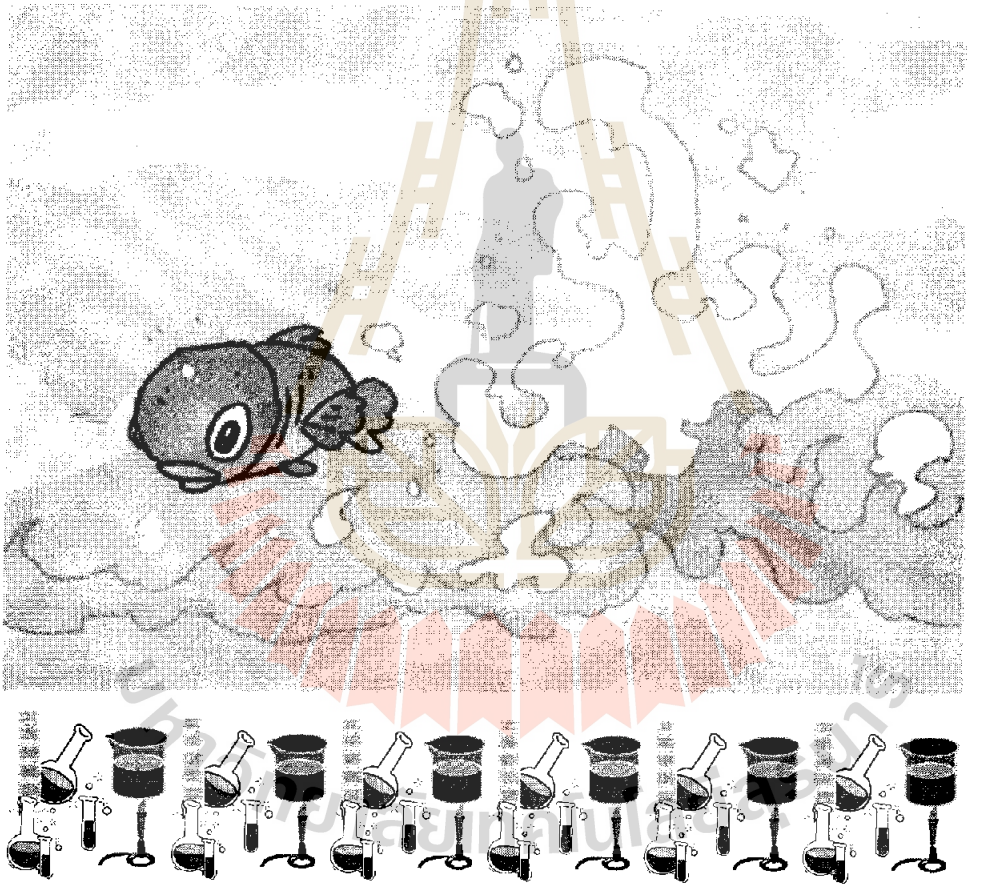
คู่มือปฏิบัติการ

รายวิชา 617 427 การวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย

(Water and Wastewater Analysis)



อาจารย์ ชื่นจิต ชาญชิดปรีชา
สาขาวิชา อนามัยสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ภาคการศึกษา 1/2549

สารบัญ

หัวข้อ		หน้า
รูปแบบของการปฏิบัติการ		i
ปฏิบัติการที่ 5	ปริมาณของแข็งในน้ำ	1
ปฏิบัติการที่ 6	การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	5
ปฏิบัติการที่ 7	การหาปริมาณคลอไรด์	12
ปฏิบัติการที่ 8	ความกระด้าง	14
ปฏิบัติการที่ 9	น้ำมันและไขมัน	18
ปฏิบัติการที่ 10	TKN	22
ปฏิบัติการที่ 11	ฟอสฟอรัส	25
เอกสารอ้างอิง		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปแบบของการปฏิบัติการ

1) จำนวนนักศึกษา: นักศึกษาแบ่งกลุ่มๆละ 5 คน
2) ลักษณะการเรียน : และกลุ่มจะต้องทำการฝึกปฏิบัติ และ ทำรายงานกลุ่มเสนออาจารย์ผู้สอนภายในเวลาที่กำหนด
3) สถานที่เรียน: ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม (อาคารปฏิบัติการ F8)

อุปกรณ์ประกอบการเรียนการสอนภาคปฏิบัติ

1) คู่มือปฏิบัติการ
2) เครื่องคอมพิวเตอร์ และโปรแกรมMS Power Point
3) เครื่องมือ และ อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการศึกษา

นักศึกษากลุ่มละ 5 คน

⬇

ฟังบรรยายแนะนำตามคู่มือปฏิบัติการ

⬇

ลงมือปฏิบัติการตามหัวข้อในแต่ละสัปดาห์

⬇

บันทึกผล วิเคราะห์ อภิปราย สรุปผลการปฏิบัติการ

⬇

จัดทำรายงานสรุปผลปฏิบัติการ

⬇

นำเสนอผลปฏิบัติการ

กำหนดส่งรายงานผลการปฏิบัติงาน

ส่งรายงาน : ทุกวันจันทร์ เวลา 12.00 น. ก่อนเริ่มปฏิบัติการครั้งถัดไป

โครงสร้างรายงาน ประกอบด้วย

1) หัวข้อปฏิบัติการ: เรื่อง (Topic)
2) บทนำ (Introduction)
3) วัตถุประสงค์ (Objectives)
4) วัสดุ และ วิธีการ (Materials and Methods)
5) ผลการทดลอง (Results)
6) วิจารณ์ และ สรุปผลการทดลอง (Discussion and Conclusion)
7) เอกสารอ้างอิง (References)

เกณฑ์การให้คะแนนรายงานการปฏิบัติงาน

- โครงสร้างรายงาน (2)
- ผลการทดลอง (2)
- วิจารณ์ และ สรุปผลการทดลอง (4)
- การนำเสนอรายงาน (2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (5)
การตรวจวิเคราะห์น้ำทางเคมี
เรื่อง ปริมาณของแข็งในน้ำ (Solids)

อ.ชื่นจิต ชาญชิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids), ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Total Suspended Solids), และปริมาณของแข็งละลายน้ำ (Total Dissolved Solids) ในตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพได้อย่างถูกต้อง

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids)

หลักการ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของถ้วยระเหย หลังจากการระเหยตัวอย่างนี้ในถ้วนระเหยที่ทราบน้ำหนัก และอบที่อุณหภูมิ 103-105^0 เซลเซียส และทำให้เย็น คือปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำที่ต้องการทราบ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยระเหย (Evaporation Dishes) ขนาด 100 ml
2. หม้ออังน้ำ (Water Bath)
3. โถทำแห้ง (Desiccator)
4. เตาอบแห้ง (Oven)
5. ตาชั่งละเอียด ชั่งได้ในระดับทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการทดลอง

1. อบถ้วยระเหยในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105^0 เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง **แล้วทิ้งให้เย็นใน** Desiccator
2. ชั่งน้ำหนักถ้วยระเหย (สมมติมีน้ำหนัก A กรัม)
3. เขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดีแล้ว เทตัวอย่างน้ำที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในถ้วยระเหย (การเลือกปริมาตรน้ำ ควรพิจารณาจากลักษณะของน้ำและแหล่งที่มา) นำไประเหยบน Water Bath ที่อุณหภูมิ 100^0 เซลเซียส จนแห้ง (ปริมาตรน้ำที่พอเหมาะควรเหลือจากแห้งหลังจากการอบ อยู่ในช่วง 10-200 มิลลิกรัม)
4. นำถ้วยตัวอย่างน้ำที่ระเหยแล้วเข้าอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105^0 เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำถ้วยตัวอย่างน้ำที่อบแล้ว ทิ้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก (สมมติมีน้ำหนัก B กรัม)

การคำนวณ

ปริมาณของแข็งทั้งหมด ในน้ำ X มิลลิลิตร = (B-A) กรัม

ปริมาณของแข็งทั้งหมด ในน้ำ 1 ลิตร = ? กรัม

ให้คิดหน่วยของปริมาณของแข็งทั้งหมด เป็น **มิลลิกรัม/ลิตร**

ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Total Suspended Solids)

หลักการ

หลังจากกรองตัวอย่างน้ำผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่ทราบน้ำหนัก นำตะกอนที่ติดอยู่บนกระดาษกรองนั้น ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105^{0} เซลเซียส และทำให้เย็นใน Desiccator น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักของของแข็งแขวงลอยทั้งหมดต่อปริมาตรน้ำตัวอย่างที่ใช้นั่นเอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Desiccator พร้อมสารดูดความชื้น
2. เตาอบแห้ง
3. ตาชั่งละเอียด ชั่งได้ในระดับทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. กระดาษกรอง GF/C ขนาด 4.7 ซม.
5. ชุดกรอง
6. เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum Pump) พร้อมขวดดูดสุญญากาศ
7. ภาชนะสำหรับใสกระดาษกรองที่อบแห้ง
8. ปากคีบ

วิธีการทดลอง

1. นำกระดาษกรอง GF/C อบที่อุณหภูมิ 103-105^{0} เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นใน Desiccator
2. ชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง GF/C ที่อบแห้งและทำให้เย็นลงแล้วนั้น (สมมติมีน้ำหนัก A กรัม)
3. ต่อชุดเครื่องมือตามรูปที่ 2 ใช้ปากคีบหยิบกระดาษกรอง GF/C วางบนกรวยบุคเนอร์ (หรือ จุกกรองจัดตำแหน่งของชุดขวดดูดสุญญากาศให้เรียบร้อย เปิดเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 20 ml จำนวน 3 ครั้ง ทิ้งน้ำล้างนั้น
4. เลือกปริมาตรตัวอย่างน้ำ ถ้าน้ำขุ่นมาก มีของแข็งแขวนลอยมาก ควรใช้ปริมาณน้อยๆ แต่ถ้าน้ำใส ควรเพิ่มปริมาณน้ำตัวอย่างให้มากขึ้น (ควรให้มีค่าของแข็งแขวนลอยติดอยู่บนกระดาษกรองระหว่าง 1-200 มิลลิกรม เนื่องจากหากมากเกินไปของแข็งนั้นอาจจะจับน้ำไว้)
5. เขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดีแล้ว ค่อยๆ เทตัวอย่างน้ำที่ทราบปริมาตร ลงกรองอย่างต่อเนื่องจนหมด ใช้น้ำกลั่น Rinse ภาชนะ และด้านข้างของชุดกรอง แล้วปล่อยให้เครื่องดูดสุญญากาศดูดน้ำออกจนแห้ง ปิดเครื่อง
6. ใช้ปากคีบหนีบขอบกระดาษกรองขึ้นวางบนภาชนะรอง
7. นำไปในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105^{0} เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยทิ้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก (สมมติมีน้ำหนัก B กรัม)

การคำนวณ

ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ในน้ำ	X	มิลลิลิตร	=	(B-A)	กรัม
ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด ในน้ำ	1	ลิตร	=	?	กรัม

หรือ TSS = TS - TDS

ให้คิดหน่วยของปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด เป็น มิลลิกรัม/ลิตร

ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (Total Dissolved Solids)

