光度。

五、水溶液中的硝酸鹽

(一)水庫樣本

取 2、4、6、8、10ml 的水樣品，加入 10ml Griess reagent 測其吸光度；另一組則是先加入鋅粉過濾，取濾液 2、4、6、8、10ml 分別加入 10ml Griess reagent 測其吸光度。

(二)食品樣本(芒果乾、烏梅、香腸)

各取一芒果乾(5.11g)、烏梅(5.53g)、香腸(13.42g)樣本分別泡入 40ml 純水中，等待 30 分鐘過濾，取其 2ml 濾液再加入 4ml Griess reagent，測其吸光度。

(三)蔬菜樣本

取蔬菜樣本 70g(高麗菜)加入 40ml 純水打碎成汁，過濾後加入鋅粉反應，最後再過濾一次，取其 2ml 濾液加入 4ml Griess reagent，測其吸光度。間隔數天後再重覆本實驗。

伍、實驗結果

一、氧化劑中 Griess reagent 性質變化

(一)Griess reagent + $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 後再加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 後，發現加入氧化劑形成偶氮化合物的玫瑰紅色較淺(如圖四)，若加愈多 $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 其顏色越淺，並且吸光度也愈低。



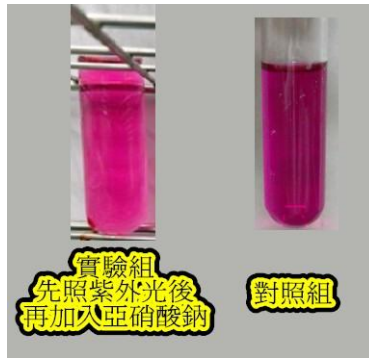
圖四：Griess reagent 先加入過氧化氫後再加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 反應後與對照組比較

表二：Griess reagent 先加入過氧化氫後再加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 反應後與對照組之吸光度差別

	5ml Griess reagent 在不同反應條件	吸光度
對照組	先加 1ml Griess reagent 再加 1ml $\text{NaNO}_2(\text{aq})$	0.582
實驗組	先加 1ml $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 再加 1ml $\text{NaNO}_2(\text{aq})$	0.41

二、光照下 Griess reagent 性質變化

(一)Griess reagent 用紫外燈照射 10 分鐘與其對照組，發現原本透明的 Griess reagent 呈現黃褐色，如圖五：



圖五：Griess Reagent 照紫外光後再加入亞硝酸鈉後與對照組的比較(10 分鐘)

而照光 30 分鐘後，發現顏色變化如圖六：



圖六：Griess Reagent 照紫外光後再加入亞硝酸鈉後與對照組的比較(30 分鐘)

表三：比較 Griess Reagent 照紫外光不同分鐘後再加入亞硝酸鈉後與對照組的吸光度差別

第一組			第二組		
	5ml Griess reagent 在不同反應條件	吸光度		5ml Griess reagent 在不同反應條件	吸光度
對照組	加 1ml NaNO_2 (aq)	0.692	對照組	加 1ml NaNO_2 (aq)	0.692
實驗組	先照光 10 分鐘 再加 1ml NaNO_2 (aq)	0.805	實驗組	先照光 30 分鐘 再加 1ml NaNO_2 (aq)	0.904

三、高溫下 Griess reagent 性質變化

Griess reagent 加熱到 100°C 後，與其對照組(室溫 25°C 中)，加熱 30 分鐘後冷卻至室溫，結果如表四。

表四：Griess reagent 高溫實驗與對照組吸光度之比較

第一組		
	5ml Griess reagent 在不同反應條件	吸光度
對照組	加 1ml NaNO_2 (aq)	0.692
實驗組	先加熱 30 分鐘 再加 1ml NaNO_2 (aq)	0.636

四、酸性溶液中 Griess reagent 性質變化

Griess reagent+NaNO_{2(aq)}反應後，再加入不同體積的 HCl_(aq)，進行吸光度的比較，可以發現 Griess reagent 形成偶氮化合物後加入越多的 HCl_(aq) 其吸光度會慢慢降低。

表五：Griess reagent 先加入 NaNO_{2(aq)}再加入不同體積 HCl_(aq)之比較

5ml Griess reagent 在不同反應條件		吸光度	PH 值
對照組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 1ml Griess reagent	1.436	2.54
實驗組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 1ml HCl _(aq)	1.143	-0.2
5ml Griess reagent 在不同反應條件		吸光度	PH 值
對照組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 2ml Griess reagent	1.356	2.26
實驗組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 2ml HCl _(aq)	0.647	-0.3
5ml Griess reagent 在不同反應條件		吸光度	PH 值
對照組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 3ml Griess reagent	1.309	2.3
實驗組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 3ml HCl _(aq)	0.323	<-0.5



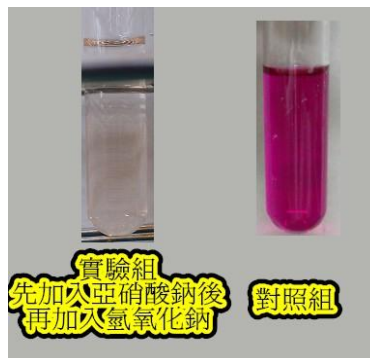
圖七：Griess Reagent 與亞硝酸鈉反應後加入鹽酸與對照組的比較

五、鹼性溶液中 Griess reagent 性質變化

(一)Griess reagent 加 1ml NaNO_{2(aq)}再加入 12M NaOH_(aq) 1ml，與其對照組比較。發現偶氮化合物在鹼性液中其吸光度下降。

表六：Griess reagent 先加入亞硝酸鈉後再加入氫氧化鈉與對照組之吸光度比較

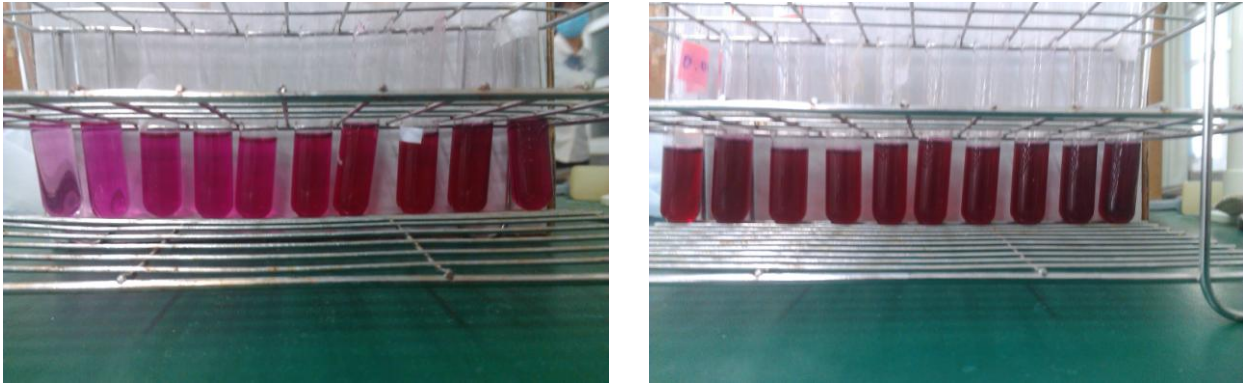
5ml Griess reagent 在不同反應條件		吸光度
對照組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 1ml Griess reagent	0.582
實驗組	先加 1ml NaNO _{2(aq)} 再加 1ml NaOH _(aq)	0.290