หลักการ

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของถ้วยระเหย หลังจากการระเหยตัวอย่างน้ำที่กรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนัก และอบที่อุณหภูมิ 103-105^0 เซลเซียส แล้วทำให้เย็นใน Desiccator คือปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด หรืออาจหาได้จากผลต่างระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมด หักออกด้วยปริมาณของแข็งแขวนลอย นั่นเอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

เพิ่มเติมจากการวิเคราะห์**ปริมาณของแข็งทั้งหมด** ดังนี้

1. กระดาษกรอง GF/C (Glass Fiber Filter) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 cm.
2. ชุดกรอง
3. เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum Pump) พร้อมขวดดูดสุญญากาศ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมถ้วยระเหย ทำเช่นเดียวกับ การวิเคราะห์**ปริมาณของแข็งทั้งหมด**
2. การกรองตัวอย่างน้ำ
   - ต่อสายยางระหว่างปลายท่อดูดสุญญากาศกับท่อของขวดกรอง
   - วางกระดาษกรอง GF/C บนกรวยบุคเนอร์ (หรือ จุกกรอง) จัดตำแหน่งของชุดขวดดูดสุญญากาศให้เรียบร้อย
   - ล้างกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 20 ml. ดูดน้ำออกจากกระดาษกรองจนหมดทุกครั้ง
   - เขย่าน้ำตัวอย่างให้เข้ากันดี แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C นั้น โดยให้กรองมากกว่าปริมาตรที่จะใช้ระเหยจริง (อาจใช้ตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองจากการหาค่าของแข็งแขวนลอยก็ได้)
3. นำตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองบนกระดาษกรอง GF/C ใส่ในถ้วนระเหยที่ทราบน้ำหนัก แล้วทำต่อเช่นเดียวกับการวิเคราะห์**ปริมาณของแข็งทั้งหมด**

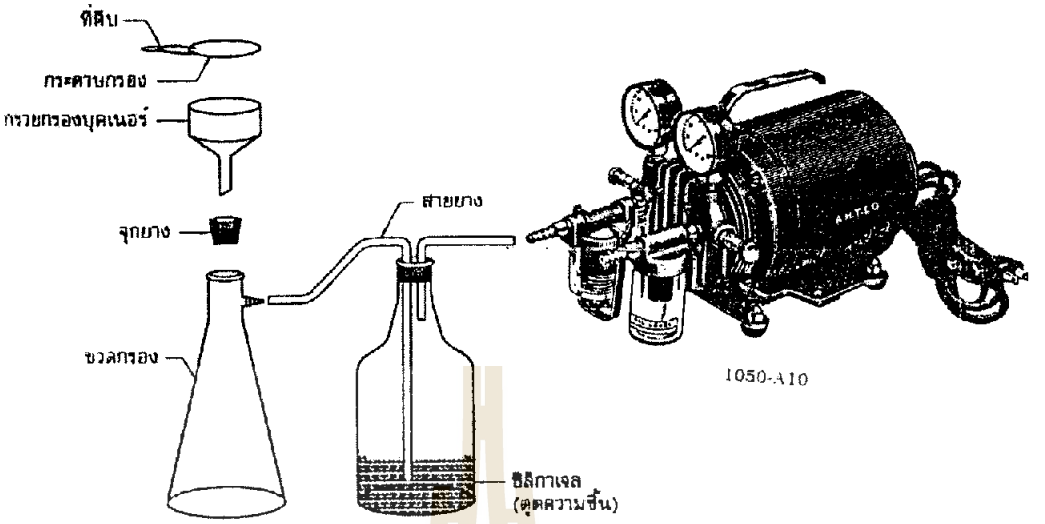
การคำนวณ

ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด ในน้ำ	X	มิลลิลิตร	=	(B-A)	กรัม
ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด ในน้ำ	1	ลิตร	=	?	กรัม

ให้คิดหน่วยของ ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด เป็น **มิลลิกรัม/ลิตร**

หรือ TDS = TS - SS

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 5-1 ชุดกรอง และเครื่องดูดสุญญากาศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (6)
การตรวจลักษณะน้ำทางชีวภาพ
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

อ. ชื่นจิต ชาญจิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรียและสามารถตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย อันได้แก่ การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีจาก Standard Plate Count, การตรวจวิเคราะห์ Conliform bacteria และ Fecal coliform ด้วยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique (Most Proble Number: MPN) และ วิธี Standard Filter Technique ได้อย่างถูกต้อง

หลักการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

1.1 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ควรเป็นขวดแก้วปากกว้างความจุประมาณ 125 cm^3 พร้อมฝาจุกแก้ว ผ่านการล้างให้สะอาด คว่ำ หรืออบให้แห้ง ปิดฝาจุกให้สนิท แล้วหุ้มด้วยกระดาษ Aluminum foil ตั้งแต่ฝาขวดถึงคอขวดสำหรับจับตอนเปิดหรือบรรจุลงกระป๋องโลหะเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ขวดเก็บตัวอย่างน้ำต้องปราศจากเชื้อโรค หรือ สิ่งปนเปื้อนโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 160°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (170°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วมง) หรือการอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave แรงดันอัดไอ 15 psi ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับตัวอย่างน้ำประปา หรือ น้ำดื่มที่มีคลอรีนอิสระตกค้างเหลืออยู่ในตัวอย่างน้ำจำเป็นต้องถูกจำกัดโดยการเติม $Na_2S_2O_3$ เข้มข้น 10% จำนวน 0.1 cm^3 ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

1.2 สำลี

1.3 แอลกอฮอล์ 70%

1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2. การเลือกจุดเก็บตัวอย่างน้ำ

2.1 น้ำดื่ม

- ถ้าเป็นระบบประปามีท่อจ่ายน้ำ ควรเก็บตัวอย่างน้ำจากจุดที่น้ำออกจากระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำจากต้นทางท่อจ่ายน้ำ และปลายทางท่อจ่ายน้ำ ถ้าระบบท่อจ่ายน้ำมีเส้นท่อแยกออกไปอีก ควรเก็บตัวอย่างที่เส้นท่อจ่ายน้ำที่แยกแขนงออกไปด้วย

- ถ้าเป็นน้ำจากบ่อตื้น หรือบ่อบาดาล เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อโดยตรง ถ้าจำเป็นให้ใช้ภาชนะที่สะอาดสุ่มเก็บหรือรองรับ แล้วถ่ายใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

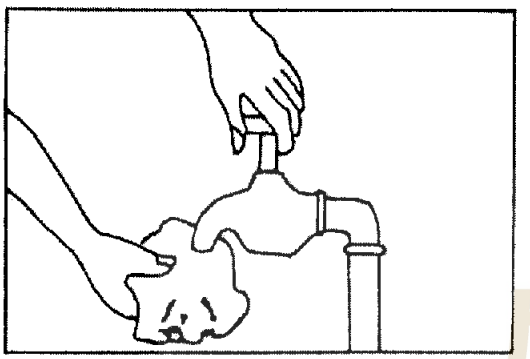
2.2 น้ำดิบเพื่อการประปา เช่น แม่น้ำ ทะเลสาบ ลำธาร หรือ อ่างเก็บน้ำ ให้เก็บตัวอย่างน้ำ บริเวณกลางลำน้ำ หรือ ใกล้จุดสูบน้ำระหว่างความลึก 1 เมตร หรือเท่ากับความลึกของจุดสูบน้ำ

2.3 น้ำผิวดิน เก็บตัวอย่างน้ำ เหนือ ใต้ และ บริเวณแหล่งมลภาวะที่บริเวณ ¼, ½

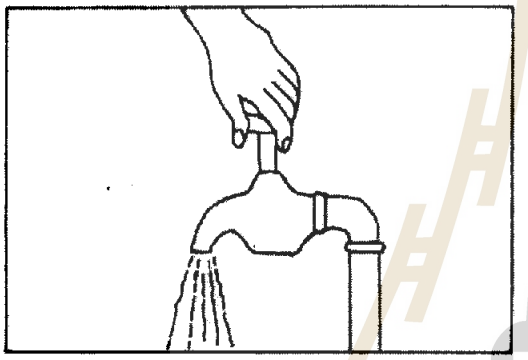
และ ¾ ของความกว้างของแหล่งน้ำ ในกรณีที่แหล่งน้ำไม่กว้างมาก และต้องการเก็บเพียง 1 ตัวอย่างต่อ 1 จุด ให้เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณกึ่งกลางน้ำที่ระดับความลึกใกล้ผิวน้ำนั้น

3. วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

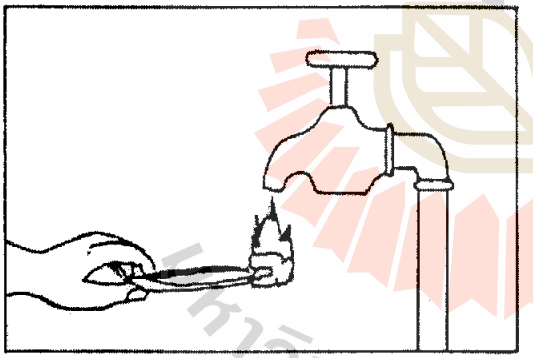
3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำจากก๊อก



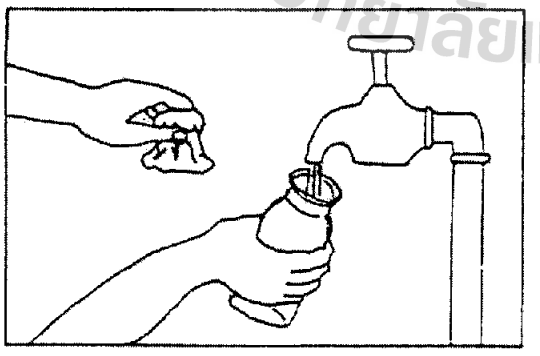
ก. ทำความสะอาดหัวก๊อกโดยใช้ผ้าสะอาดเช็ด



ข. เปิดน้ำที่ค้างอยู่ในท่อทิ้งไปก่อน โดยเปิดก๊อกให้น้ำไหลเต็มที่เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วปิดก๊อก

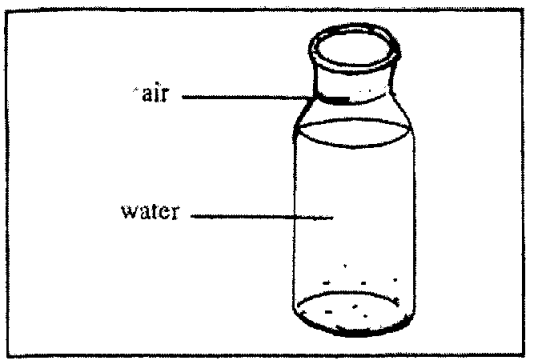


ค. ใช้ไฟลนปากก๊อก เพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 1 นาที



จ. บรรจุตัวอย่างน้ำลงในขวดเก็บตัวอย่างโดยการนำขวดที่บรรจุอยู่ในกระป๋อง ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อถือไว้ด้วยมือขวา แล้วคว่ำลงบนมือซ้าย ดึงกระป๋องใบล่างออก จับก้นขวดตั้งขึ้น เปิดจุกขวดโดยจับบนกระดาษอลูมิเนียม ลนไฟรอบปากขวด นำไปรองน้ำจากก๊อกให้ได้ประมาณ 4/5 ของขวด (ประมาณ 100 ml) ก่อนปิดจุกลนไปรอบปากขวด และ จุกอีก 1 ครั้ง ปิดจุกให้แน่น แล้วบรรจุลงในกระป๋อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



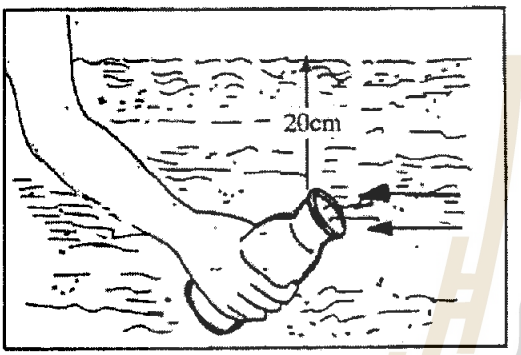
ฉ. พันรอยต่อของกระป๋องด้วยกระดาษกาวย่น 2-3 รอบ

ช. ปิดฉลากให้เรียบร้อย

ซ. นำกระป๋องบรรจุตัวอย่างน้ำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-10°C

ฌ. นำส่งห้องปฏิบัติการทันที

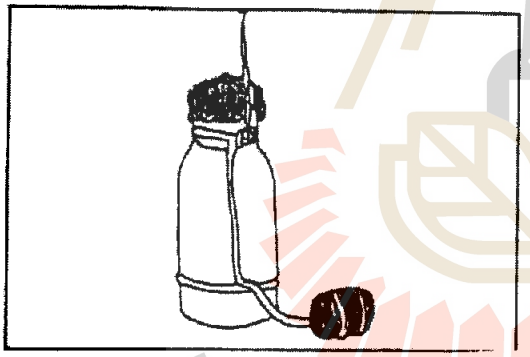
3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป



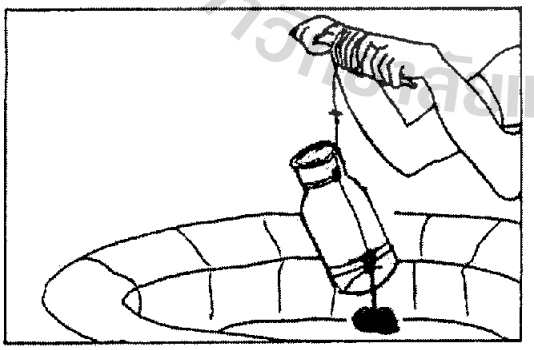
ก. เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ข. ถือขวดส่วนล่างจุ่มลงใต้แหล่งน้ำโดยหันปากขวดสวนทางกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำที่ระดับความลึก 20-30 cm จากผิวน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 4/5 ของขวด ปิดจุกนำขวดตัวอย่างบรรจุในกระป๋อง และ ปิดฉลาดข้างกระป๋อง

3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำ

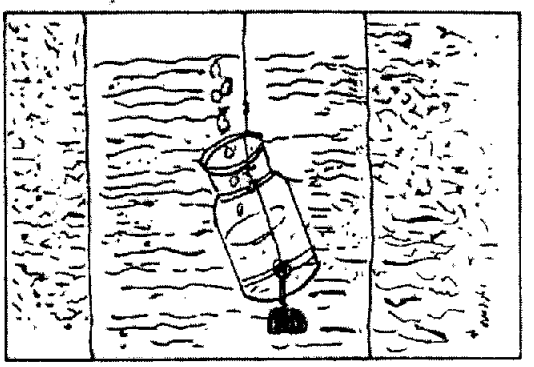


ก. เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เชือกผูกขวด และ ถ่วงติดกับพื้น

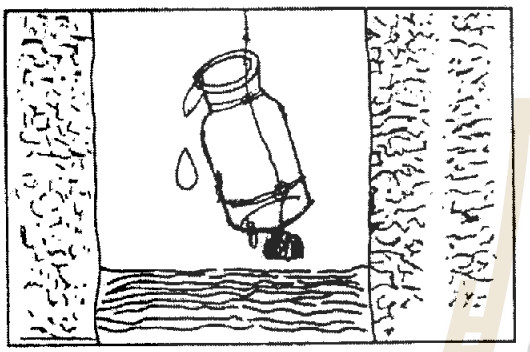


ข. หย่อนขวดเก็บตัวอย่างลงในบ่อ ระวังอย่าให้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำไปถูกบริเวณขอบบ่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ค. หย่อนขวดให้จมลงใต้ระดับน้ำที่ความลึกประมาณ 20-30 cm ปล่อยให้น้ำไหลเข้าขวดจนเต็ม



ง. ดึงขวดเก็บตัวอย่างน้ำขึ้น เทน้ำส่วนหนึ่งทิ้งให้ระดับน้ำเหลือเพียง 4/5 ของขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ปิดจุกนำขวดเก็บตัวอย่างน้ำบรรจุลงในกระป๋องแล้วปิดฉลาก

3.4 การเก็บรักษาตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำที่จะนำไปวิเคราะห์ทางแบคทีเรียจะต้องเก็บรักษาไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ และ ส่งให้ถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็ว ถ้าตัวอย่างน้ำไม่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ภายใน 1 ชั่วโมงจะต้องเก็บรักษาคุณภาพตัวอย่าง ดังนี้

- ถ้าการขนส่งไม่เกิน 6 ชั่วโมง ให้แช่ตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 4-10°C และเมื่อถึงห้องปฏิบัติการให้แช่เย็นทันทีในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-10°C และวิเคราะห์ภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากได้รับตัวอย่างน้ำ
- กรณีที่การขนส่งเกิน 6 ชั่วโมง โดยทั่วไปให้วิเคราะห์ในภาคสนาม แต่หากไม่มีอุปกรณ์วิเคราะห์ทางภาคสนาม ให้แช่เย็นตัวอย่างน้ำที่อุณหภูมิ 4-10 °C และวิเคราะห์ภายใน 30 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำ

3.5 การส่งตัวอย่างน้ำเข้าห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างน้ำเมื่อเก็บมาแล้ว จะต้องเขียนฉลากให้ชัดเจนติดไว้ที่ข้างขวด และ รีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

รายละเอียดของตัวอย่างน้ำที่ติดข้างกระป๋อง

รหัสตัวอย่าง

น้ำ.....

ประเภทของตัวอย่างน้ำ.....

สถานที่เก็บ.....

วิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง.....

วันที่เก็บ.....เวลา.....

ชื่อผู้เก็บ.....

การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี Standard Plate Count

หลักการ

เซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต 1 เซลล์ ในจานเพาะเชื้อจะเจริญเติบโตเป็น 1 โคโลนี ดังนั้น จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อก็คือจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำ

เครื่องมือ และ อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. หลอดแก้วทดลอง
3. Plate Count Agar

Tryptone	5	กรัม
Tyeast Extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นตามสัดส่วนด้วยความร้อน ปรับเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตรปรับค่า pH ให้มีค่าเป็น 7.0 ± 0.2 แล้วตวงใส่หลอดที่มีจุกเกลียว หลอดละ ประมาณ 15 cm^3 และ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

4. Incubator
5. Autoclave
6. Measuring Pipette
7. Colony Counter
8. Cylinder
9. Water-bath

วิธีการทดลอง

1. นำหลอดอาหารที่เตรียมแล้วมาต้มหลอมละลายอีกครั้ง แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 45°C
2. เตรียมตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่จะเกิดโคโลนีในจานเพาะเชื้อระหว่าง 30-3000 โคโลนี ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องเจือจางตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วยสารละลายเจือจางตัวอย่างโคโลนี

การเตรียม Dilution Water ทำได้ดังนี้

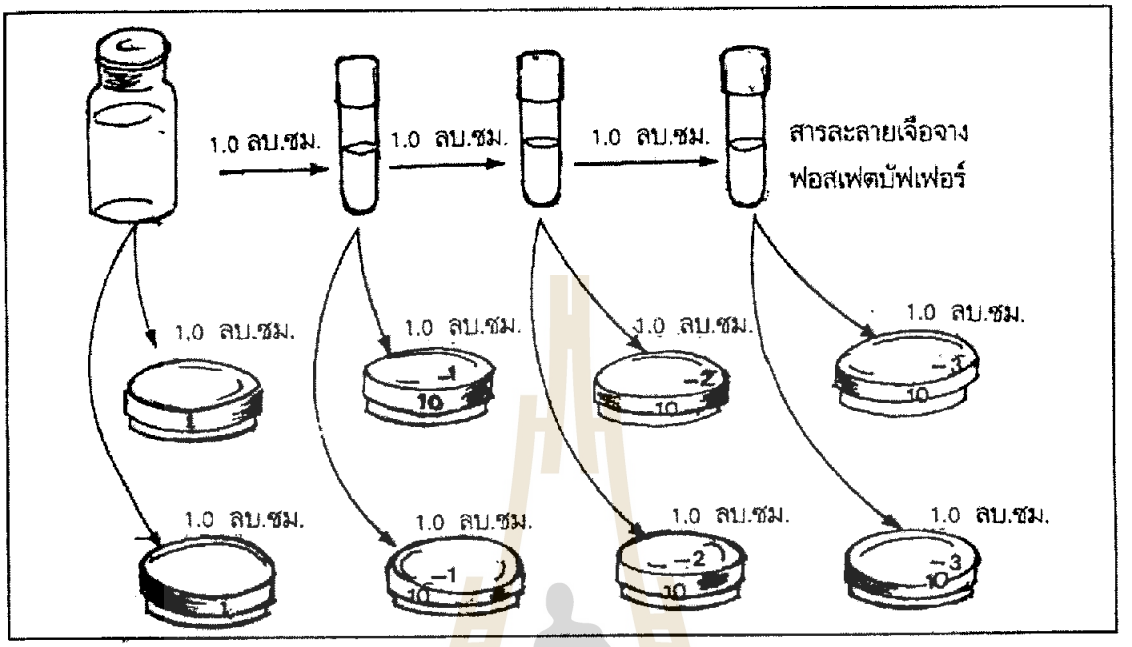
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (Potassium Phosphate Buffer Solution) จำนวน 1.25 cm^3 ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

[Potassium Phosphate Buffer Solution สามารถเตรียมได้โดยการละลาย KH_2PO_4 34 g ในน้ำกลั่น 500 cm^3 ต้มด้วยไฟอ่อน ๆ ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 20°C กรอง แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล (NaOH 40g ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร) เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น]