圖八：Griess reagent 先加入亞硝酸鈉後再加入氫氧化鈉與對照組之比較

六、Griess reagent 在不同體積 $\text{NO}_2(\text{g})$ 下反應

(一)取 5ml 的 Griess reagent 加入不同體積 $\text{NO}_2(\text{g})$ ，其顏色變化如圖十一，



圖九：加入不同體積的 $\text{NO}_2(\text{g})$ ，由左 0.02ml 到右 2.0ml

測其吸光度如表七，可以大致上看到吸光度數值隨加入 $\text{NO}_2(\text{g})$ 量增加時，而有慢慢增加的趨勢，直到加入 0.8ml $\text{NO}_2(\text{g})$ ，其吸光度達到最高值 3.82 後就不再變化，而達到一極限值。

表七：打入不同 $\text{NO}_2(\text{g})$ 量的 Griess reagent 之吸光度

5ml Griess reagent 中 打入 $\text{NO}_2(\text{g})$ 量(ml)	吸光度	5ml Griess reagent 中 打入 $\text{NO}_2(\text{g})$ 量(ml)	吸光度
0.02	0.183	0.20	2.537
0.04	0.462	0.40	3.29
0.06	0.841	0.60	3.73
0.08	0.962	0.80	3.82
0.10	1.043	1.00	3.82
0.12	1.337	1.20	3.82
0.14	1.592	1.40	3.82
0.16	1.761	1.60	3.82
0.18	2.043	1.80	3.82
0.20	2.537	2.00	3.82

七、Griess reagent 在不同 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 濃度下反應

取 5ml 的 Griess reagent 加入不同濃度($1\text{M}\sim 10^{-6}$)的 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 各 1ml，可以發現其顏色變化如圖十：



圖十：Griess reagent 分別加入不同濃度($1\text{M}\sim 10^{-6}$)的 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$

測其吸光度數據如表八， $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 由 10^{-6} M 到 10^{-3} M，其吸光度由 0.004 增至 3.82；而 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 由 10^{-3} M 到 1M 時，其吸光度反而由 3.82 降至 0.117。

表八：Griess reagent 在不同濃度的 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 中之比較

5ml Griess reagent 在不同濃度(M)的 NaNO_2 中	吸光度
10^{-5}	0.004
10^{-4}	0.028
10^{-3}	0.690
10^{-2}	3.82
10^{-1}	3.80
1	0.117

八、 $\text{NaNO}_3(\text{aq})$ 加入鋅粉進行還原反應

將 10ml 濃度分別為 10^3M 、 10^4M 、 10^5M 的 $\text{NaNO}_3(\text{aq})$ 加入鋅粉過濾，加入 Griess reagent，測其吸光度。發現吸光度並不隨著濃度而改變。



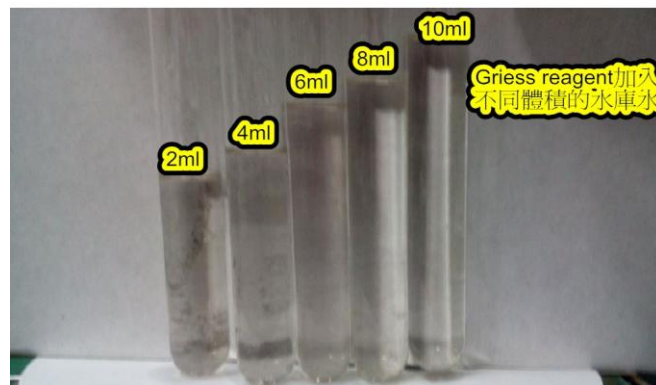
圖十一：Griess reagent 加入不同濃度的硝酸鈉+鋅粉

表九：Griess reagent 加入不同濃度的硝酸鈉加鋅粉各 1ml 之吸光度

硝酸鈉加鋅粉之 濾液濃度	Abs
10^3M	0.034
10^4M	0.022
10^5M	0.024

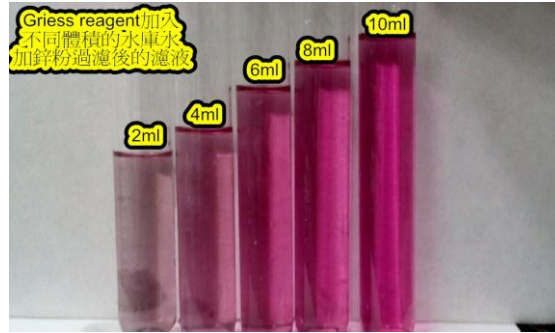
九、水溶液中的硝酸鹽

(一)將水庫水過濾後，加入 Griess reagent，觀察其顏色變化。



圖十二: Griess Reagent 加入不同體積的水庫水

將水庫水加入過量鋅粉過濾，再加入 Griess reagent，觀察其顏色變化。



圖十三: Griess Reagent 加入以鋅粉過濾過的水庫水

(二)其吸光度資料如表，比較其亞硝酸含量之差異。

表十：不同體積的水庫水與鋅粉過濾水庫水之吸光度

	2ml	4ml	6ml	8ml	10ml	blank
水庫水	-0.014	-0.018	-0.024	-0.025	-0.027	-0.047
鋅粉過濾之水庫水	0.078	0.127	0.189	0.219	0.267	-0.039

十、食品中的硝酸鹽

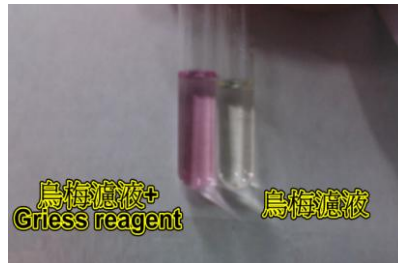
(一)實驗不同食品待測物泡水過濾後，加入鋅粉反應，結果如表，發現待測物之水溶液能夠使 Griess reagent 有顏色變化。

表十一：Griess reagent 加入不同試樣之吸光度

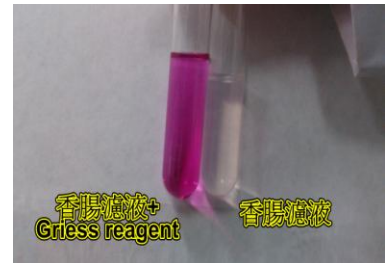
	背景值	加完後的吸光度
芒果	0.036	0.065
烏梅	-0.033	0.058
香腸	0.115	0.676