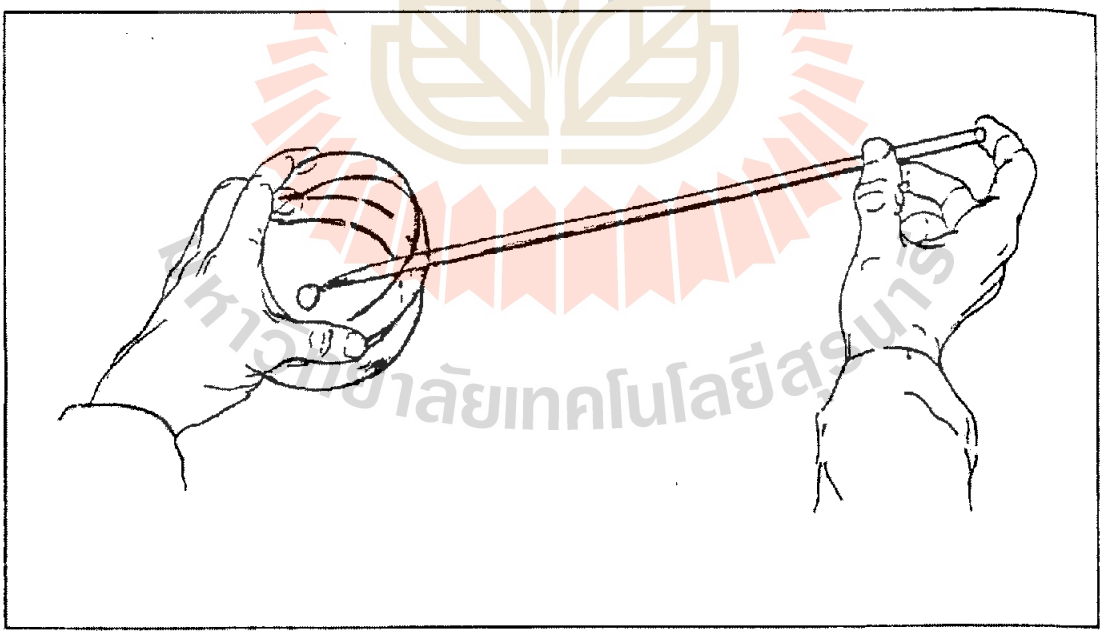
- เติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 5 cm^3

  (สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมจากการละลาย $MgSO_4.7_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)
- ตวงใส่หลอดทดลองจำนวนหลอดละ 9 cm^3
- นึ่งไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

การเจือจางตัวอย่างทำได้โดยการดูดตัวอย่างน้ำ 1 cm^3 ใส่ลงในหลอดซึ่งมีสารละลายเจือจางตัวอย่าง 9.0 cm^3 เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม ตัวอย่างน้ำในหลอดตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า (10^{-1}) และ ถ้าต้องการให้เจือจางลงอีก ให้ถ่ายตัวอย่างน้ำนี้ลงใส่สารละลายเจือจางอีกหลอดต่อไป



รูปที่ 6-1 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำให้มีความเข้มข้นห่างกันระดับละ 10 เท่า โดยการใช้ Dilution Water 3. ถ่ายตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้วในข้อ 2 จากแต่ละ Dilution จำนวน 1 cm^3 ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 ตามลงไป หมุนจากเพาะเชื้อในทิศทางตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง และ หมุนไปทางซ้าย และ ขวา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างน้ำผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจานเพาะเชื้อ



รูปที่ 6-2 การใส่ตัวอย่างน้ำด้วยปิเปตลงในจานเพาะเชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หลังจากวุ้นแข็งตัว พลิกกลับจานเพาะเชื้อให้ฝาอยู่ด้านล่าง แล้วนำจานเพาะเชื้อไปเก็บในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24-48 ชั่วโมง

การจับจำนวนโคโลนีและ การรายงานผล

หลังจากบ่มในตู้อบเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมง นำจานออกจากตู้อบเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

- ควรเลือกนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี
- ถ้าไม่มีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ลงเป็น < 1 CFU/ml
- ถ้านับจำนวนโคโลนีได้จำนวนเลขหลักสิบ เช่น 35 หรือ 36 ให้ลงผลตามจำนวนจริงที่นับได้
- ถ้านับจำนวนโคโลนีได้จำนวนตัวเลขหลักร้อย ให้ปัดตัวเลขสุดท้ายเป็น 0 เช่น 155 ปัดเป็น 160 หรือ 142 เป็น 140 เป็นต้น
- ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ < 10 โคโลนีต่อตารางเซ็นติเมตร ให้นับจำนวนโคโลนีบนพื้นที่ 13 ตร.ซม. (13 ช่องบน Colony Counter) เป็นตัวแทนการกระจาย แล้วคูณด้วย 5 เพื่อให้ได้จำนวนโคโลนีบนพื้นที่ 65 ตร.ซม. (พื้นที่ของจานเพาะเชื้อ)
- ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้ > 10 โคโลนีต่อตารางเซ็นติเมตร ให้นับจำนวนโคโลนีบนพื้นที่ 4 ตร.ซม. (4 ช่องบน Colony Counter) หารด้วย 4 คูณด้วย 65
- ถ้าบนพื้นที่ 1 ช่อง หรือ 1 ตารางเซ็นติเมตร มีจำนวนโคโลนีมากกว่า 100 โคโลนี ให้นับเป็นมากกว่า 100 x 65 หรือ มากกว่า 6,500 โคโลนี
- ถ้ามี Spreader Colonies ขนาดน้อยกว่า ½ ของพื้นที่จานให้นับ เป็น 1 โคโลนี ถ้าขนาดมากกว่า ½ ของจานให้ลงผลว่า 'Spreader'
- โคโลนีที่ติดกันเป็นลูกโซ่ ให้นับเป็น 1 โคโลนี
- หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ของแต่ละความเจือจางที่เหมาะสม
- คำนวณจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำ ดังนี้

จำนวนแบคทีเรีย/ มิลลิลิตร = จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x จำนวนเท่าที่เจือจาง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (7)
การตรวจลักษณะน้ำทางเคมี
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ปริมาณคลอไรด์

อ.ชื่นจิต ชาญชิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ในตัวอย่างน้ำด้วยวิธี Argentometric Method ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ด้วยวิธี Argentometric Method หรือ Mohr method นี้จะใช้ 0.0141 นอร์มัลของ $AgNO_3$ เป็นตัว titrant และใช้ K_2CrO_4 เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งแต่ละมิลลิลิตรของ 0.0141 นอร์มัลของ $AgNO_3$ (Standardize ด้วยสารละลายมาตรฐานของ NaCl ก่อนทุกครั้ง) จะพอดีกับ 0.5 มิลลิกรัมของปริมาณคลอไรด์ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการไตเตรตนั้น คลอไรด์อิออนจะตกลงมาเป็นตะกอนสีขาวของ AgCl ดังสมการ

$$Ag^+ + Cl^- \rightleftharpoons AgCl$$

เมื่อถึงจุดยุติของปฏิกิริยาไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า จึงต้องใช้อินดิเคเตอร์เป็นตัวช่วยบอก เมื่อปริมาณของ Cl^- ในน้ำหมดไปจะทำให้ได้สีแดงของ $AgCrO_4$ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ K_2CrO_4 ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ทำปฏิกิริยากับ Ag^+ ที่เกินนั้น ดังสมการ

$$2Ag^+ + CrO_4^{2-} \rightleftharpoons Ag_2CrO_4$$

สำหรับงานที่ทำเป็นประจำ มักใช้ $AgNO_3$ ที่มีความเข้มข้น 0.0282 นอร์มัล ซึ่งแต่ละมิลลิลิตรของ $AgNO_3$ จะทำปฏิกิริยาพอดีกับ 1 มิลลิกรัมคลอไรด์ และ ไม่ต้องคูณด้วยแฟคเตอร์ 0.5

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. Erlenmeyer Flask 100-250 ml sized
2. 100 ml Pipette
3. 100 ml Measuring Cylinder
4. Burette 50 ml sized

สารเคมี

1. โปตัสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์: ละลาย K_2CrO_4 50 กรัม ในน้ำเล็กน้อย เติม $AgNO_3$ จนกระทั่งได้ตะกอนสีแดงเกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง กรอง และ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาณ 1 ลิตร (เติม $AgNO_3$ เพื่อกำจัดคลอไรด์ในน้ำยาเคมี)

2. สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท 0.0141 นอร์มัล: ละลาย $AgNO_3$ 2.395 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ให้ standardize ด้วย 0.0141 นอร์มัลโซเดียมคลอไรด์ก่อนใช้ทุกครั้ง

3. สารละลายาตรฐานโซเดียมคลอไรด์ 0.0141 นอร์มัล: ละลาย NaCl 824.1 mg (อบให้แห้งที่ 140°C) ในน้ำกลั่น และ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

4. น้ำยาพิเศษ สำหรับกำจัดตัวขัดขวาง

4.1 Aluminium hydroxide suspension : ละลาย 125 กรัม $AlK(SO_4)_2\ 12H_2O$ หรือ $AlNH_4(SO_4)_2\ 12H_2O$ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร อุ่นที่ 60°C และ เติม 55 ml ของ conc. NH4OH ช้า ๆ พร้อมกับคนแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง และ ถ่ายลงขวด

4.2 ฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ : ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 5 กรัม ใน 95% C_5H_5OH 500 ml เติมน้ำกลั่นอีก 500 ml

4.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล : ละลาย 40 กรัม NaOH ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรได้ 1 ลิตร

4.4 กรดกำมะถัน 1 นอร์มัล : เจือจาง 28 ml Conc. H_2SO_4 ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรได้ 1 ลิตร

4..5 $H_2O_2$30%

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างน้ำ : ใช้ตัวอย่างน้ำ 100 ml หรือเลือกปริมาตรที่เหมาะสมใส่ในขวด Eelenmeyer Flask ขนาด 250 ml ถ้าน้ำมีสิ่งขัดขวางให้กำจัดออก ดังนี้

- ถ้าตัวอย่างขุ่น หรือมีตะกอนปะปนมาให้กรองตัวอย่างน้ำก่อนนำมาวิเคราะห์
- ถ้ามี S^{2-}, SO_3^{2-}, $S_2O_3^{2-}$ ทำให้น้ำนั้นเป็นด่างต่อฟีนอล์ฟทาลีนด้วย NaOH เติม 30%H_2O_2 1 ml คนและทำให้เป็นกลางด้วย H_2SO_4
- ถ้าตัวอย่างน้ำมีสีเข้มมาก กำจัดได้โดยเติม Aluminium hydroxide suspension 3 ml ลงในน้ำตัวอย่าง 100 ml คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วกรองล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น เก็บน้ำส่วนที่กรองได้รวมทั้งน้ำล้างตะกอนทั้งหมดไปวิเคราะห์ต่อไป

2. ปรับ pH ของสารละลายตัวอย่างน้ำ ซึ่งได้กำจัดสารขัดขวางแล้วให้อยู่ในช่วง pH 7-10 โดย

- ถ้าตัวอย่างน้ำมี pH<7.0 เติมสารละลาย NaOH 1 N
- ถ้าตัวอย่างน้ำมี pH>7.0 เติมสารละลาย H_2SO_4 1 N

3. การไตเตรต เติมสารละลายโปตัสเซียมโครเมตอินดิเคเตอร์ 1 ml ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท 0.0141 นอร์มัลจนกระทั่งได้สีเหลืองอมส้ม หรือ ตะกอนสีแดงอิฐของซิลเวอร์โครเมต (Ag_2CrO_4) ในสารละลาย

4. Blank ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 100 ml แทนตัวอย่างน้ำ (ใช้ปริมาตรเดียวกับตัวอย่างน้ำที่ใช้) ค่า blank ควรอยู่ระหว่าง 0.2 – 0.4 ml

5. Standardization วิธีเทียบมาตรฐานสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) ทำเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ ตัวอย่างน้ำ แต่ใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมคลอไรด์แทนตัวอย่างน้ำ

การคำนวณ

$$\text{คลอไรด์ (mg/l)} = \frac{(A-B) \times N \times \text{eq. Wt. Of } Cl^- \times 1000}{\text{ml Sample}} = \frac{(A-B) \times 0.5 \times 1000}{\text{ml Sample}}$$

A = ml ของ $AgNO_3$ ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่างน้ำ

B = ml ของ $AgNO_3$ ที่ใช้ในการไตเตรต Blank

N = Normality ของ $NgNO_3$ (ปกติ = 0.0141)

Equivalent Weight of Cl- = 35.45 mg

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (8)
การตรวจลักษณะน้ำทางเคมี
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ ความกระด้าง โดยวิธี EDTA Titrimetric Method

อ. ชื่นจิต ชาญชิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์ความกระด้างในน้ำได้อย่าง ถูกต้อง

หลักการ

EDTA เป็น Chelating Agent สามารถสร้างอิออนเชิงซ้อนที่เสถียรกับ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Divalent Ion อื่นที่เป็นสาเหตุของความกระด้างของน้ำ เมื่อเติม Eriochrome Black T (EBT) Indicator ที่บัฟเฟอร์น้ำให้มี pH 10.0 ± 0.1 แล้ว EBT จะรวมกับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เกิดเป็นสารเชิงซ้อน ([M-EBT] complex) สีม่วงแดง (ถ้าไม่มีอิออนของโลหะละลายอยู่จะได้สารละลายสีน้ำเงิน) ดังสมการที่ 1

$$M^{2+} + {}^{2+}\,EBT \leftrightarrow^{pH=10} [M-EBT]_{complex} \qquad (1)$$

และ เมื่อไตเตรตด้วย EDTA แล้ว Ca^{2+}, และ อิออน +2 ตัวอื่น ๆ (ที่เป็นสาเหตุของความกระด้างของน้ำ) จะรวมตัวกับ EDTA เป็นสารเชิงซ้อน ([M-EDTA] complex) ซึ่งไม่มีสีและคงตัวกว่า ([M-EBT] complex) โดยจะรวมตัวกับ Ca^{2+} ก่อนแล้วจึงรวมกับ Mg^{2+} เมื่อมี EDTA รวมตัวกับ Free Hardness Ions หมดแล้วจะไปดึงอิออนโลหะ (M^{2+}) มาจาก ([M-EBT] complex) จะหมด และ ปล่อย ETB เป็นอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินของ EBT แสดงว่าถึงจุดยุติดังสมการที่ 2

$$[M-EBT]_{complex} + EDTA \leftrightarrow^{pH=10} [M-EDTA]_{complex} + EBT \qquad (2)$$

สีม่วงแดง สีน้ำเงิน

สิ่งรบกวนการวิเคราะห์

อิออนของโลหะบางตัวจะขัดขวางการหาความกระด้างโดยวิธีนี้ด้วยการทำให้สีของจุดยุติจางไปหรือ เห็นไม่ชัด การแก้ไขทำได้โดยการเติม Inhibitors ก่อนการไตเตรตด้วย EDTA ความเข้มข้นสูงสุดของสารรบกวนที่ยอมให้มีได้ในการไตแสดงใน ตารางที่ 1 ขนาดของตัวอย่างน้ำเท่ากับ 25 ml และ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 ml ถ้าตัวอย่างน้ำมีโลหะหนักมาก ๆ ไม่ควรวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ควรตรวจวัดแคลเซียม และแมกนีเซียมก่อนโดยวิธีอื่น แล้วนำมาคำนวณตามวิธีคำนวณที่ได้เรียนไปแล้ว ในกรณีตัวอย่างน้ำมีสารแขวนลอยหรือ สารอินทรีย์ที่จะรบกวนสีของจุดยุติสามารถกำจัดได้โดยการระเหยตัวอย่างจนแห้งบนเครื่องอังน้ำแล้วนำไปเผาในตู้เผาที่อุณหภูมิ 550°C จนกระทั่งสารอินทรีย์ถูกออกซิไดซ์จนสมบูรณ์ ละลายตะกอนทีเหลือด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 N ปริมาตร 20 ml แล้วสะเทินให้เป็นกลางที่ pH 7 ด้วย NaOH 10N เติมน้ำกลั่นจนได้ 50 ml ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปหาความกระด้างต่อไป

เครื่องมือ และ อุปกรณ์

1. บิวเรต ขนาด 50 ml
2. ขวดรูปกรวย ขนาด 250 ml

ตารางที่ 1 ค่าความเข้มข้นสูงสุดของโลหะที่รบกวนการวิเคราะห์

โลหะ	ความเข้มข้นสูงสุดของสารที่รบกวนการวิเคราะห์ (mg/l)	
	Inhibitor I	Inhibitor II
อลูมิเนียม	20	20
แบเรียม	+	+
แคดเมียม	+	20
โคบอลท์	>20	0.3
ทองแดง	>20	20
เหล็ก	>30	5
ตะกั่ว	+	20
แมงกานีส (Mn^{+2})	+	1
นิกเกิล	>20	0.3
สตรอนเทียม	+	+
สังกะสี	+	200
โพลีฟอสเฟต		10

+ ถูกไตรเตรตและวัดเป็นความกระด้าง

สารเคมี

1. Buffer Solution

ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 16.9 g ใน แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (NH_4OH, Conc.) 143 ml เติมเกลือแมกนีเซียมของ EDTA 1.25g แล้วเจือจางให้เป็น 250 ml ด้วยน้ำกลั่น

2. Complexing Agents

น้ำส่วนใหญ่ไม่จำเป็นต้องใช้ Complexing Agents แต่ถ้าน้ำนั้นมีสิ่งรบกวนการวิเคราะห์จำเป็นต้องใช้ Complexing Agents เพื่อทำให้เห็นการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ที่จุดยุติได้อย่างชัดเจน Complexing Agents ที่ใช้มีดังนี้

2.1 Inhibitor I

ถ้าตัวอย่างน้ำเป็นกรดควรปรับ pH ให้เป็น 6 หรือสูงกว่าด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือ NaOH 0.1 N ก่อนเติม NaCN 250 mg ลงไปในสารละลายตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายให้เพียงพอที่จะปรับ pH ให้เป็น 10.1 ± 0.1 **(ข้อควรระวัง:NaCN** มีพิษร้ายแรงมากจึงควรใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ)

2.2 Inhibitor II

ละลายโซเดียมซัลไฟด์โมโนไฮเดรต ($Na_2S.H_2O$) 5.0 g หรือ $Na_2S.5H_2O$ 3.7g ในน้ำกลั่น 100 ml ปิดขวดให้แน่นด้วยจุกยางเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการออกซิเดชั่นเนื่องจากออกซิเจนในอากาศ Inhibitor II จะทำให้โลหะหนักซึ่งขัดขวางการวิเคราะห์ตกเป็นตะกอนซัลไฟด์ ปริมาณของ Inhibitor II ที่ควรใช้คือ 1 ml

2.3 Mg CDTA (Magnesium Salt of 1, 2 – Cyclohexane diamine tetraacetic Acid)

เติม Mg CDTA 250 mg ต่อตัวอย่างน้ำ 100 ml ให้ละลายหมดก่อนจึงค่อยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ การใช้ complexing Agent ชนิดนี้เพื่อต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารพิษหรือ สารที่มีกลิ่นจาก Inhibitor และ II

3. Eriochrome Black T Indicator

ให้เตรียมชนิดเป็นผงแห้ง โดยการ ผสมอีริโอโครม แบลค ที 0.5 g และ NaCl 100 g ให้เข้ากัน

4. Calcium Carbonate Standard Solution

ชั่ง $CaCO_3$ ซึ่งได้อบแห้งแล้วจำนวน 1.000 g ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 500 ml วางกรวยไว้ที่คอขวด ค่อย ๆ เติมกรด HCl (1+1) ทีละน้อยจนกระทั่ง $CaCO_3$ ละลายหมด เติมน้ำกลั่น 200 ml ต้มให้เดือดประมาณ 2-3 นาทีเพื่อไล่ CO_2 ทิ้งให้เย็น เติม Methyl Red indicator 2-3 หยด ปรับให้เป็นสีส้มกลาง ๆ ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 3 N หรือ กรดไฮโดรคลอริก (1+1) ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

5. EDTA Standard Soltuion (0.01 M)

ละลายผง EDTA Disodium Salt 3.723 g ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางให้เป็น 1 ลิตร แล้วเทียบความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardize) กับสารละลายมาตรฐานแคลเซียมที่ทราบความเข้มข้น (จากข้อ 4) ปรับความเข้มข้นของสารละลาย EDTA ให้ได้ 1.00 ml = 1.00 mg $CaCO_3$

วิธีเทียบความเข้มข้นที่แน่นอนกระทำโดยปิเปตสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตมา 25.0 ml เติมน้ำกลั่นให้เป็น 50 ml แล้วทำเหมือนวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ ถ้าสารละลาย EDTA 1.00 ml = $CaCO_3$1.00 mg จะใช้ EDTA 25.0 ml พอดี ควรเก็บสารละลายมาตรฐาน EDTA ที่เตรียมในขวด Polyethylene

วิธีการวิเคราะห์

1. การไตเตรตตัวอย่างน้ำ

เลือกปริมาตรตัวอย่างที่จะใช้ EDTA ในการไตเตรตน้อยกว่า 15 ml และ ใช้เวลาในการไตเตรตน้อยกว่า 5 นาที นับจากหลังเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ปิเปตตัวอย่างตามปริมาตรที่เลือกใส่ขวดรูปกรวย (ถ้าเป็นน้ำธรรมชาติทั่วไปมักใช้ตัวอย่างประมาณ 25 ml) เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรประมาณ 50 ml เติมสารละลายบัฟเฟอร์เพียง 1 ml ก็เพียงพอที่จะปรับให้ pH ของตัวอย่างน้ำเป็น 10.0 ± 0.1 เติมอีริโอโครม แบลค ที อินดิเคเตอร์ ถ้าเป็นชนิดสารละลายเติม 1-2 หยด แต่ถ้าเป็นชนิดผงแห้งเติมปริมาณพอควร (ประมาณ 0.2 g) สารละลายตัวอย่างจะเป็นสีม่วงแดง ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานอีดีทีเอ 0.01 M โดยค่อย ๆ เติมอย่างช้า ๆ สีจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีม่วงแดงเป็นสีม่วงและจะค่อย ๆ เข้มข้นซึ่งแสดงว่าใกล้ถึงจุดยุติ จึงค่อยเติมทีละหยดจนถึงจุดยุติ สีสารละลายตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ถ้าการเปลี่ยนสีที่จุดยุติเห็นไม่ชัดแสดงว่าจะเติมตาม Complexing Agent ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือไม่ก็แสดงว่าอินดิเคเตอร์เสื่อมคุณภาพ

2. ตัวอยางน้ำที่มีความกระด้างต่ำ

ตัวอย่างน้ำที่มีความกระด้างต่ำคือ น้อยกว่า 5 mg/l ให้ใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำ 100-1000 ml สำหรับการไตเตรตและเพิ่มจำนวนบัฟเฟอร์ อินฮิบิเตอร์ และ อินดิเคเตอร์ในปริมาณที่เหมาะสมและ ควรใช้ Micro Buret ในการไตเตรตทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นหรือ น้ำ DI ในปริมาณที่เท่ากับตัวอย่างรวมทั้งปริมาณของบัฟเฟอร์ อินฮิบิเตอร์ และอินดิเคเตอร์ด้วย