圖十四：芒果濾液與加入 Griess reagent



圖十五：烏梅濾液與加入 Griess reagent



圖十六：香腸濾液與加入 Griess reagent

(二)將蔬菜樣本(高麗菜)打碎成汁，過濾後加入鋅粉反應，測其吸光度，結果如下：

表十二：Griess reagent 加入高麗菜+鋅粉之吸光度

	高麗菜(3/6)	高麗菜(3/11)	高麗菜(3/17)
Abs	0.407	2.625	2.854
背景值	0.298	1.018	0.98



圖十七：高麗菜濾液與加入 Griess reagent 的濾液

陸、實驗討論

一、Griess reagent 標準液濃度的計算

(一)Griess reagent 的配製與標準液的濃度計算：

間氨基苯磺酸 mole = $2.5 \text{ (g)} \div 173.19 \text{ (分子量)} = 1.4435 \times 10^{-2} \text{ (mole)}$

鹽酸萘乙二胺 mole = $0.03 \text{ (g)} \div 259.18 \text{ (分子量)} = 1.157 \times 10^{-4} \text{ (mole)}$

由反應(圖二)可知鹽酸萘乙二胺與間氨基苯磺酸為 1:1 配對形成偶氮化合物，且間氨基苯磺酸過量，所以直接以鹽酸萘乙二胺的濃度當成 Griess reagent 的濃度。

(二)標準液配製：

〔鹽酸萘乙二胺〕 = $1.157 \times 10^{-4} \div 0.5 \text{ (升)} = 2.314 \times 10^{-4} \text{ M}$

(三)由於 Griess reagent 吸收 NO_2 後變成玫瑰紅色的偶氮化合物，因此可藉由顏色深淺，判斷偶氮化合物的濃度。

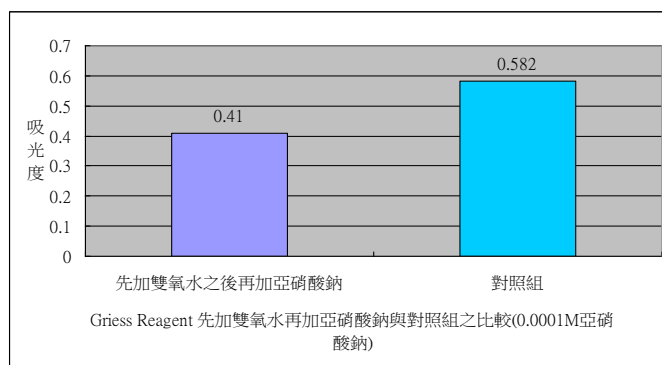
(四)取 Griess reagent 40ml 加入過量 $\text{NO}_2(\text{g})$ (10ml)，完全反應成偶氮化合物，所以可由

〔鹽酸萘乙二胺〕 = $2.314 \times 10^{-4} \text{ M}$ = 〔偶氮化合物〕 = 〔標準液〕 = $[\text{HNO}_2]$ ，因此可以由 Griess reagent 的變成偶氮化合物的濃度(可由比色法求出)來決定 HNO_2 濃度。而又藉由反應式 $2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{HNO}_2$ ，可知 $2[\text{HNO}_2] = [\text{NO}_2]$ 。

二、氧化劑中 Griess reagent 性質變化

Griess reagent 加入 $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 的實驗中，發現 Griess reagent 顏色變黃，再加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 後，無明顯玫瑰紅色，並且其吸光度下降。

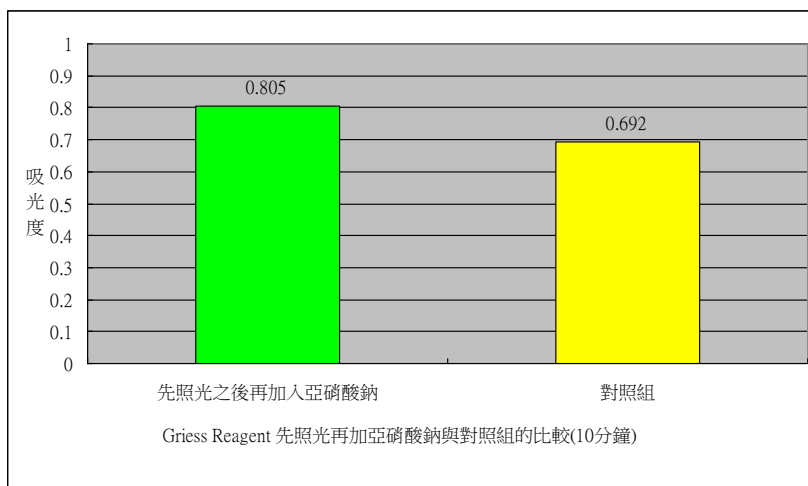
Griess reagent 加 $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 時，顏色由透明變成微黃，可能是 Griess reagent 中的間氨基苯磺酸或鹽酸萘乙二胺與 $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ 產生微黃色的副產物，而由於 Griess reagent 成分化合物改變，所以再加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 時，無法再形成玫瑰紅色的偶氮化合物。並且此微黃色的副產物在波長 524nm 附近也有吸收，導致雖然沒有偶氮化合物產生，卻仍有吸光度的現象。



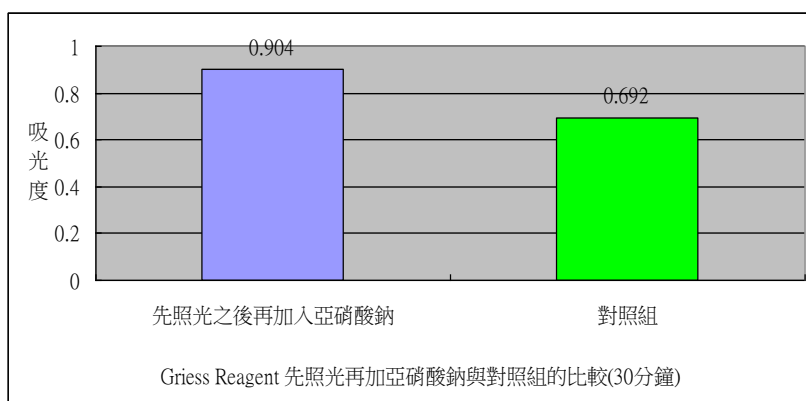
圖十八：Griess reagent 加入氧化劑反應完後再與 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 反應

三、光照下 Griess reagent 性質變化

由分光光度計測其吸光度得到圖十九(照光 10min)與圖二十(照光 30min)的結果。

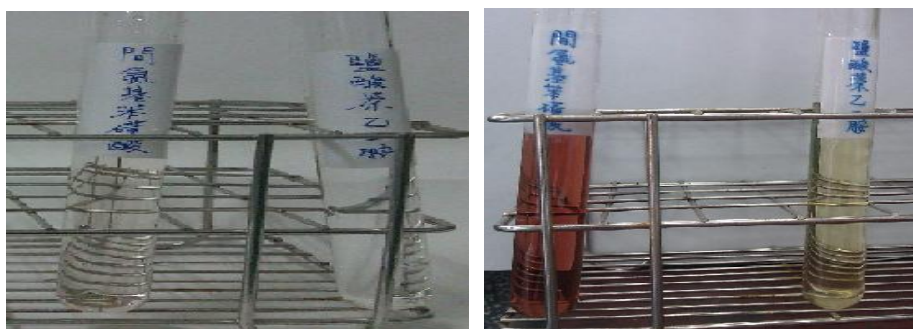


圖十九:Griess Reagent 與亞硝酸鈉反應後照紫外光的比較(10 分鐘)