การคำนวณ

$$\text{ความกระด้าง (mg/l as CaCO3)} = \frac{A*B*1000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}}$$

เมื่อ A = ปริมาตร EDTA ที่ใช้ในการไตเตรตเป็น ml

B = mg $CaCO_3$ ซึ่งสมมูลย์กับ 1.00 ml EDTA

ข้อควรระวัง

1. เวลาที่ใช้ในการไตเตรตไม่ควรเกิน 5 นาที เพื่อป้องกันการตกตะกอนของ $CaCO_3$ และ $Mg(OH)_2$
2. ถ้าทราบค่าความกระด้างโดยประมาณ ให้เติมสารละลายมาตรฐาน EDTA ลงไปประมาณ 90% ของปริมาณที่คาดว่าจะใช้ลงในตัวอย่างน้ำก่อนเติมสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อป้องกันการตกตะกอน $CaCO_3$ หรืออาจแก้ไขโดยการปรับตัวอย่างน้ำให้เป็นกรด และ คมนาน 2 นาที เพื่อไล่ CO_2 ก่อนการปรับ pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ วัดค่าสภาพด่างเพื่อแสดงจำนวนกรดที่ถูกเติม
3. ถ้าตัวอย่างน้ำเป็นกรดควรปรับ pH ให้เป็นกลางก่อนเติมสารละลายบัฟเฟอร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (9) – (สาธิต)
เรื่อง ไขมัน และ น้ำมัน (Oil and Grease)

อ.ชื่นจิต ชาญชิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์ไขมันในน้ำธรรมชาติ และ น้ำสะอาด ด้วยวิธีการสกัดด้วยกรวยแยก และ ไขมันในน้ำทิ้งด้วยวิธี Soxhlet Exraction ได้

การสกัดน้ำมันและไขมันด้วยกรวยแยก

หลักการ

ปรับ pH ของตัวอย่างน้ำให้น้อยกว่า 2 สกัดน้ำมันและไขมันด้วยตัวทำละลาย (เฮกเซนหรือ ฟรีออน) จากนั้น ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถทำแห้ง (Desiccator) แล้วชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมา เนื่องจากน้ำหนักของไขมันและน้ำมัน

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กรวยแยก (Separatory Funnel) ขนาด 500 มล. ที่ล้างด้วยเฮกเซนประมาณ 15 มล. ไว้ก่อนแล้ว (รูปที่ 1)
2. ถ้วยระเหย (Evaporating Disc)
3. เครื่องอังน้ำ (Water Bath)
4. กระดาษกรอง ขนาด 11 ซม. เบอร์ 40
5. กรวยกรอง
6. บีกเกอร์ ขนาด 600 มล. และ 100 มล. ซึ่งล้างด้วยเฮกเซน ประมาณ 15 มล. ไว้ก่อน
7. เครื่องชั่งละเอียด

สารเคมี

1. กรดกำมะถันเข้มข้น (Conc.H_2SO_4)
2. เฮกเซน (Hexane)
3. โซเดียมซัลเฟต ปราศจากน้ำ (Sodium Anhydrous)

วิธีการทดลอง

1. เทน้ำตัวอย่างที่ทราบปริมาตร (500 มล. หรือน้อยกว่า) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มล. ปรับ pH ด้วย conc.H_2SO_4 จน pH น้อยกว่า 2 (ประมาณ 2 มล./น้ำตัวอย่าง 1 ลิตร)

2. เทน้ำตัวอย่างจากข้อ 1 ใส่กรวยแยก เติมเฮกเซน จำนวน 10-15 มล. เขย่าอย่างแรงประมาณ 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ สารผสมจะแยกชั้น โดยเฮกเซนจะอยู่ชั้นบน และ น้ำจะอยู่ชั้นล่าง

3. ถ่ายตัวอย่างน้ำลงบีกเกอร์เดิม เพื่อนำมาสกัดอีก

4. ถ่ายชั้นเฮกเซนซึ่งมีไขมันและน้ำมันจากน้ำตัวอย่างละลายอยู่ผ่านกรวยกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตบนกระดาษกรองลงในถ้วยระเหยที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักไว้แล้ว สมมติน้ำหนักเป็น A กรัม

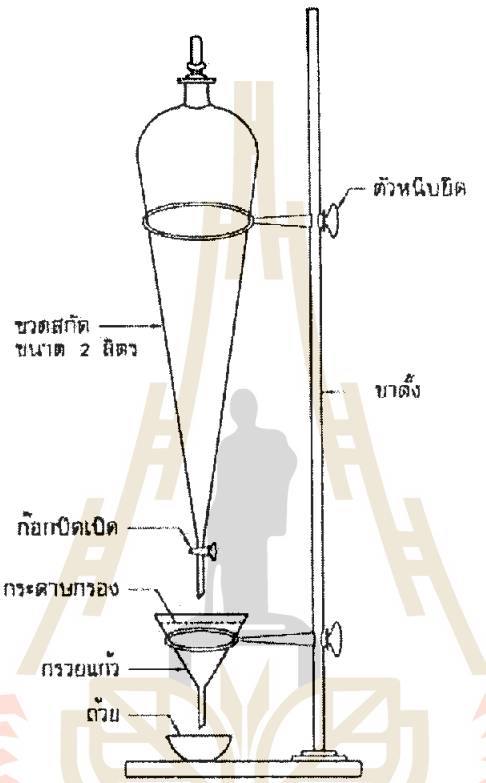
5. สกัดซ้ำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งไขมันและน้ำมันถูกสกัดออกจากตัวอย่างหมดแล้ว

6. นำถ้วยรเหยซึ่งมีเฮกเซน,ไขมัน และน้ำมันละลายอยู่ไประเหยบน Water Bath ที่อุณหภูมิ 70°C เซลเซียส จนแห้งปราศจากความชื้น ปล่อยให้เย็น ใน Desiccator ประมาณ 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก สมมติเป็น B กรัม

***ในกรณีที่มีน้ำปนอยู่ในชั้นของเฮกเซน ให้ถ่ายเฮกเซนที่มีน้ำมันและไขมันลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ใส่โซเดียมซัลเฟตลงไปจนได้สารละลายใส หรือ โซเดียมซัลเฟตจับตัวกันดีกลิ้งไปมาได้ไม่เหลว แล้วเทลงบนกระดาษกรองที่ใส่โซเดียมซัลเฟตไว้ อิมัลชันจะแตกออกและโซเดียมซัลเฟต จะจับกับน้ำ

การคำนวณ

ไขมันและน้ำมัน (มก./ลิตร) = $\frac{(B-A)*10^6}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$



รูปที่ 9-1 อุปกรณ์สำหรับสกัดน้ำมันและไขมันด้วยกรวยแยก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การสกัดน้ำมัน และ ไขมันจากน้ำทิ้งด้วยวิธี Soxhlet Extraction ด้วยเครื่อง Extractor Unit by Solvents SER 148 VELP Scientifica Srl.

หลักการ

เป็นวิธีการที่จะแยกสารที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกันโดยอาศัยพื้นฐานการละลายในตัวทำละลาย เช่น ฟรีออน, เฮกเซน, หรือ Carbon tetrachloride จากนั้นจึงนำตัวทำละลายที่มีไขมันและน้ำมันละลายอยู่ไประเหยจนแห้งที่อุณหภูมิ 103°C หรือต่ำกว่า ชั่งน้ำหนักตะกอนที่เหลือ ซึ่งจะเป็นปริมารไขมัน และ น้ำมันในตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในขวดปากกว้างจำนวน 1 ลิตร และ ปรับสภาพให้เป็นกรด (pH<2) ด้วยกรดไฮโดรคลอริค เพื่อ hydrolyze พวก Soluble metallic soap

2. สารเคมี

*ตัวทำละลายใช้ Carbon tetra chloride, reagent grade ที่มีไอระเหยตกค้างไม่เกิน 5 mg/l (0.005%)

*สารช่วยกรองใช้ Diatomaceous flour จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

*น้ำกลั่น

*boiling stone

3. การกรองตัวอย่าง

* เตรียม Buchner funnel ϕ 7 cm และ วางกระดาษกรองเบอร์ 40 ϕ 7 cm เทสารแขวนลอย Diatomaceous flour (สารช่วยกรอง) จำนวน 100 ml ลงไป ใช้เครื่องสูญญากาศดูดน้ำออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 ลิตร ดูดน้ำออกจนแห้ง

* กรองตัวอย่างน้ำที่เตรียมจากข้อ 1 ผ่านบนกระดาษกรองที่มีแผ่นกรองดูดซับน้ำมันอยู่ ดูดน้ำออกจนแห้ง

* ใช้คีมคีบกระดาษกรองนำไปใส่ใน Extraction Thimble ใช้สำลีชุบตัวทำละลายที่เลือกใช้ (ตัวใดตัวหนึ่ง) เช็ดไขมันที่ติดถ้วยบุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีไปใส่ใน Extraction Thimble ด้วย

* นำ Extraction Thimble ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103°C นาน 30 นาที และ ใส่ boiling stone เตรียมไว้สำหรับขั้นตอนการสกัด

4. การสกัดน้ำมัน และ ไขมันจากตัวอย่าง

* ชั่งน้ำหนักขวดที่ใช้สกัด (Extraction vessel) ที่ทำให้มีน้ำหนักคงที่แล้ว (อบแห้งที่อุณหภูมิ 103°C) และมี boiling stone เตรียมไว้ สมมติน้ำหนัก A หนัก

* ใส่ Extraction Thimble ในเครื่อง โดยผลักปุ่มไปที่ตำแหน่ง 'immersion' แล้วจึงเลื่อนปุ่มไปที่ตำแหน่ง 'Washing'

* ใส่ตัวทำละลาย 30-60 ml ลงใน Extraction vessel และติดตั้ง Extraction vessel ของแต่ละตัวอย่างเข้ากับเครื่อง (วางบน heating plate) จุ่มแช่ตัวอย่างในสารทำละลาย 15 นาที

* ดึงเอาคานให้ติดแน่นกับถ้วย Extraction vessel

* ปิดก๊อกแก้วที่อยู่กับส่วนกลั่นในตำแหน่งตั้งตรง

* ผลักปุ่มด้านหน้าไปตำแหน่ง Immersion และ เริ่มให้ความร้อน

* เมื่อสิ้นสุดการสกัด ผลักปุ่มด้านหน้าตรงตำแหน่ง Washing เพื่อทำการ reflux washing

* ใช้เวลาทำ Reflux washing นาน 30 นาที

* เมื่อสิ้นสุดการทำ Reflux Washing ปิดก๊อกแก้วที่ Condenser ในตำแหน่งขวาง (closed) เพื่อปิดและ รอจนการดูดกลับสารทำละลายนำกลับลงมาอยู่ทางส่วนล่างของ Condenser glass

* ปลดคานที่บังคับ glass vessel กับ condenser glass ออก นำ thimbel และ thimble connector ออก ปล่อยสารทำละลายลงในบีกเกอร์ที่ว่างที่วางบน heating plate และ เปิดจุกแก้ว

5. การทำให้แห้ง

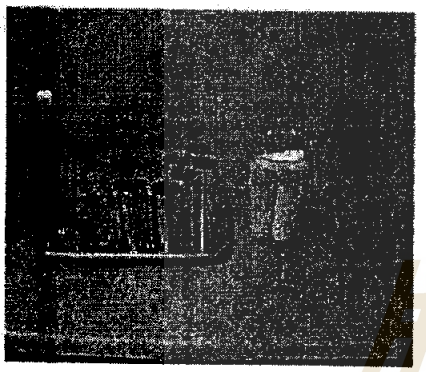
* นำ Extractioon vessel ไปที่อุณหภูมิ 80°C นาน 15 นาที ปล่อยทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

6. การชั่งน้ำหนัก

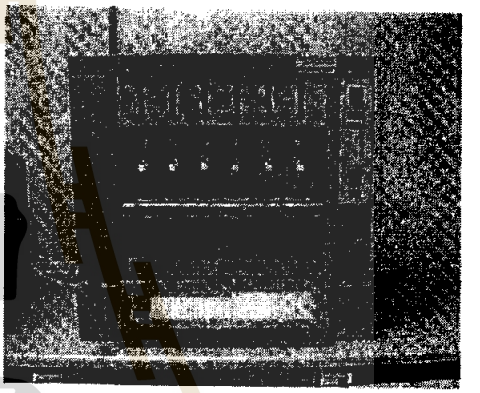
* ชั่ง Extraction vessel จากข้อ 5 ที่มี boiling stone อยู่ด้วย สมมติน้ำหนัก B กรัม

7. การคำนวณ และ การแสดงผลการวิเคราะห์

$$\text{ไขมัน และ น้ำมัน (mg/l)} = \frac{(B-A)*10^6}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (ml)}}$$

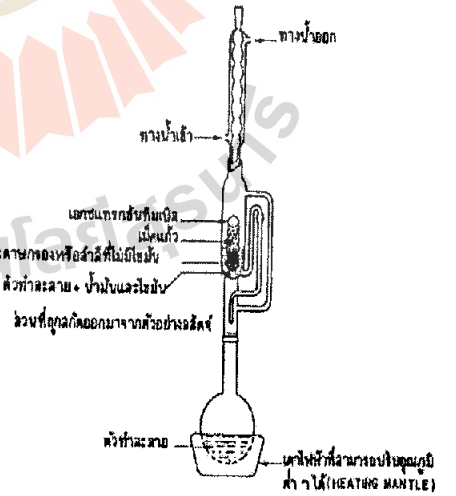


Extraction vessels & Thimbles



Soxhlet Extraction Set

Soxhlet Extraction Set



Soxhlet Extraction Set (แบบดั้งเดิม)

รูปที่ 9-2 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดน้ำมันและไขมัน

คู่มือปฏิบัติการที่ (10)
การตรวจลักษณะน้ำทางเคมี
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)

อ. ชื่นจิต ชาญชิตปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในรูปของ TKN ในตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพ ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) คือ ผลรวมของสารอินทรีย์ไนโตรเจน กับ แอมโมเนียไนโตรเจนที่อยู่ในโปรตีนของพืช หรือ สัตว์ หรือที่เกิดจากกระบวนการของสิ่งมีชีวิต การหาค่า TKN มักทำโดยเปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนให้มาอยู่ในรูปของแอมโมเนียก่อน แล้วจึงวัดปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด

เมื่อใช้กรดกำมะถันเป็นตัวเติมออกซิเจนเพื่อทำลายส่วนที่เป็นอินทรีย์สารของโมเลกุลไนโตรเจนจะหลุดออกมาในรูปแอมโมเนียไนโตรเจน ส่วนคาร์บอน และ ไฮโดรเจนจะถูกออกซิไดซ์เป็น CO_2 และ H_2O ซึ่งสามารถหาค่าแอมโมเนียไนโตรเจนทั้งหมดได้โดยวิธีไตเตรตด้วยสารละลายกรดแก่มาตรฐาน ทำให้ทราบปริมาณของ TKN ที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำนั้น

ขั้นตอนสำคัญของการตรวจวิเคราะห์น้ำเพื่อหาค่า TKN

1. การย่อยสลาย (Digestion): Org.N จะถูกย่อยสลายเปลี่ยนไปเป็นเกลือแอมโมเนียที่อุณหภูมิที่สูงกว่าจุดเดือดของกรดกำมะถัน ดังสมการ

$$\text{Org.N} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Catalyst}} NH_4HSO_4 + CO_2(g) + SO_2 + H_2O$$

2. การกลั่น (Distillation)

หลังจากการปรับสภาพความเป็น กรด-ด่าง ของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ให้มีค่า pH>8 แล้วทำให้สามารถกลั่น NH_3 ออกมาในรูป NH_4+ ซึ่งจะถูกจับด้วย Boric acid Solution ได้ ดังแสดงในสมการ

$$NH_4HSO_4 + 2NaOH \rightarrow NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$$

$$NH_3 + H_3BO_3 \rightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

เครื่องมือ และ อุปกรณ์

1. Digestion Tube ขนาดความยาว 260 mm diameter 48 mm
2. Digestion Unit (DK6 Keating Digester: VELP Scientifica)
3. Distilling Unit (DK 140 Distillation: VELP Scientifica)
4. Erlenmeyer Flask 250 ml sized
5. Titration Set

สารเคมี

1. Digestion Reagent
   - 1.1 K_2SO_4 (Poassium Sulfate Anhydrous)
   - 1.2 $CuSO_4$
   - 1.3 Conc. H_2SO_4 (98%)
2. น้ำยาเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนของการกลั่น
   - 2.1 Sodium Hydroxide-Sodium Thiosulfate Reagent
   - 2.2 Boric Acid Solution

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ละลาย H_3BO_3 20 กรัมในน้ำกลั่น เจือจางให้เป็น 1 ลิตร

2.3 ฟีนอล์ทาลีน ($\phi\phi$)

3. น้ำยาเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนของการไตเตรต

3.1 $H_2SO_4$0.02 N

เตรียมจากการนำสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน 0.1N จำนวน 200 ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 ml

3.2 Tashiro's Indicator

ละลาย Methyl Red 600 mg ใน Ethyl alcohol 95% 100 ml และ ละลาย Metylene blue 100 mg ใน Ethyl alcohol 95% 50 ml นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกัน เตรียมใช้แต่ละเดือน

วิธีการทดลอง

1. ขนาดตัวอย่าง

- ใช้น้ำตัวอย่างปริมาณ 50 ml เติมลงใน Digestion tube

2. การย่อยสลายตัวอย่าง

- ใส่ Digestion Reagent ดังต่อไปนี้ลงในตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ พร้อมกันนี้ให้ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกัน

  * 7.5 g ของ K_2SO_4:$CuSO_4$ ที่มีอัตราส่วน 9:1
  * 10 ml Conc. H_2SO_4

- วาง Digestion tube ลงบน Digestion Unit และ กำหนดโปรแกรมการย่อยสลายดังต่อไปนี้
  - 150°C 3 min
  - 200°C 1 min
  - 220°C 1 min
  - 420°C 30 min

ทำให้เย็นลงบนจนถึงอุณหภูมิ 50-60°C เป็นอย่างน้อย หยด $\phi\phi$ 4-5 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทำให้เป็นด่างโดยค่อย ๆ เติมน้ำยาโซเดียมไฮโอซัลเฟตจนเป็นชมพู แล้วนำไปกลั่น (แต่ที่ F8 เครื่องกลั่นจะเติมน้ำยาโซเดียมไธโอซัลเฟตโดยอัตโนมัติตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ดังนั้นหลังจากหยด $\phi\phi$ แล้วก็นำหลอดตัวอย่างน้ำที่ย่อยแล้วไปติดตั้งกับเครื่องกลั่นได้เลย)

เครื่องย่อยที่ใช้ควรอยู่ใน Hood หรือส่วนที่สามารถดูดควันออกได้ ไอกรดที่ได้จากการย่อยควรผ่านการทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายด่างเข้มข้น 15% (สำหรับชุดย่อยที่ F8) ก่อนปล่อยออก

3. การเตรียมชุดกลั่น

การเติมสารเข้าในท่อสายยาง

a. ใส่หลอดกลั่นเข้าที่ และ วาง Flask เข้าที่

b. เริ่มการทำงานของเครื่องด้วยการตั้งค่าดังนี้

SP = 200°C	H_2O = 100	
H_2BO_3 = 0 ml	NaOH = 0	
Distillation Time = 0 min	Steam = 100%	Dist Res OFF

c. กดปุ่ม Start

d. เมื่อน้ำกลั่นผ่านเข้าหลอดกลั่น กดปุ่ม Stop

e. ทำตามวิธีเดียวกันนี้ เมื่อต้องการเติม Sodium Hydroxide Solution และ Boric Acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Solution

โปรแกรมการกลั่นล้างครั้งแรกสุด และ ท้ายสุดเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

(ใส่หลอดกลั่นเข้าที่ และ วาง Flask เข้าที่)

SP = 200°C H_2O = 100

H_3BO_3 = 0 ml NaOH = 0

Distillation Time = 2.15 min. Steam = 100%

กลั่นล้างส่วนต่าง ๆ ของชุดกลั่นให้สะอาดแล้วกลั่นล้างอีกที ดังโปรแกรมต่อไปนี้

SP = 200°C H_2O = 50

H_3BO_3 = 25 ml NaOH = 50

Distillation Time = 2.15 min. Steam = 100%

4. การกลั่น

Blank ; หยด ϕϕ 4-5 หยด ใส่หลอดกลั่นเข้าที่ และ วาง Flask เข้าที่ กลั่นตามโปรแกรมต่อไปนี้

SP = 200°C H_2O = 100

H_3BO_3 = 25 ml NaOH = 50

Distillation Time = 2.15 min. Steam = 100%

Sample: ใส่หลอดของตัวอย่างน้ำที่ย่อยแล้ว และ หยด ϕϕ 4-5 หยด จากข้อ 2 วางเข้าที่ และวาง Flask เข้าที่ เริ่มกลั่นตามโปรแกรมต่อไปนี้

SP = 200°C H_2O = 50

H_3BO_3 = 25 ml NaOH = 50

Distillation Time = 2.15 min. Steam = 100%

สำหรับตัวอย่างที่กลั่นได้ หยด Tashiro's Indicator 10 หยด นำไปหาปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีไตเตรตด้วยกรดกำมะถัน 0.02 N สารละลายที่มีแอมโมเนียจะมีสีเขียว จุดยุติคือจุดที่สารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วง กลั่นล้างเครื่องกลั่นทุกครั้งหลังการกลั่นแต่ละตัวอย่าง

การคำนวณค่าจากการไตเตรต

$$\text{TKN (mg/l ในรูป N)} = \frac{(A-B) \times N \times 14000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}}$$

เมื่อ A = ml ของกรดกำมะถัน ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

B = ml ของกรดกำมะถัน ที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรดกำมะถันเป็น Normality

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คู่มือปฏิบัติการที่ (11)
การตรวจลักษณะน้ำทางเคมี
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ Total Phosphorous