圖二十：Griess Reagent 與亞硝酸鈉反應後照紫外光的比較(30 分鐘)

將 Griess reagent 照光，發現試劑顏色從透明改變為黃橘色(測其吸光度為 0.2，因此 Griess reagent 光照後的副產物也有吸收)，再打入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 之後，發現顏色不再為玫瑰紅色，而是淡粉紅色，測其吸光度反而上升(實驗組吸光度 0.763；對照組吸光度 0.692)。為了瞭解這個現象，於是取間氨基苯磺酸和鹽酸萘乙二胺加水單獨照光(圖二十一)，發現間氨基苯磺酸的顏色由透明轉為黃橘色；鹽酸萘乙二胺的顏色由透明轉為黃綠色。由於 Griess reagent 照光後的顏色變化，與間氨基苯磺酸的顏色相近，所以推測光照可能會改變間氨基苯磺酸的結構(其結構中的胺基照光後，可能產生自由基而改變反應)，並且此副產物在波長 524nm 的位置吸收，因此造成照光後的偶氮化合物吸光度(偶氮化合物加上副產物)不降反升。



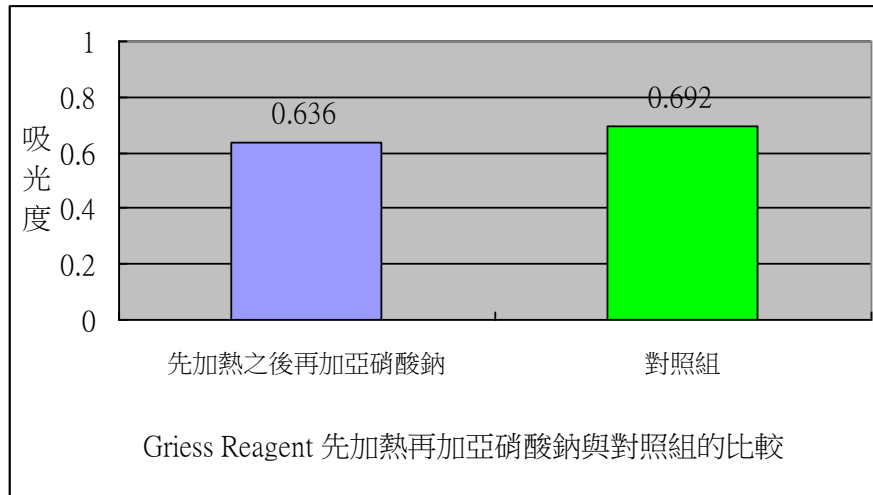
圖二十一：間氨基苯磺酸和鹽酸萘乙二胺加水單獨照光

並且由數據也可以發現：光照 30 分鐘(0.973)的吸光度都比光照 10 分鐘(0.763)高。所以推測此副產物會隨光照時間增加而增加。

綜合以上幾點，我們推測光照會使 Griess reagent 產生不同的副產物，而此副產物在波長 524nm 的位置有吸光度，所以光照時吸光度不降反升。

四、高溫下 Griess reagent 性質變化

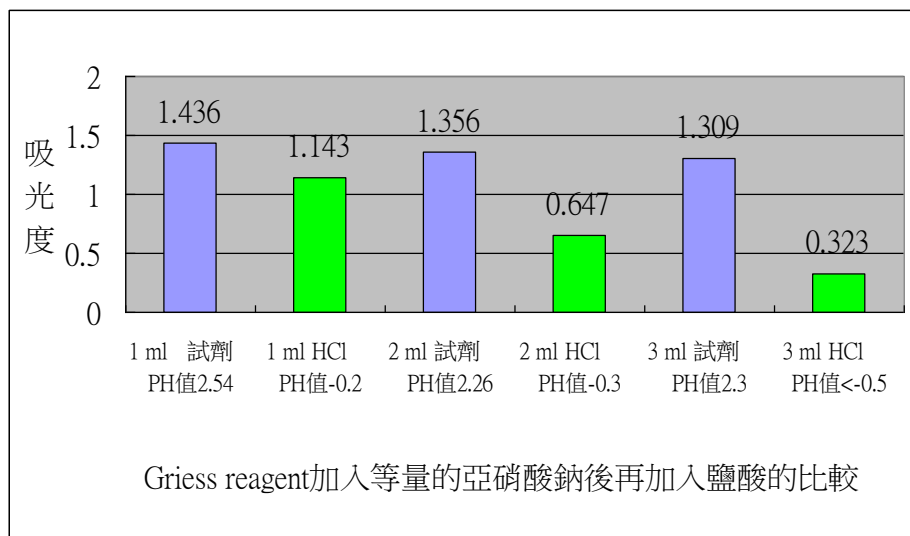
Griess reagent 加熱實驗中，取試劑加熱 30 分後，發現顏色仍為透明，再打入 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 之後，偶氮化合物維持玫瑰紅色，但其吸光度稍微下降(由 0.692 降至 0.636)，推測升溫對於 Griess reagent 影響較不明顯。



圖二十二：Griess reagent 與亞硝酸鈉反應前加溫的比較

五、酸性溶液中 Griess reagent 性質變化

實驗結果中可以發現在 Griess reagent 中加入鹽酸，顏色無太大差異，但其吸光度會降低，加入越多的 $\text{HCl}_{(aq)}$ ，吸光度下降越多。

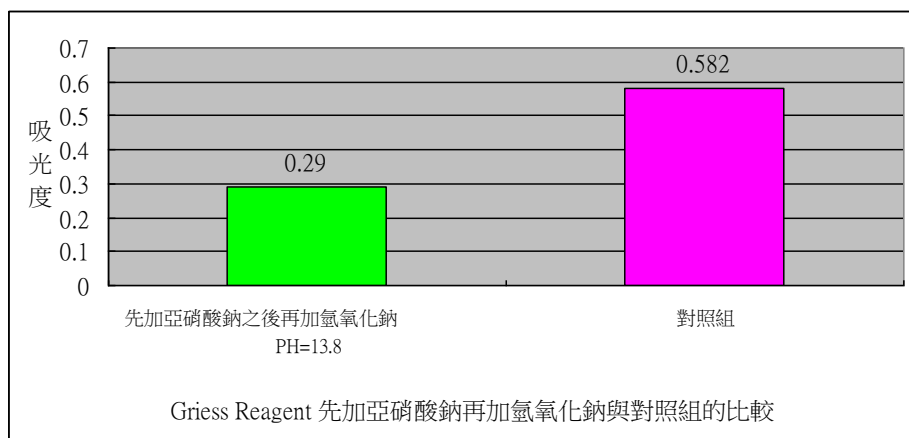


圖二十三：Griess reagent 先加 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 再加入不同體積鹽酸的吸光度

推測鹽酸中的 H^+ 離子可能與偶氮化合物中的胺基部份產生反應，而破壞偶氮化合物的結構，因此產生玫瑰紅色偶氮化合物變少，所以導致其吸光度下降。

六、鹼性溶液中 Griess reagent 性質變化

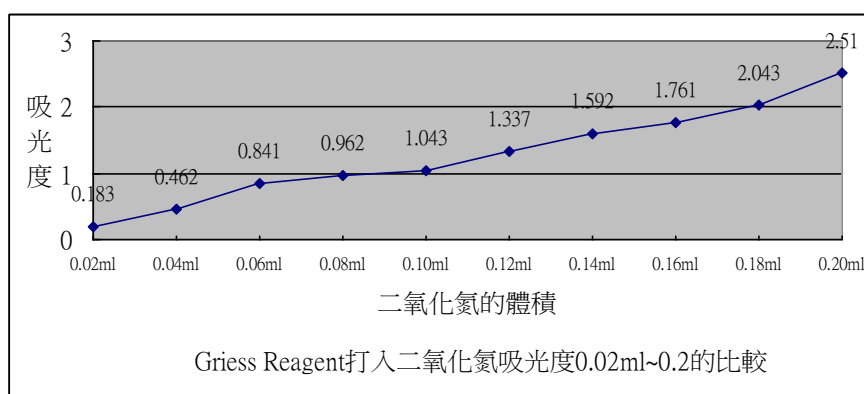
Griess reagent 加入 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 後，當再加入氫氧化鈉後，發現偶氮化合物玫瑰紅色褪去，以分光光度計測量後，發現吸光度由 0.582 降至 0.290，推測氫氧化鈉使偶氮化合物中的重氮部份，或胺基部份而改變結構。



圖二十四：Griess reagent 先加 $\text{NaNO}_2(\text{aq})$ 再加氫氧化鈉之吸光度

七、Griess reagent 在不同 $\text{NO}_2(\text{g})$ 體積下反應

(一)由數據可以知道，打入 Griess reagent 中的 $\text{NO}_2(\text{g})$ 的量由 0.02ml 至 0.2ml 逐漸增加時，其吸光度也隨之升高，推測 $\text{NO}_2(\text{g})$ 的量打入越多，其溶解到水中的 NO_2 量也越多，所以轉化成 HNO_2 的量變多，最後造成 Griess reagent 形成玫瑰紅色的偶氮化合物的量增加，吸光度也跟著升高。



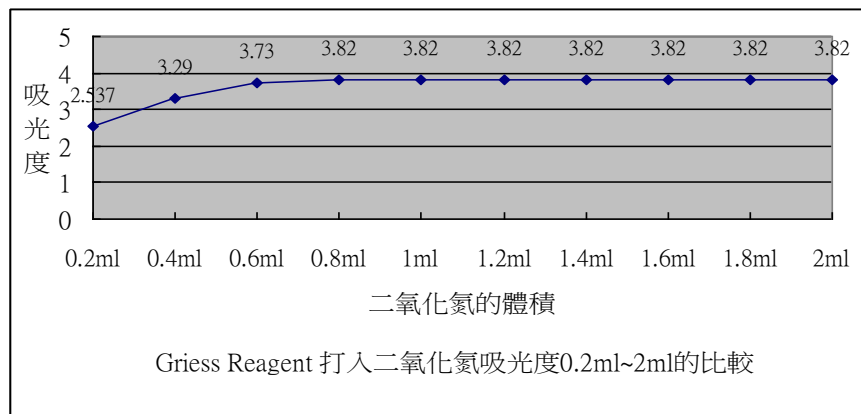
圖二十五：Griess reagent 在不同 $\text{NO}_2(\text{g})$ 體積下反應(0.02ml~0.2ml)

而打入的 $\text{NO}_2(\text{g})$ 由 0.2ml 至 2ml 時，可以清楚發現：打入 0.2ml 至 0.8ml 吸光度也是隨打入的量 $\text{NO}_2(\text{g})$ 增加而增加(由 2.537 增加至 3.82)，如圖二十五。0.8ml 至 2ml 時，不管打入的量 $\text{NO}_2(\text{g})$ 如何增加，其吸光度始終維持 3.82，如圖二十六。

這是一個相當特別的現象，理論上打入的 $\text{NO}_2(\text{g})$ 增加時，其吸光度應隨之上升，可是卻始終維持在一極限值，所以我們猜想 $\text{NO}_2(\text{g})$ 除了產生亞硝酸根的反應外 ($2\text{NO}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3(\text{aq}) + \text{HNO}_2(\text{aq})$)，應該還有其他的副反應(如 $2\text{NO}_2(\text{g}) \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4(\text{g})$) 產生，所以達到調節的功能。

所以當 $\text{NO}_2(\text{g})$ 少量時，反應會趨向進行溶於水產生亞硝酸根；而當 $\text{NO}_2(\text{g})$ 過量時，由於偶氮化合物消耗完，而 $\text{NO}_2(\text{g})$ 的氧化力又不足以破壞偶氮化合物的結構，

所以 $\text{NO}_2(g)$ 會趨向於轉化成其他的副產物(如 $2\text{NO}_2(g) \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4(g)$)，而有調節的功能。



圖二十六：Griess reagent 在不同 $\text{NO}_2(g)$ 體積下反應(0.2ml~2ml)

計算：

已知 5ml 的 Griess reagent 濃度 = [鹽酸萘乙二胺] = $2.314 \times 10^{-4} \text{ M}$

又其極限吸光度 = 3.82 達到此值，表示溶液中 Griess reagent 完全轉變

根據比爾定律可知 $A = \epsilon bc$ 代入數值

$$3.82 = \epsilon \times 1\text{cm} \times 2.314 \times 10^{-4} \text{ 可得 } \epsilon = 1.65 \times 10^4$$

以打入 0.4ml $\text{NO}_2(g)$ 為例

$A = \epsilon bc$ 代入數值

$$3.29 = (1.65 \times 10^4) \times 1\text{cm} \times [\text{NO}_2^-] \text{ 可得 } [\text{NO}_2^-] = 1.994 \times 10^{-4} \text{ (M)}$$

所以 NO_2^- 的 mole = $1.994 \times 10^{-4} \times (5 \times 10^{-3})$ (因為體積 = $5 \times 10^{-3} \text{ L}$)

$$= 9.97 \times 10^{-7}$$

又根據理想氣體方程 $PV = nRT$

$$\text{NO}_2 \text{ 的 mole} = [1\text{atm} \times (0.4 \times 10^{-3} \text{ L})] \div [(0.082) \times 298 \text{ K}] = 1.63 \times 10^{-5}$$

因此可以算出 $\text{NO}_2(g)$ 轉換成亞硝酸根(NO_2^-)的比例

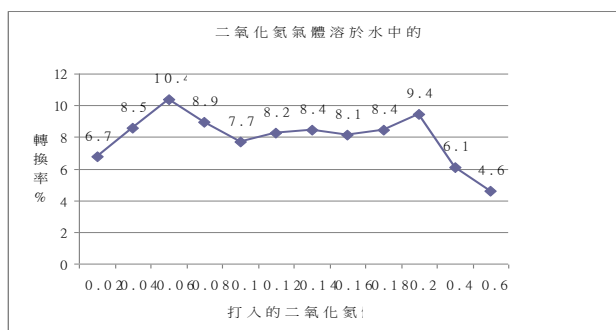
$$P\% = [(9.97 \times 10^{-7}) \div (1.63 \times 10^{-5})] \times 100\% = 6.12\%$$

根據以上的算式可得下表：

表十三： $\text{NO}_2(g)$ 轉化成 NO_2^- 比率

打入 $\text{NO}_2(g)$ 體積(ml)	$\text{NO}_2(g)$ 轉化成 NO_2^- 比率(%)	打入 $\text{NO}_2(g)$ 體積(ml)	$\text{NO}_2(g)$ 轉化成 NO_2^- 比率(%)
0.02	6.79	0.14	8.44
0.04	8.58	0.16	8.17
0.06	10.41	0.18	8.43
0.08	8.93	0.2	9.42
0.1	7.74	0.4	6.11
0.12	8.27	0.6	4.62

將表十三轉換為圖二十七，可以發現打入氣體由 0.02ml 至 0.2ml 時，其轉化率有逐漸上升的趨勢，表示水溶液中 NO_2^- 的量隨打入 $\text{NO}_2(g)$ 而上升，即氣體越多轉化率越大；而由 0.2ml 至 0.6ml 時，發現 NO_2^- 的量隨打入 $\text{NO}_2(g)$ 而下降，並且在 0.2ml 具有最大的轉化效果，推測可能溶液中可以溶解氣體量已經慢慢達到飽和，當氣體溶解量越多可能有另一副反應同時產生，並隨溶液中 $\text{NO}_2(g)$ 增加而加速副反應進行，即 $\text{NO}_2(g)$ 產生的反應與其在溶液中的濃度有極大的相關。

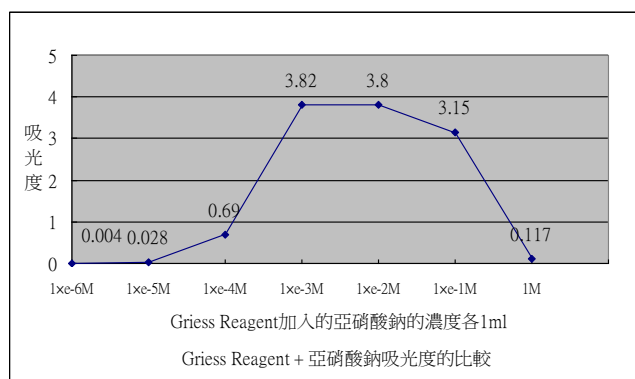


圖二十七：Griess reagent 打入二氧化氮之轉換

八、Griess reagent 在不同 NaNO_2 濃度下反應

由數據可以知道，加入 Griess reagent 中的 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 的量由 10^{-6}M 到 10^{-3}M ，其吸光度由 0.004 增至 3.82，其吸光度也隨之升高，推測 NaNO_2 液體的量加入越多，其產生的 NO_2^- 的量增加，而使得 Griess reagent 形成玫瑰紅色的偶氮化合物的量增加，吸光度也跟著升高。

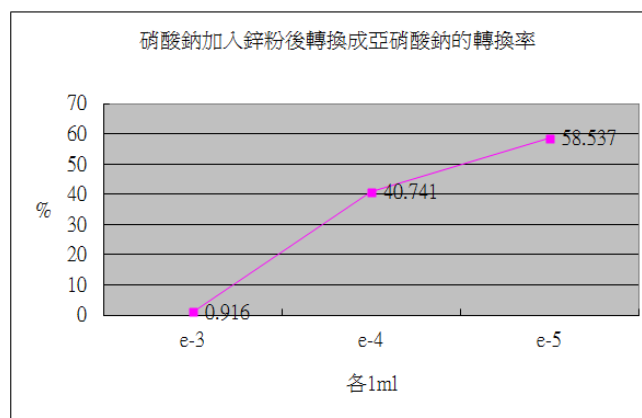
而 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 由 10^{-3}M 到 1M 時，其吸光度反而由 3.82 降至 0.117，其吸收量隨之下降，理論上 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 量增加時，其吸光度應隨之上升，可是吸光度卻隨 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 的量增加而下降，所以我們猜想加入過多 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 時，由於 NO_2^- 本身的氧化力足以破壞偶氮化合物的結構，而導致吸光度隨 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 的量增加而下降。



圖二十八:Griess reagent 加入亞硝酸鈉的吸光度

九、Griess reagent 在不同 NaNO_3 濃度下反應

發現 NaNO_3 加入鋅粉後的濾液與 Griess reagent 會產生反應，因為 Griess reagent 只與 NO_2^- 產生反應，所以可以知道硝酸根有部份轉為亞硝酸根，由濾液測得的吸光度與同濃度亞硝酸鈉的吸光度比較，可以從中得到 NO_3^- 轉換成 NO_2^- 的轉換率。



圖二十九： NO_3^- 轉換成 NO_2^- 的轉換率

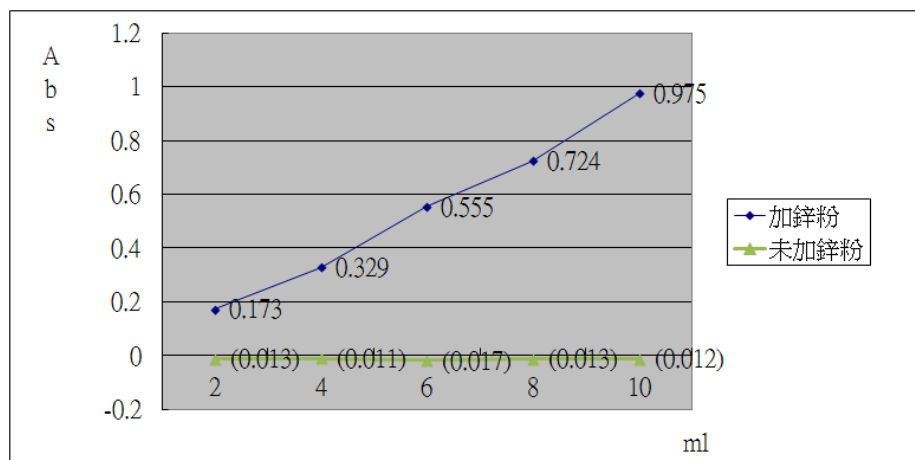
發現隨著 NaNO_3 濃度越低， NO_3^- 轉換為 NO_2^- 比率反而越高。根據以上結果推測： NaNO_3 濃度可能會影響其產生的反應。當 NO_3^- 濃度低時，轉換為 NO_2^- 較少，轉換的 NO_2^- 直接與 Griess reagent 作用；而濃度高時，剛開始轉換為 NO_2^- 較多，而較多 NO_2^- 的容易進行其他反應(例如：自身氧化還原反應 $2\text{H}^+ + 3\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{NO} + \text{H}_2\text{O}$)，使 NO_2^- 轉換為其他物質，而只有部分與 Griess reagent 作用，測得吸光度低，因此其轉化率低。

十、水溶液中的硝酸鹽

從實驗可以得知水庫水中的 NaNO_2 含量是趨近於零的，由於 NO_2^- 本身不穩定，容易受外部作用(例如：細菌作用)，而轉變為穩定的 NO_3^- 。將水庫水加入過量的鋅粉反應後，其吸光度會隨著加入濾液的增加而上升，藉由以下公式將吸光度還原再除於轉換率還原回去：

$$\text{測得的吸光度} = \frac{\text{欲知的體積}}{\text{總體積}} \times \text{欲知的吸光度} + \frac{\text{背景的體積}}{\text{總體積}} \times \text{背景的吸光度}$$

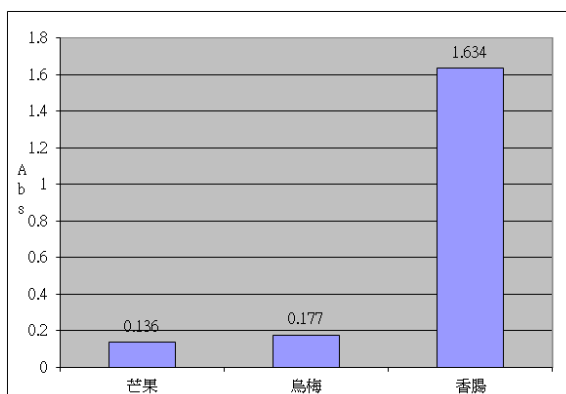
可以得到圖：



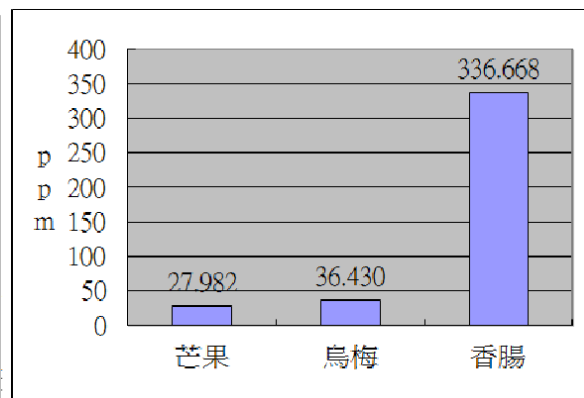
圖三十：水庫樣品吸光度與濃度關係

十一、食品中的硝酸鹽

根據數據可以製成圖三十一，並且經過計算，將吸光度換成百萬分之濃度(ppm)可以製成圖三十二。



圖三十一：食品樣本中硝酸鹽吸光度



圖三十二：食品樣本中硝酸鹽百萬分之濃度

計算：以芒果為例

根據水溶液中的硝酸鹽之算法可扣除背景值，還原其吸光度為 0.0795

又因為 NO_3^- 轉換為 NO_2^- 的轉化率為 $0.0795 \div 14.6341\% = 0.54325$

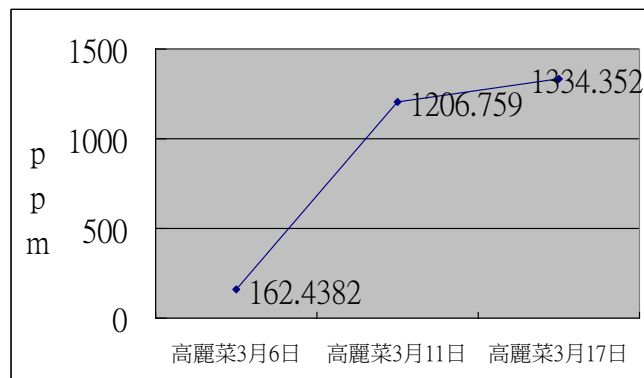
再根據比爾定律可求出體積莫爾濃度

$A = 1.65 \times 10^4 \times bc$ 代入數值 $0.54325 = (1.65 \times 10^4) \times 1\text{cm} \times [\text{NO}_2^-]$

所以 NO_2^- 濃度為 $3.29243 \times 10^{-5} \text{M}$ 因此百萬分之濃度等於 $3.29243 \times 10^{-5} \times 84.99$ (硝酸鈉之分子量) = 27.982 ppm

發現食品樣本皆有顏色變化，由於醃漬食品時，常加入硝酸鹽類增色、防腐與增加風味，所以加銨還原後，可藉 Griess reagent 發現硝酸鹽的蹤跡。並且香腸的硝酸鹽遠高於其他兩者，可能是肉製品容易腐敗和細菌附生，所以會添加較多硝酸鹽類來抑制細菌生長。

將蔬菜樣本的實驗數據經過計算轉換成濃度，可以看出蔬菜樣本的硝酸鹽含量很高，由於種植蔬菜時會使用大量肥料，肥料中的硝酸鹽被植物吸收後，如果植物來不及代謝就被採收，硝酸鹽即殘留在植物體內。所以如果能在採收前停止施肥，將有助於植物體代謝硝酸鹽，減少食用時的硝酸鹽攝取。



圖三十三：蔬菜隨時間硝酸鹽的變化

根據實驗結果也可發現，植物體內的硝酸鹽會隨放置的時間慢慢增加，這是一個很有趣的現象。根據參考資料可以得知：植物會由於細菌的硝化作用，而將體內氫氧化物轉變為硝酸鹽，並且由實驗數據可以發現蔬菜放置 12 天，其硝酸鹽濃度由 162ppm 升高至 1334ppm，甚至比香腸 336ppm 高好幾倍。

過去人們總是說，香腸中含有硝酸鹽容易產生亞硝胺致癌，而從我們的數據可以發現放置一段時間(約一個禮拜)的蔬菜中含的硝酸鹽也是不容忽視(甚至是香腸的好幾倍)。

由於蔬菜放越久硝酸鹽會增高，所以我們就想到以放置時間最久的泡菜來檢測其硝酸鹽含量，結果如表：

表十四：泡菜中硝酸鹽的吸光度

	背景吸光度	測得的吸光度	轉換為百萬分之濃度
泡菜	0.004	0.644	16.965 ppm

令人驚訝的發現：泡菜中硝酸鹽的含量反而非常低，因此推測可能是植物體要轉化出硝酸鹽，必須要在細菌的作用下才可進行，而泡菜中高滲透壓環境讓細菌無法生存，因而硝酸鹽沒有多大變化。

所以蔬菜盡量要趁新鮮食用，放越久的蔬菜硝酸鹽越多，如要長久放置，必須要阻絕細菌的作用(例如：醃製、冷凍等)，才可避免產生過多致癌的硝酸鹽。

柒、實驗結論

一、Griess reagent 在高溫(100°C)下的環境都不易產生質變，但在強烈光照與高度氧化的影響下會變質。

二、Griess reagent 在鹽酸及氫氧化鈉中，其吸光度皆有下降的趨勢。加入鹽酸的部份，推測氫離子與 Griess reagent 的胺基產生反應而無法形成偶氮化合物；加入氫氧化鈉的部份，推測氫氧離子攻擊 Griess reagent 中的間胺基苯磺酸的磺酸部份，因而轉變成其他的副產物，所以無法形成偶氮化合物。Griess reagent 在酸性下較鹼性穩定。並且形成偶氮化合物時又更加穩定，推測偶氮化合物的結構能穩定間胺基苯磺酸的胺基與磺酸部份，因而不易與氫離子或氫氧離子產生反應。

三、Griess reagent 加入 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 後，發現吸光度隨加入的量而升高。而吸光度到達一極限值後，會隨 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 加入量而下降，推測過多的 NO_2^- 藉由還原作用會破壞偶氮化合物的結構(可能使偶氮化合物中重氮部份還原)，導致偶氮化合物的量減少，因此吸光度也隨 $\text{NaNO}_{2(aq)}$ 的量增加而下降。

四、將 Griess reagent 加入 $\text{NO}_{2(g)}$ 發現吸光度先隨濃度上升而升高，當吸光度到達一極限值後， $\text{NO}_{2(g)}$ 濃度繼續增加時其吸光度卻不再升高。推測當 $\text{NO}_{2(g)}$ 增加時，則溶解的 NO_2 跟著提高，其轉化成 HNO_2 的量升高，所以造成 Griess reagent 反應成玫瑰紅色的偶氮化合物的量隨之增加。

而當其吸光度到達極限值時，吸光度卻維持不變，推測 $\text{NO}_{2(g)}$ 除了產生亞硝酸根的反應外($2\text{NO}_{2(g)} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_{3(aq)} + \text{HNO}_{2(aq)}$)，應該還有其他的副反應(如 $2\text{NO}_{2(g)} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_{4(g)}$)產生，並且按照溶液中 $\text{NO}_{2(g)}$ 的量，選擇其所產生的反應。當 $\text{NO}_{2(g)}$ 少量時， $\text{NO}_{2(g)}$ 進行產生亞硝酸根的反應($2\text{NO}_{2(g)} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_{3(aq)} + \text{HNO}_{2(aq)}$)；而當 $\text{NO}_{2(g)}$ 過量時，則產生其他的副反應($2\text{NO}_{2(g)} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_{4(g)}$)。因為 $\text{NO}_{2(g)}$ 有反應選擇性，因此過量的 $\text{NO}_{2(g)}$ 並不會產生 NO_2^- ，破壞結構使吸光度下降。

五、自然界大都以硝酸鹽存在，幾乎不以亞硝酸根存在。並且食品中常加入硝酸鹽用以增色、防腐與增加風味。硝酸鹽會在細菌作用下轉化為致癌的亞硝胺，而從實驗可知蔬菜中含有硝酸鹽，過量施肥常造成硝酸鹽大量累積，所以採收後的存放時間越久，細菌的作用會使蔬菜的硝酸鹽增加(甚至是香腸好幾倍)，則泡菜中反而較少，推測泡菜的高滲透壓使得細菌無法生長。

所以細菌作用是植物中產生硝酸鹽重要原因，只要可以阻絕細菌的作用(例如：醃製、冷凍等)，就可避免避免產生過多致癌的硝酸鹽。

七、為了擴大 Griess reagent 的用途，我們想出可以嘗試製作出方便攜帶偵測的 Griess reagent 貼片，第一代貼片是利用洋菜粉製作成果凍，並且使用鋁箔袋包裝，附有木棒可以方便取出來使用，用來偵測空氣中的 $\text{NO}_{2(g)}$ 氣體。

第二代的貼片是利用漿糊和 Griess reagent 調和成 1:1 的稠狀試劑，並且裝入小塑膠瓶裡，並且附上濾紙，如果要使用時，只要將稠狀 Griess reagent 擠到濾紙上觀察有無顏色變化。

除此之外，我們想要改善貼片的實用性，所以也構思過不同類型的新式貼片，例如：製作抽屜式的貼片、螢光棒式的扭頭漿糊、ok 蹦式的貼紙……等。而最新一代的產品是將 Griess reagent 裝置於容器中並且附有鋅粉包及自製容器，可使過濾、檢測同時進行，可用來偵測樣品中硝酸鹽含量。



圖三十四:第一代 Griess reagent 貼片



圖三十五:第二代 Griess reagent 貼片



圖三十六:第三代 Griess reagent 貼片

未來發展方向：

- 一、利用 Griess reagent 提供資料當成空氣中 $\text{NO}_2(\text{g})$ 含量的指標，與現行環保署偵測氮氧化物(NO_x)的方法(化學發光法)並用，可提供更方便的資料。
- 二、可用來當成樣品中(水質、蔬菜或食品等)硝酸鹽含量的偵測劑，方便民眾簡易判別硝酸鹽含量多寡。
- 三、製作成固態貼片與稠狀試劑，還有液態試劑的包裝。不僅美觀，並且更便於攜帶與偵測，真正幫助民眾避免氮氧化物(NO_x)所造成身體的傷害。



圖三十七:GR 貼片加入 $\text{NO}_2(\text{g})$ 的變化



圖三十八:GR 貼片加入 $\text{NO}_2(\text{g})$ 的變化

捌、參考資料

1. 偶氮染料性質

<http://wenku.baidu.com/view/390287dcce2f0066f5332201.html>

(檢索日期:2013/03/03)

2. 間氨基苯磺酸性質
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_CN_CB7143612.htm
(檢索日期:2013/03/10)
3. 間氨基苯磺酸性質
<http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7143612.htm>
(檢索日期:2013/03/10)
4. 鹽酸萘乙二胺性質
<http://baike.baidu.com/view/2553719.htm>
(檢索日期:2013/03/10)
5. 鹽酸萘乙二胺性質
http://www.aladdin-reagent.com/thir.asp?Rea_SubID=12908
(檢索日期:2013/03/10)
6. 行政院環境保護署環境檢驗所
<http://www.niea.gov.tw/>
(檢索日期:2013/03/19)
7. 反應進行說明
<http://html.rincondelvago.com/reacciones-quimicas-de-sustitucion-aromatica.html>
(檢索日期:2013/10/19)
8. Griess Reagent 的作用
<http://openinfo.npust.edu.tw/agriculture/npus12/kk/part7/agr11part7expl.pdf>
(檢索日期:2013/10/19)
9. 蔬菜中的硝酸鹽
http://www.producegreen.org.hk/about_us.htm
(檢索日期:2014/03/18)
10. 蔬菜中的奪命殺手-硝酸鹽
<http://www.docin.com/p-84757604.html>
(檢索日期:2014/03/18)
11. 影響蔬菜中硝酸鹽含量之探討
http://www.producegreen.org.hk/topic_02_02.html
(檢索日期:2014/03/18)
12. 食物中的硝酸鹽
http://www.producegreen.org.hk/topic_02.html#01
(檢索日期:2014/03/18)
13. 水中硝酸鹽之危害
<http://www.spnp.gov.tw/Article.aspx?a=eB4LeTfYuzo%3D&lang=1>
(檢索日期:2014/03/18)
14. NO₃ 與鋅粉反應
<http://zhidao.baidu.com/question/580637246.html>
(檢索日期:2014/03/18)

【評語】 040208

本作品製作亞硝基鹽檢測試劑，頗能針對生活需求思考。製作的檢試裝置簡便，唯科學數據仍待加強。