อ. ชื่นจิต ชาญชิดปรีชา

วัตถุประสงค์ เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสรวมในตัวอย่างน้ำ ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ ค่า Total Phosphorous ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ Orthophosphate, Condensed phosphorous ทั้งละลายน้ำ และ ไม่ละลายน้ำ ทั้งอินทรีย์สาร และ อนินทรีย์สาร เพื่อที่จะขับฟอสเฟตที่รวมอยู่กับสารอินทรีย์ต้องนำตัวอย่างมาผ่านการย่อย หรือ Digestion ก่อน แล้วจึงนำตัวอย่างนั้นไปทำการตรวจวัดโดยวิธีการเทียบสีเพื่อหาปริมาณฟอสฟอรัสรวม

สำหรับปฏิบัติการนี้จะย่อยตัวอย่างน้ำด้วยวิธี Sulfuric acid-Nitric acid Digestion และ ตรวจวัดสีเพื่อหาปริมาณฟอสฟอรัสรวมด้วยวิธี Ascorbic Acid Method ซึ่ง Ammonium Molybdate และ Antimony Potassium Tartrate จะทำปฏิกิริยากับ Othophosphate ในสภาวะที่เป็นกรดเกิดเป็น Phosphomolybdic acid ซึ่งถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก ได้สี Molybdenum Blue ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้วัดฟอสเฟตได้ต่ำถึง 10 $\mu g/l$

การเก็บรักษาตัวอย่างน้ำ น้ำตัวอย่างที่ต้องการหาเฉพาะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดอาจเติม HCl เข้มข้น 1 ml/ l หรือแช่แข็งโดยไม่ต้องเติมกรดก็ได้ และ เนื่องจากฟอสเฟตอาจเกาะติดพลาสติก จึงไม่ควรใช้ขวดพลาสติกในการเก็บตัวอย่างน้ำ การล้างขวด หรือ ภาชนะแก้วควรใช้กรดเกลือเจือจางที่ร้อน และ ชำระด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ไม่ควรใช้น้ำยาล้างจาน หรือ ผงซักฟอกใด ๆ ที่มีฟอสเฟตเป็นส่วนผสมในการทำความสะอาดเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

สำหรับ Sulfuric acid-Nitric acid Digestion

1. Hot Plate
2. Beaker 150 ml sized ที่ล้างด้วยกรด และ น้ำกลั่นจนสะอาด
3. กระจกนาฬิกาเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm
4. Volumetric Flask 50 ml sized
5. Erlenmeyer Flask 1250 ml sized

สำหรับการวัดเทียบสีด้วยวิธี Ascorbic Acid Method

1. Spectrophotometer
2. เครื่องแก้วที่ล้างด้วยกรด และ น้ำกลั่นจนสะอาด

น้ำยาเคมี

สำหรับ Sulfuric acid-Nitric acid Digestion

1. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์
2. conc. H_2SO_4
3. conc. HNO_3
4. NaOH 5 N

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สำหรับการวัดเทียบสีด้วยวิธี Ascorbic Acid Method

1. สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มัล : เติม conc. H_2SO_4 70 ml ลงในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml
2. Antimony Potassium Tartrate Solution: ละลาย 1.3715 g ของ $K(SbO)C_4H_4O_6 0.5H_2O$ ในน้ำกลั่น 400 ml แล้วเจือจางเป็น 500 ml ในขวดวัดปริมาตร เก็บในขวดแก้ว
3. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium Molybdate Solution): ละลาย $(NH_4)_6MO_7O_24H_2O$ 20 g ในน้ำกลั่น 500 ml เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4°C
4. กรดแอสคอร์บิค (Ascorbic Acid Solution) 0.1 โมลาร์ : ละลายกรดแอสคอร์บิค 1.76 g ในน้ำกลั่น 100 ml สารละลายนี้จะคงตัวประมาณ 1 สัปดาห์ ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
5. น้ำยารวม (Combined Reagent): ผสมน้ำยาเคมีที่กล่าวแล้วข้างต้นในสัดส่วนสำหรับ 100 ml ดังนี้

สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มัล	50 ml
Antimony Potassium Tartrate Solution	5 ml
Ammonium Molybdate Solution	15 ml
Ascorbic Acid Solution	30 ml

ก่อนผสมต้องปล่อยให้สารละลายแต่ละชนิดอยู่ที่อุณหภูมิห้องก่อน แล้วนำมาผสมโดยผสมให้เข้ากันทุกครั้งเมื่อเติมส่วนผสมแต่ละชนิด (ให้เติมเรียงลำดับไป) ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นในน้ำยารวม หลังจากเติม Antimony Potassium Tartrate Solution หรือ Ammonium Molybdate Soltuion ให้เขย่าน้ำยาเคมีรวมนี้ แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จนกระทั่งความขุ่นหายไป จึงจะเติมน้ำยาตัวอื่นต่อไป น้ำยารวมนี้อยู่ตัวได้นาน 4 ชั่วโมง

6. สารละลาย Phosphate Stock Soltion : ละลาย Anhydrous KH_2PO_4 219.5 mg ในน้ำกลั่น และเจือจางให้เป็น 1000 ml
7. สารละลาย Phosphate Standard Solution : นำ Phosphate Stock Solution มา 50 ml เติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 ml ซึ่งสารละลาย Phosphate Standard Solution นี้ 1 ml = P 2.5 μg

วิธีวิเคราะห์

1. Digestion

1.1) นำตัวอย่างน้ำมา 50 ml ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 ml เติม conc. H_2SO_4 0.5 ml และ conc. HNO_3 2.5 ml

1.2) นำตัวอย่างมาตั้งบน Hot Plate ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 220°C ใส่ glass bead 5 เม็ด ปิดปากบีเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา

1.3) Digest ตัวอย่างจนได้ปริมาตร 10 ml แล้ว Digest ต่อไปจนกระทั่งได้สารละลายที่ไม่มีสีเพื่อไล่ HNO_3

1.4) ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่นประมาณ 10 ml. กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง GF/A ใน Volumetric Flask ขนาด 50 ml ใส่ฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 5 หยด ค่อย ๆ เติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 N จนได้สีชมพูอ่อน เติมน้ำจนได้ปริมาตร 50 ml และเทใส่ Erlenmeyer Flask ขนาด 125 ml และทำให้สีชมพูหายไปโดยหยด conc. H_2SO_4 2-3 หยดจนสีชมพูหายไป

2. การหาปริมาณออโธฟอสเฟตโดย Colorimetric Method (by Ascorbic Method)

นำตัวอย่างน้ำจากข้อ 1.4 มาเติมด้วย น้ำยารวม 8 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 880 nm โดยใช้ Reagent Blank เทียบสี A = 0

3. การทำ Correction สำหรับตัวอย่างน้ำที่มีสีหรือความขุ่น

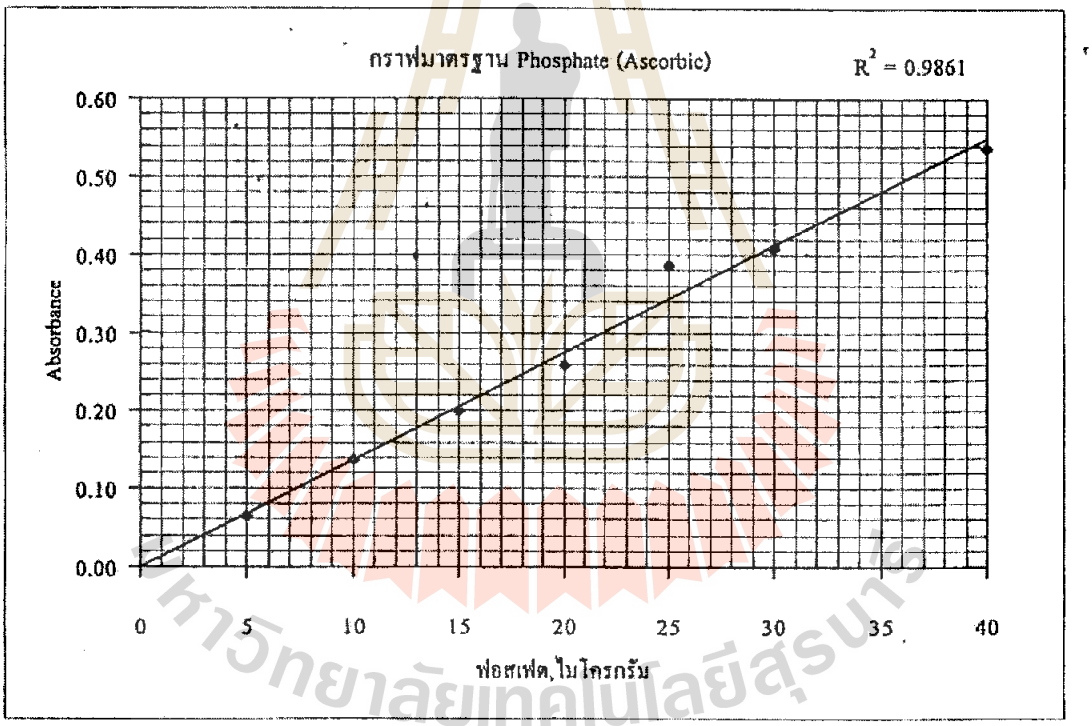
โดยทั่วไปสีของน้ำธรรมชาติจะไม่ขัดขวางการหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูง ๆ ซึ่งใช้อยู่ แต่ในกรณีที่น้ำขุ่น หรือมีสีมากให้ใช้น้ำตัวอย่างเป็นแบลงค์ โดยเติมน้ำยาทุกอย่างยกเว้นสารละลายกรดแอสคอร์บิค และ สารละลาย Antimony Potassium Tartrate Solution ลงในตัวอย่าง นำไป ตั้งค่า A = 0 แล้ววัด Absorbance ของตัวอย่างน้ำที่เติมน้ำยาครบทุกชนิด

4. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมอนุกรมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตดังนี้ 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 μg โดนปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (1 ml = 2.5 μg P) มา 0,2,4,6,8,10 และ 12 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 ml แต่ละขวด แล้วเติมน้ำยารวม 8.0 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัด Absorbance ที่ได้แต่ละความเข้มข้นโดยใช้กราฟดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 1

5. การคำนวณ

$$\text{ฟอสเฟต (mg/l)} = \frac{\mu g\ P \text{ ที่อ่านได้จากกราฟ}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (ml)}}$$



รูปที่ 11-1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานฟอสเฟตโดยวิธีกรดแอสคอร์บิค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ สิริสิงห. **เคมีของน้ำ น้ำโสโครก และการวิเคราะห์.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : บริษัท ประยูรวงศ์ จำกัด, 2525.

ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.**การควบคุมดูแลระบบบำบัดน้ำเสีย.** กรุงเทพฯ:, 2537.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. **คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ,2535.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และ มั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์. **เคมีของน้ำและน้ำเสีย.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬา ลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2545.

Grenbrg E A, Clesceri S L, and Eaton D A, **Standard method for the Examination of Water and Wastewater.** 18th Ed. Washington:, 1992

Sawyer NC, McCarty L P and Parkin F G. **Chemistry for Environmental Engineering.** 4th Ed. Singapore: Mcgrawhill, 1994

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี