คู่มือปฏิบัติการ

รายวิชา 617 427 การวิเคราะห์น้ำและน้ำเสีย

(Water and Wastewater Analysis)

อาจารย์ ดร.สิราภรณ์ โพธิวิชยานนท์
สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคการศึกษา 1/2552

สารบัญ

หน้า

เรื่องที่ 1	อุณหภูมิ สี ความขุ่น และสภาพการนำไฟฟ้า	1-1
เรื่องที่ 2	การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย	2-1
เรื่องที่ 3	การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส	3-1
เรื่องที่ 4	การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน	4-1
เรื่องที่ 5	การวิเคราะห์น้ำมันและไขมัน	5-1
เรื่องที่ 6	การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย	6-1

เอกสารอ้างอิง

กฎระเบียบพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เรื่องที่ 1
การตรวจลักษณะน้ำทางกายภาพ
อุณหภูมิ สี ความขุ่น สภาพการนำไฟฟ้า

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาสามารถตรวจวิเคราะห์ วิจารณ์ และสรุปการศึกษาทดลองลักษณะน้ำทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ สี ความขุ่น และสภาพการนำไฟฟ้าได้อย่างถูกต้อง

1. **อุณหภูมิ** (Temperature)

หมายถึง ระดับความร้อน อุณหภูมิของน้ำที่ปล่อยลงสู่แม่น้ำลำธารสาธารณะ มีผลต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยที่สิ่งมีชีวิตในน้ำอาจถึงตายได้ในกรณีที่อุณหภูมิของน้ำทิ้งสูงเกินไปและยังมีผลให้การละลายของออกซิเจนในน้ำลดลงอีกด้วย

เครื่องมือและอุปกรณ์ เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

2. **สี** (Color)

สีในน้ำที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการมีอยู่ของเหล็ก แมงกานีส แพลงตอน เศษซากพืชซากสัตว์รวมถึงการปนเปื้อนของของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งการกำจัดสีนั้นส่วนใหญ่ทำเพื่อให้เหมาะแก่การใช้น้ำในการอุปโภคบริโภค โดยเฉพาะสีในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ควรกำจัดก่อนปล่อยทิ้งสู่แหล่งน้ำสาธารณะ การเก็บตัวอย่างน้ำที่จะทำการวัดสี ควรเก็บในภาชนะแก้วที่สะอาดและควรทำการวิเคราะห์หาค่าทันทีที่เก็บตัวอย่างมา แต่ถ้าไม่สามารถทำได้จะต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4°ซ.

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. หลอดเนสสเลอร์ (Nessler) ความจุ 50 มล. ที่มีสีของหลอดไม่แตกต่างกัน
2. รีเอเจนต์ (Reagent) สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทติเนทที่มีความเข้มข้นของสี 500 หน่วยสี ละลาย 0.1246 กรัม โพแทสเซียมคลอโรแพลทติเนท (Potassium chloroplatinate; K_2PtCl_6) และ 0.1 กรัมของผลึกโคบอลตัสคลอไรด์ (Crystallised Cobaltous chloride; $CoCl_2.6H_2O$) ในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอยู่ 10 มล. และปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มล. จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของสีเท่ากับ 500 หน่วยสี
3. สารละลายสีมาตรฐาน

นำสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทติเนทที่มีความเข้มข้นของสี 500 หน่วยสี มาเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของสีตั้งแต่ 5-70 หน่วยสี ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทำสารละลายสีมาตรฐาน

มล. ของสารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทติเนท เจือจางให้เป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น	สีในหน่วยของคลอโรแพลทติเนท
0.0	0
0.5	5
1.0	10
1.5	15
2.0	20
2.5	25
3.0	30
3.5	35
4.0	40
4.5	45
5.0	50
6.0	60
7.0	70

หมายเหตุ ควรเก็บสารละลายมาตรฐานนี้ไว้ในภาชนะที่สะอาดและปิดสนิท เพื่อป้องกันการระเหยและการปนเปื้อนระหว่างการเก็บ

วิธีดำเนินการทดลอง

นำตัวอย่างน้ำมาแยกโดยใช้แรงเหวี่ยงเพื่อให้ของแข็งที่แขวนลอยอยู่ตกตะกอนจนหมดและได้ส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสใส่ลงในหลอดเนสสเลอร์ นำไปเปรียบเทียบกับสารละลายสีมาตรฐานที่เตรียมไว้ ในกรณีที่สีของน้ำมีความเข้มข้นมากเกิน 70 หน่วยสี ต้องเจือจางตัวอย่างน้ำด้วยน้ำกลั่นก่อนนำมาเทียบสี สำหรับวิธีการเทียบสีโดยดูจากด้านบนทางปากหลอดลงไป หาฉากสีขาวที่เอียงทำมุมเพื่อให้แสงตกกระทบในแนวขึ้น

วิธีการคำนวณ

$$\text{หน่วยสี} = \frac{A \times 50}{V}$$

A = ค่าที่อานได้จากการเทียบสี

V = ปริมาตรของตัวอย่างน้ำทิ้งที่นำมาเจือจาง, มล.

3. **ความขุ่น** (Turbidity)

ความขุ่นของน้ำเกิดจากมีสารแขวนลอยต่างๆ อยู่ เช่น ดิน ตะกอน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ แพลงตอน และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่นๆ ควรทำการวิเคราะห์ทันทีเมื่อเก็บตัวอย่างมา แต่ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในวันนั้น จะต้องเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิประมาณ 4°ซ และควรทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

การวัดความขุ่นของน้ำมี 2 วิธี คือ

1. วิธีดูด้วยตาเปล่า (Visual Methods)
2. วิธีเนฟิโลเมตริก (Nephelometric Methods)

วิธีเนฟิโลเมตริก (Nephelometric Methods)

วิธีนี้เป็นการวัดความขุ่นโดยเปรียบเทียบความเข้มของแสงที่กระจัดกระจายของตัวอย่างกับของสารมาตรฐานภายใต้สภาวะเดียวกัน ความเข้มของแสงที่กระจัดกระจายมากจะมีความขุ่นมาก สารละลายความขุ่นมาตรฐานที่ใช้คือ ฟอร์มาซินโพลีเมอร์ (Formazin Polymer) ประกอบด้วยสารละลาย 2 อย่างคือ สารละลายไฮดราซีนซัลเฟต (Hydrazine Sulfate) กับสารละลายเฮกซา เมธิลลีน เตตระมีน (Hexamethylene Tetramine) ความขุ่นที่อ่านได้จะมีหน่วยเป็นเอ็นทียู (Nephelometric Turbidity Units; NTU) หรือเอฟทียู (Formazin Turbidity Units; FTU)

สิ่งรบกวนการวิเคราะห์สำหรับวิธีนี้คือ ตะกอนหรือสิ่งที่ตกตะกอนเร็ว ฟองอากาศ การสั่นสะเทือนที่ไปรบกวนผิวน้ำ เครื่องแก้วที่มีรอย ตัวอย่างน้ำที่มีสีซึ่งเป็นสีจริง

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือวัดความขุ่นแบบเนฟิโลมิเตอร์ (Nephelometer)
2. หลอดวัดตัวอย่างน้ำ (Sample Tubes) ที่ไม่มีรอย
3. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask)
4. น้ำกลั่น (Distilled Water)
5. สารละลายสต๊อคความขุ่นมาตรฐาน (Stock Standard Turbidity Suspension)

   5.1 <u>สารละลายที่ 1</u> ละลาย 1 กรัม ของไฮดราซีนซัลเฟต (Hydrazine Sulfate; $(NH_2)_2.H_2SO_4$) ในน้ำกลั่นและเจือจางให้เป็น 100 มล.ในขวดวัดปริมาตร

   (ข้อควรระวัง ไฮดราซีนซัลเฟต เป็นสารก่อมะเร็ง ควรหลีกเลี่ยงการสูดหายใจเข้าไป การกิน และการสัมผัสทางผิวหนัง)

   5.2 <u>สารละลายที่ 2</u> ละลาย 10 กรัมของเฮกซาเมททิลีนเตตรามีน (Hexamethylene tetramine; $(CH_2)_6N_4$) ในน้ำกลั่นและเจือจางให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

   5.3 <u>สารละลายผสม</u> ผสม 5 มล.ของสารละลายที่ 1 และ 5 มล.ของสารละลายที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่ 25±3°ซ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มล.ในขวดวัดปริมาตร จะได้ค่าความขุ่น 400 NTU สารละลายในข้อ 5 นี้ต้องเตรียมใหม่ทุกเดือน
6. สารละลายความขุ่นมาตรฐาน (Standard Turbidity Suspension) เตรียมโดยเจือจาง 10 มล. ของสารละลายผสมในข้อ 5.3 ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มล.ในขวดวัดปริมาตร จะได้ความขุ่นมาตรฐานที่มีค่าเท่ากับ 40 NTU สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

7. เจือจางสารละลายในข้อ 6 ด้วยน้ำกลั่นให้มีความขุ่นต่างๆ กัน เช่น 0, 10, 20, 30 และ 40 NTU เป็นต้น เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน ซึ่งต้องทำทุกวัน

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ปรับตั้งเครื่องวัดความขุ่นตามคู่มือของเครื่อง และทำกราฟมาตรฐานจากสารละลายความขุ่นมาตรฐานที่เตรียมไว้
2. การวัดความขุ่นที่มีค่าต่ำกว่า 40 NTU ให้เขย่าตัวอย่างและรอจนฟองอากาศหมด เทตัวอย่างน้ำลงในหลอดวัดความขุ่นและจุ่มลงใน ultrasonic bath เป็นเวลา 1 หรือ 2 วินาที อ่านค่าจากเครื่องมือวัดความขุ่น
3. การวัดความขุ่นที่มีค่าสูงกว่า 40 NTU ให้เจือจางตัวอย่างน้ำ ด้วยน้ำกลั่น จนได้ความขุ่นที่ไม่เกิน 40 NTU และนำไปวัดจากเครื่อง

วิธีการคำนวณ

$$\text{ความขุ่น (เอ็นทียู)} = \frac{A \times (B+C)}{C}$$

A = เอ็นทียู ที่อ่านได้เมื่อเจือจางตัวอย่างน้ำ

B = ปริมาตรของน้ำที่ใช้เจือจาง, มล.

C = ปริมาตรของตัวอย่างน้ำที่นำมาเจือจาง, มล.

รายงานผลตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การรายงานผลค่าความขุ่นในช่วงต่างๆ

ช่วงความขุ่น (เอ็นทียู)	รายงานผลใกล้เคียงค่านี้ที่สุด (เอ็นทียู)
0-1.0	0.05
1-10	0.1
10-40	1
40-100	5
100-400	10
400-1,000	50
>1,000	100

4. **สภาพนำไฟฟ้าจำเพาะ** (Conductivity, K) **สภาพนำไฟฟ้า** (Conductance, G)

สภาพนำไฟฟ้าเป็นตัวเลขที่บอกถึงความสามารถของน้ำในการนำกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นทั้งหมดของสารที่มีประจุที่ละลายอยู่ในน้ำ และอุณหภูมิขณะที่ทำการวัด นอกจากนี้ชนิด ความเข้มข้น และจำนวนประจุของสารที่มีประจุจะมีผลต่อความสามารถในการนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำนั้น สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้ดีคือ สารประกอบอนินทรีย์ของกรด ด่าง และเกลือ ตามลำดับ ในทางกลับกัน สารประกอบอินทรีย์ เช่น ซูโครส เบนซิน เป็นตัวนำไฟฟ้าที่ไม่ดี เป็นต้น

เครื่องมือที่มีการบันทึกขณะทำการวัด (Monitoring Equipment) จะเป็นประโยชน์มากในการวัดค่าสภาพนำไฟฟ้าของตัวอย่างน้ำสม่ำเสมอ เช่น ในการวัดตัวอย่างน้ำที่มีการไหลตลอดเวลา เครื่องที่ใช้วัดนี้อาจจะวัดได้เฉพาะค่าสภาพนำไฟฟ้าเพียงค่าเดียว เรียกว่า อุปกรณ์วัดเพียงค่าเดียว (Single Parameter Instrument) หรืออาจจะวัดค่าสภาพนำไฟฟ้าพร้อมกับจดบันทึกตัวแปรอื่น เช่น ออกซิเจนละลาย พีเอช และอุณหภูมิ ปัญหาสำคัญสำหรับการใช้เครื่องมือชนิดนี้ที่มีผลต่อการวัดคือ ความสกปรกของอิเลคโทรดและการหมุนเวียนของสารละลายรอบอิเลคโทรดนั้นไม่เพียงพอ

ประโยชน์ที่ได้จากค่าสภาพนำไฟฟ้า

1. สามารถที่จะใช้ค่าสภาพนำไฟฟ้าในการคาดคะเนผลของประจุไฟฟ้าต่างๆ ที่มีต่อสมดุลทางเคมี และผลทางกายภาพที่มีต่อพืชและสัตว์ และอัตราการกัดกร่อนของสารต่างๆ
2. ใช้ในการตรวจความบริสุทธิ์ของน้ำกลั่นและน้ำที่ไม่มีประจุ
3. การเปลี่ยนแปลงในปริมาณความเข้มข้นของโลหะที่ละลายในน้ำทิ้งหรือน้ำอื่นๆ สังเกตเห็นได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีการวัดสภาพนำไฟฟ้าอย่างสม่ำเสมอ
4. การวัดค่าสภาพนำไฟฟ้าทำให้ทราบถึงจำนวนสารประกอบไอออนิคที่ใช้ในการตกตะกอนและในการทำให้เป็นกลาง ซึ่งจุดยุติ (End Point) ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนของความลาดชัน (Slope) ของกราฟที่ได้จากการเขียนขึ้นระหว่างค่าสภาพนำไฟฟ้าและการอ่านปริมาตรของสารจากบิวเรตต์
5. สามารถใช้ในการประมาณค่ามิลลิอิควิวาเลนท์/ลบ.ดม. (milliequivalent/cu.dm.) ของทั้งประจุลบและประจุบวกในน้ำโดยนำ 0.01 คูณกับค่าสภาพนำไฟฟ้าในหน่วยของไมโครซีเมนส์/ซม. (micro Siemen/cm)

$$\text{มิลลิอิควิวาเลนท์/ลบ.ดม.} = \text{สภาพนำไฟฟ้า} \times 0.01$$

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องวัดความนำไฟฟ้า
2. เทอร์โมมิเตอร์
3. เซลล์การนำไฟฟ้า (Conductivity Cell)
4. รีเอเจนต์
   4.1 น้ำกลั่นซึ่งมีความนำไฟฟ้าจำเพาะ (Specific Conductance) น้อยกว่า 1 ไมโครซีเมนส์/ซม.
   4.2 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมคลอไรด์ (Standard Potassium Cholride Solution, KCl) 0.01 โมล/ลบ.ดม.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. หาความคงที่ของเซลล์ (Cell Constant, C)

   ล้างเซลล์การนำไฟฟ้าด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมล/ลบ.ดม. อย่างน้อย 2 ครั้ง ปรับอุณหภูมิของเครื่องให้เท่ากับอุณหภูมิของสารละลายให้มีอุณหภูมิไม่ต่างกว่า 25.0 ± 0.1°ซ. วัดความต้านทานของสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ และจดอุณหภูมิไว้

$$C = \frac{0.001413\ RKCl}{1 + 0.0200\ (t-25)}$$

C = Cell Constant ความคงที่ของเซลล์, ซม.$^{-1}$ ที่ t°ซ.

R = ความต้านทางของสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมล/ลบ.ดม. ที่วัดได้, โอห์ม

t = อุณหภูมิของสารละลาย, °ซ.

2. วัดความนำไฟฟ้าจำเพาะ (Conductivity Measurement, K)

ล้างเซลล์ 1-2 ครั้ง ด้วยตัวอย่างน้ำ ปรับอุณหภูมิสุดท้ายของตัวอย่างน้ำ ให้เท่ากับอุณหภูมิของสารละลาย (25±0.1°ซ.) ให้มีอุณหภูมิไม่ต่างกว่า 0.1 °ซ. วัดความต้านทาน (Resistance) ของตัวอย่างและจดอุณหภูมิ

$$K = \frac{1{,}000{,}000C}{R/[1+0.0200\ (t-25)]}$$

K = การนำไฟฟ้า, ไมโครซีเมนส์/ซม.

R = ความต้านทานของตัวอย่างน้ำ, โอห์ม

C = ความคงที่ของเซลล์ที่หาได้จากข้อ 1

t = อุณหภูมิ, °ซ.

ในกรณีที่เครื่องมือวัดได้แต่ค่าการนำไฟฟ้า (Conductance, G) เมื่อจะคำนวณหาค่าความนำไฟฟ้าจำเพาะให้แทนค่า R ด้วย $\frac{1}{G}$ ซึ่งค่าความนำไฟฟ้ามีหน่วยเป็นซีเมนส์-ซม.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เรื่องที่ 2
การวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen, DO)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนในน้ำด้วยวิธี The Azide Modification of The Winkler Method ได้อย่างถูกต้อง

ออกซิเจนเป็นก๊าซที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆทั้งที่อาศัยอยู่บนพื้นดินและในน้ำ สิ่งมีชีวิตในน้ำได้รับออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงของพืชที่ปล่อยออกซิเจนอิสระออกมาละลายอยู่ในน้ำและจากการแพร่ของออกซิเจนจากบรรยากาศลงสู่พื้นน้ำ ออกซิเจนเป็นก๊าซที่ละลายน้ำได้น้อยมากและไม่ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับน้ำ การละลายของออกซิเจนขึ้นอยู่กับความดัน อุณหภูมิและปริมาณของแข็งละลายละลายปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำธรรมชาติและน้ำเสีย ขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมี กายภาพ และกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต ค่าออกซิเจนละลายมีความสำคัญใช้บอกให้ทราบได้ว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำและใช้ในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย และมลภาวะทางน้ำ

วิธีวิเคราะห์ออกซิเจนละลายที่นิยมใช้มี 2 วิธี

1. วิธี The Azide Modification of The Winkler Method หรือ เอไซด์ปรับปรุง
2. วิธีเมมเบรนอิเล็กโทรด (เครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำแบบเมมเบรน)

วิธีเอไซด์แบบปรับปรุงเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณอกซิเจนละลายได้ดีในน้ำเกือบทุกชนิด แม้ว่าจะยังไม่ได้ใช้กับน้ำเสียจากโรงงานบางอย่าง หรือน้ำที่มีสารลดออกซิเจนหรือสารเติมออกซิเจนอยู่ วิธีนี้เหมาะที่จะวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและไม่เหมาะที่จะใช้ในภาคสนามหรือใช้วัดออกซิเจนในแม่น้ำและในระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งต้องวัดออกซิเจนละลายอย่างต่อเนื่อง สำหรับวิธีเมมเบรนอิเล็กโทรดหรือใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำแบบเมมเบรนสามารถลดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งรบกวนต่างๆ ได้จากน้ำโสโครก น้ำที่ใสมาก และน้ำทิ้งของระบบบำบัดน้ำเสีย วิธีนี้ยังนิยมที่จะนำไปใช้ในภาคสนามอีกด้วย

การเก็บตัวอย่างน้ำ

การเก็บตัวอย่างน้ำต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากน้ำส่วนใหญ่มักมีค่าดีโอต่ำกว่าค่าอิ่มตัว การปล่อยให้น้ำตัวอย่างสัมผัสกับอากาศจะทำให้ผลผิดพลาด ด้วยเหตุนี้ขวดที่ใช้เก็บตัวอย่างน้ำที่จะวัดดีโอจึงใช้จุกแก้ว Ground joint เพื่อไม่ให้ตัวอย่างที่เก็บมาถูกอากาศ สำหรับน้ำผิวดินทั่วๆ ไป การเก็บตัวอย่างน้ำควรจะล้างขวดน้ำด้วยน้ำตัวอย่างก่อนเก็บตัวอย่าง และเก็บให้เต็มขวด ปิดจุกทันที อย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในขวด สำหรับการเก็บตัวอย่างที่ลึกมากกว่า 5 ฟุต ควรใช้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเฉพาะและจดอุณหภูมิของน้ำขณะเก็บด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธี The Azide Modification of The Winkler Method

ออกซิเจนจะออกซิไดซ์ Mn^{2+} เป็น Mn^{4+} ภายใต้สภาวะเป็นด่าง Mn^{4+} นี้สามารถจะออกซิไดซ์ I^- ไปเป็น I_2 อิสระภายใต้สภาวะที่เป็นกรดนั้นคือปริมาณของ I_2 อิสระที่ถูกขับออกมาจะสมมูลย์กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำตอนเริ่มต้นและวัดได้โดยการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังนี้

1. เมื่อเติม $MnSO_4$ และ Alkali - Azide

   $Mn^{+2} + 2OH \rightarrow Mn(OH)_2$ ตะกอนสีขาว

   ถ้าในน้ำมี O_2 จะเกิดปฏิกิริยาต่อไปนี้

   $Mn(OH)_2 + 1/2O_2 \rightarrow MnO_2 + H_2O$ ตะกอนสีน้ำตาล

2. เมื่อเติมกรดกำมะถันเข้มข้น I^- จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น I_2

   $MnO_2 + 2I^- + 4H^+ \rightarrow Mn^{+2} + I_2 + 2H_20$

3. ไตเตรทด้วย $Na_2S_2O_3$ เพื่อหาค่า I_2 ที่เกิดขึ้น

   $I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^-$

น้ำที่มีไนเตรทอยู่จะรบกวนการหาค่าออกซิเจนละลายทำให้ได้ค่าสูงกว่าจริง ควรกำจัดไนไตรท์ด้วยโดยใช้ NaN_3 ซึ่งใส่รวมกับน้ำยา Alkali-Iodide

สิ่งรบกวนการวิเคราะห์ออกซิเจนละลายมีสารหลายอย่างเช่น เกลือของธาตุ เหล็ก สารอินทรีย์ สารแขวนลอยที่มากเกินไป ซัลไฟด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คลอรีนที่ตกค้าง และไซยาไนด์

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. ขวดบีโอดี ขนาด 300 มล. พร้อมจุกแก้วที่เป็น ground joint
2. กระบอกตวงขนาด 250 มล.
3. ขวดเออร์เลนเมเยอร์ ขนาด 250 มล.
4. บิวเรตต์
5. สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (Manganese Sulfate, $MnSO_4$)

   ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$) 480 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($MnSO_4.2H_2O$) 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ($MnSO_4.H_2O$) 364 กรัม ในน้ำกลั่นกรองละลายแล้วกรองตะกอนออก ทำให้เจือจางเจือจางเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องไม่เกิดสีกับน้ำแป้งเมื่อเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ในสภาพที่เป็นกรด
6. สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (Alkali-Iodide-Azide)

   ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม (หรือโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 700 กรัม) และโซเดียมไอโอไดด์(NaI) 135 กรัม (หรือโพแตสเซียมไอโอไดด์ 150 กรัม) ในน้ำกลั่น เจือจางเป็น 1 ลิตร และละลายโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มล. แล้วเติมลงสารละลายข้างต้น
7. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (36 นอร์มัล) (conc. HCl)
8. น้ำแป้ง

   ละลายแป้ง (Soluble Starch) 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อนปริมาตร 100 มล. และเติมกรดซาลิไซลิก (Salicylic Acid) 0.2 กรัม

9. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 M

ละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) จำนวน 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เทียบค่าความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไบไอโอเดต 0.025 M โดยนำไปทดสอบ เก็บรักษาโดยการเติมคลอโรฟอร์ม 5 มล. หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.6 กรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร

10. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไบไอโอเดต 0.0021 M

ละลายโพแทสเซียมไบไอโอเดต ($KN(IO_3)_2$) 812.4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

11. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

ละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) ประมาณ 2 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มล. ใส่ขวด Flask เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 โมล/ลบ.ดม. จำนวน 1 มล. หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2-3 หยด และสารละลายมาตรฐานไบไอโอเดต 20 มล. แล้วทำให้เจือจางเป็น 200 มล. แล้วไตเตรทไอโอดีนซึ่งถูกขับออกมาด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต เติมน้ำแป้งเมื่อใกล้ถึงจุดยุติ สังเกตจากสีของสารละลายจะมีสีเหลืองอ่อน ถ้าสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตมีความเข้มข้น 0.025M พอดีปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรตจะเท่ากับ 20 มล. ถ้าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตไม่ได้ค่าดังกล่าว ให้ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.025M

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (โมลาร์, M) = 0.025 x A/20

A = ปริมาตรสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท, มล.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เติมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์ลงในขวดบีโอดีให้เต็มโดยใช้วิธีกาลักน้ำช้าๆ และปล่อยน้ำให้ล้นพ้นคอขวดออกมาชักพัก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ สำหรับตัวอย่างน้ำซึ่งเก็บจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น จากแม่น้ำ ทะเลสาบ เป็นต้น ถ้าเก็บบริเวณผิวน้ำให้คว่ำขวดบีโอดีแล้วกดให้จมลงใต้น้ำค่อยเอียงขวดขึ้นให้น้ำไหลเข้าขวดแทนที่อากาศจนเต็มขวด ยกขึ้นเหนือผิวน้ำ ถ้าเก็บบริเวณใต้น้ำลึกๆ จะต้องใช้เครื่องเก็บตัวอย่างน้ำพิเศษสำหรับขวดบีโอดีโดยเฉพาะ

2. เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 1 มล. และสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ (Alkali-iodide-azide) 1 มล.โดยให้ปลายปิเปตอยู่ข้างขวด ปิดจุกขวด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เขย่าให้เข้ากันโดยการกลับขวดไปมาประมาณ 15 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งให้ตกตะกอน (จะเกิดตะกอนสีน้ำตาล และถ้าเกิดตะกอนสีขาวแสดงว่าตัวอย่างน้ำไม่มีออกซิเจนละลาย) จนได้ปริมาณน้ำใสประมาณ ½ ขวด

3. เปิดจุกออกแล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล.โดยปล่อยให้กรดค่อยๆ ไหลลงไปตามข้างๆ คอขวด โดยให้ปลายปิเปตอยู่เหนือผิวน้ำ ปิดจุกขวดก่อนตะกอนจะล้นออกจากปากขวด เขย่าให้เข้ากันโดยการกลับขวดไปมาจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

4. ถ้าใช้ขวดบีโอดีที่มีความจุขนาด 300 มล. จะใช้ตัวอย่างน้ำจากขวดในข้อ 3 เท่ากับ 201 มล. เพื่อนำไปไทเทรต ปริมาตรตัวอย่างนี้มีค่าเท่ากับปริมาตรตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 200 มล. เนื่องจากมีการสูญเสียตัวอย่างน้ำจากขวดบีโอดีโดยการแทนที่ของสารละลายเคมีที่เติมลงไปทั้งสิ้น 2 มล. ($MnSO_4$ และ Alkali-iodide-azide) ดังนั้นปริมาตรน้ำตัวอย่างซึ่งใช้ในการไทเทรตจริงจึงควรเท่ากับ

$$\frac{200 \times 300}{(300-2)} = 201 \text{ มล.}$$

5. วัดปริมาตรของสารละลายในขวดมา 201 มล. แล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) 0.025 M จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 2-3 หยด (1 มล.) จะได้สีน้ำเงินเข้ม แล้วไทเทรตจนถึงจุดยุติเป็นสารละลายไม่มีสี จดปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรออกซิเจนละลาย (มก./ล.) = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต (มล.)

(ถ้าใช้ตัวอย่างน้ำในการไทเทรต 200 มล. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 M จำนวน 1 มล. จะมีค่าเท่ากับออกซิเจนละลาย 1 มก./ล.)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เรื่องที่ 3
การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสรวมในน้ำด้วยวิธี Ascorbic acid method ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ

ค่า Total Phosphorus ของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ Orthophosphate, Condensed phosphorus 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 Orthophosphate ในสภาวะที่เป็นกรดเกิดเป็น Phosphomolybdic acid ซึ่งถูกรีดิวซ์ด้วยกรดแอสคอร์บิก ได้สี Molybdenum Blue ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้วัดฟอสเฟตได้ต่ำถึง 10 µg/l

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

เครื่องมือ และอุปกรณ์

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

สารเคมี

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 $(NH_4)_6MO_7O_{24}4H_2O$ 20 g ในน้ำกลั่น 500 ml เก็บในขวดแก้ว
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 Solution ให้เขย่าน้ำยาเคมีรวมนี้ แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จนกระทั่งความขุ่นหายไป จึงจะเติมน้ำยาตัวอื่นต่อไป น้ำยารวมนี้อยู่ตัวได้นาน 4 ชั่วโมง

6. สารละลาย Phosphate Stock Solution : 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 = 2.5 µg P

วิธีดำเนินการทดลอง

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 และสารละลาย Antimony Potassium Tartrate Solution ลงในตัวอย่าง นำไป ตั้งค่า A = 0 แล้ววัด Absorbance ของตัวอย่างน้ำที่เติมน้ำยาครบทุกชนิด

4. **การเตรียมกราฟมาตรฐาน**

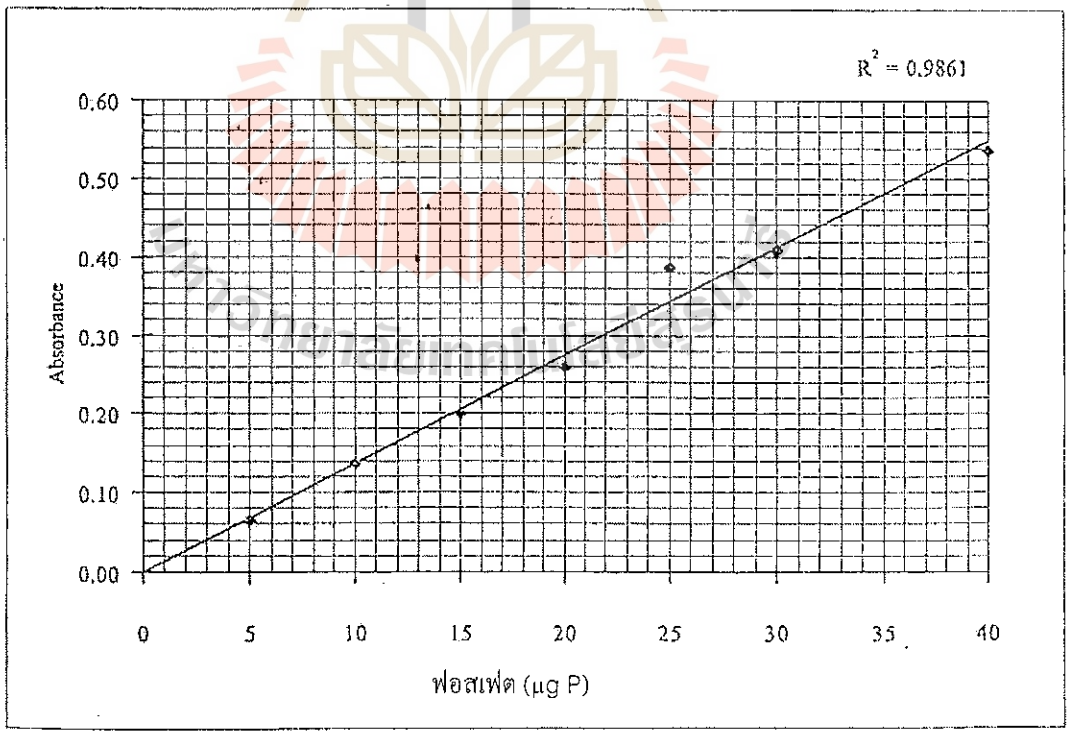
เตรียมอนุกรมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตดังนี้ 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 µg P โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต (1 ml = 2.5 µg P) มา 0,2,4,6,8,10 และ 12 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 ml แต่ละขวด แล้วเติมน้ำยารวม 8.0 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 30 นาที นำไปวัด Absorbance ที่ได้แต่ละความเข้มข้นโดยใช้กราฟดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 3-1

5. **การคำนวณ**

$$\text{ฟอสฟอรัส (mg/l)} = \frac{\text{µg P ที่อ่านได้จากกราฟ}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)}}$$

หรือ

$$\text{ฟอสฟอรัส (mg/l)} = \frac{\text{mg P (ในปริมาตรทั้งหมด 58 ml)}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml)}}$$



รูปที่ 3-1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานฟอสเฟตโดยวิธีกรดแอสคอร์บิค

เรื่องที่ 4
การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

1. **การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปของ** Total Kjeldahl Nitrogen (TKN)

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 ซึ่งสามารถหาค่าแอมโมเนียไนโตรเจนทั้งหมดได้โดยวิธีไทเทรตด้วยสารละลายกรดแก่มาตรฐาน ทำให้ทราบปริมาณของ TKN ที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำนั้น

ขั้นตอนสำคัญของการตรวจวิเคราะห์น้ำเพื่อหาค่า TKN

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

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

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 และอุปกรณ์

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. น้ำยาเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนการย่อยสลาย

Digestion Reagent

1.1 K_2SO_4 (Poassium Sulfate Anhydrous)

1.2 $CuSO_4$

1.3 Conc. H_2SO_4 (98%)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ละลาย 134 กรัม K_2SO_4 และ 7.3 กรัม $CuSO_4$ ในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม 134 มิลลิลิตรของ Conc. H_2SO_4 เมื่อเย็นลงเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เพื่อป้องกันการตกผลึก

2. น้ำยาเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนของการกลั่น

2.1 Sodium Hydroxide-Sodium Thiosulfate Reagent

ละลาย 500 กรัม NaOH และ 25 กรัมของ $Na_2S_2O_3.5H_2O$ ในน้ำกลั่นเจือจางให้ได้ 1 ลิตร

2.2 Indicating Boric Acid Solution

ละลาย H_3BO_3 20 กรัมในน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม Mix indicator 10 ml เจือจางให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น-

2.3 ฟีนอล์ทาลีน อินดิเคเตอร์ ($\phi\phi$)

3. น้ำยาเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนของการไทเทรต

3.1 H_2SO_4 0.02 N

เตรียมจากการนำสารละลายมาตรฐานกรดกำมะถัน 0.1N จำนวน 200 ml มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 ml

3.2 Mix Indicator

ละลาย Methyl Red 200 mg ใน Ethyl alcohol 95% 100 ml และ ละลาย Methylene blue 100 mg ใน Ethyl alcohol 95% 50 ml นำสารละลายทั้งสองชนิดมาผสมกัน เตรียมใช้แต่ละเดือน

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **ขนาดตัวอย่าง**

ใช้น้ำตัวอย่างปริมาณ 50 ml เติมลงใน Digestion tube และน้ำกลั่นเป็นแบลงค์

2. **การย่อยสลายตัวอย่าง**

ใส่ Digestion Reagent 50 ml หรือเตรียมสารดังต่อไปนี้ลงในตัวอย่างน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ 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 และเตรียมกลั่นในขั้นต่อไป

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 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**

ใส่หลอดของตัวอย่างน้ำที่ย่อยแล้ว หยด ϕϕ อินดิเคเตอร์ 4-5 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทำให้เป็นด่างโดยค่อย ๆ เติมน้ำยาโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟตจนเป็นชมพู แล้วนำไปกลั่น เริ่มกลั่นตามโปรแกรมต่อไปนี้

SP = 200°C	H_2O = 50
H_3BO_3 = 25 ml	NaOH = 50
Distillation Time = 2.15 min.	Steam = 100%

ให้กลั่นตัวอย่างน้ำและแบลงค์ลงในอินดิเคติงบอริคแอซิด (Indicating Boric Acid Solution) 50 ml ที่อยู่ใน Flask

สำหรับตัวอย่างที่กลั่นได้ นำไปหาปริมาณแอมโมเนียโดยวิธีไทเทรตด้วยกรดกำมะถัน 0.02 N สารละลายที่มีแอมโมเนียจะมีสีเขียว จุดยุติคือจุดที่สารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน กลั่นล้างเครื่องกลั่นทุกครั้งหลังการกลั่นแต่ละตัวอย่าง

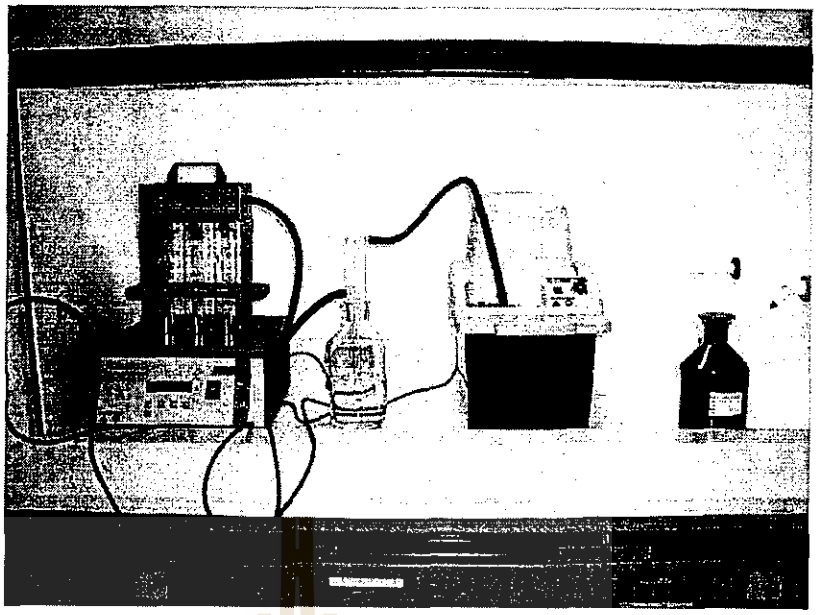
การคำนวณค่าจากการไทเทรต

$$\text{TKN (mg/l ในรูป N)} = \frac{(A-B) \times N \times 14 \times 1000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}}$$

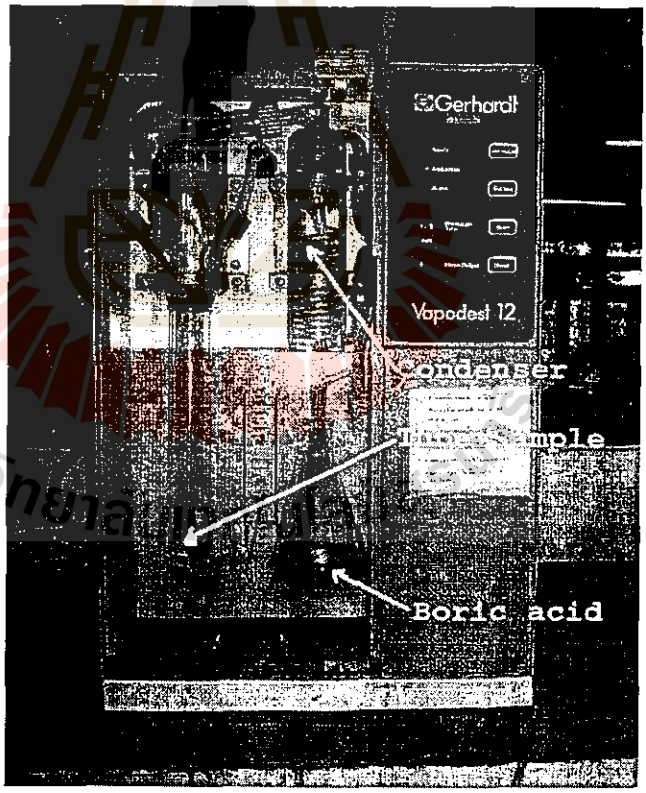
เมื่อ A = ml ของกรดกำมะถัน ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

B = ml ของกรดกำมะถัน ที่ใช้ในการไทเทรตแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรดกำมะถันเป็น Normality



รูปที่ 4-1 Digestion Unit



รูปที่ 4-2 Distillation Unit

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปของ Nitrite-Nitrogen

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ไนโตรเจนในน้ำด้วยวิธี Colorimetric Method ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ

ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด อิออนไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโนของซัลฟานิลาไมด์ให้เกลือไดอาโซเนียม ซึ่งจะรวมตัวกับ 1-แนพทิลเอทธิลีนไดอามีนไดไฮโดรคลอไรด์ N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride ที่พีเอช 2.0-2.5 เกิดเป็นสีเอโซ (Azo dye) ที่มีสีม่วงแดง สีที่เกิดขึ้นเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) วัดการดูดกลืนสีที่ความยาวคลื่น 543 nm

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. Spectrophotometer สำหรับวัดที่ความยาวคลื่น 543 nm พร้อมเซลล์แสงผ่าน (light path) ขนาด 2.5 เซนติเมตร

2. Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายซัลฟานิลาไมด์

ละลายซัลฟานิลาไมด์ 2.5 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อยๆ ใส่กรดเกลือ (conc. HCl) 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

2. สารละลายเอ็นอีดี

ละลายแนพทิลเอทธิลีนไดอามีนไดไฮโดรคลอไรด์ N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine Dihydrochloride 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น และควรเตรียมใหม่ทุกเดือนหรือเมื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล)

3. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมไนไตรเจนต่อลิตร

ละลาย 0.496 กรัมของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 110°C 1 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนไตรเจนต่อลิตร

เตรียมจากสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมไนไตรเจนต่อลิตร ให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร (2.5 มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานในข้อ 3 และปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร)

5. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

เตรียมจากสารละลายมาตรฐานจากข้อ 4 ให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.8, 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ให้มีปริมาตรแต่ละความเข้มข้น 50 มิลลิลิตร

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมน้ำตัวอย่าง ถ้าน้ำตัวอย่างมีสารแขวนลอย ให้กรองด้วยกระดาษกรอง Membrane filter ขนาด 0.45 µm

2. การทำให้เกิดสี ปิเปตน้ำตัวอย่างที่ใสหรือสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มาตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย เอ็นอีดี 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีถึง 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 543 nm

3. การทำกราฟมาตรฐาน นำค่าที่อ่านได้ของสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01-1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร มาทำกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

คำนวณตามสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปของ Nitrate-Nitrogen

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทไนโตรเจนในน้ำด้วยวิธี Brucine Method ได้อย่างถูกต้อง

หลักการ

ปฏิกิริยาระหว่างไนเตรทกับบรูซีนจะให้สีเหลือง ซึ่งจะสามารถวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นได้โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 410 nm และจะสามารถวิเคราะห์หาไนเตรทไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1-10 มก.ไนเตรทไนโตรเจนต่อลิตร

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. Spectrophotometer สำหรับวัดที่ความยาวคลื่น 410 nm พร้อมเซลล์แสงผ่าน (light path) ขนาด 2.5 เซนติเมตร
2. Rack
3. Boiling water bath อย่างน้อยให้อุณหภูมิ 98°C
4. Tube
5. น้ำเย็น หรือ Cool water bath

สารเคมี

1. สารละลายสต๊อกไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

ละลาย anhydrous KNO_3 721.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2. สารละลายมาตรฐานไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร

นำสารละลายสต๊อกไนเตรทมา 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3. สารละลายกรดซัลฟิวริก

ค่อยๆ เทกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 500 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ปิดจุกให้แน่น

4. สารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก

ละลาย 1 กรัมของบรูซีนซัลเฟต และกรดซัลฟานิลิก 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นร้อนประมาณ 70 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือ (conc. HCl) 3 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้เก็บได้นานหลายเดือน สีชมพูที่เกิดขึ้นไม่มีผลต่อการทดลอง *ควรระวังการใช้สารเพราะเป็นพิษ*

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ในช่วง 0.05, 0.1, 0.5,1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เตรียมน้ำตัวอย่าง ปิเปตน้ำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร หรือปริมาณน้อยกว่าแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. การทำให้เกิดสี จัดหลอดลงใน rack วาง rack ในน้ำเย็น เติมสารละลาย NaCl 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็นในน้ำเย็น สังเกตสีดังนี้

- ถ้ามีสีหรือความขุ่นเกิดขึ้นให้แบ่งตัวอย่างน้ำมาอ่านค่า Absorbance ที่ 410 nm ก่อน โดยจะเป็นค่าแบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank)

- ถ้าไม่มีสีหรือความขุ่นเกิดขึ้นให้ทำการทดลองต่อไป

หลังจากสังเกตสีแล้ว ให้เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายบรูซีน-กรดซัลฟานิลิก เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไป boil บน Boiling water bath ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็น รอจนตัวอย่างเย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 15-25°C นำมาอ่านค่า Absorbance ที่ 410 nm

* ให้หักค่า sample blank ออกจากค่าตัวอย่างน้ำที่อ่านได้จริงก่อน เพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริงของตัวอย่าง

ทำกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานไนเตรทในช่วงตามข้อ 1

การคำนวณ

คำนวณตามสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เรื่องที่ 5
การวิเคราะห์น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการและสามารถตรวจวิเคราะห์ไขมันในน้ำธรรมชาติ และ น้ำสะอาดด้วยวิธีการสกัดด้วยกรวยแยก และ ไขมันในน้ำทิ้งด้วยวิธี Soxhlet Extraction ได้

1. การสกัดน้ำมันและไขมันด้วยกรวยแยก

หลักการ

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

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. กรวยแยก (Separatory Funnel) ขนาด 500 มล. ที่ล้างด้วยเฮกเซนประมาณ 15 มล. ไว้ก่อนแล้ว
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 Sulfate Anhydrous)

วิธีดำเนินการทดลอง

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 มิลลิกรัม

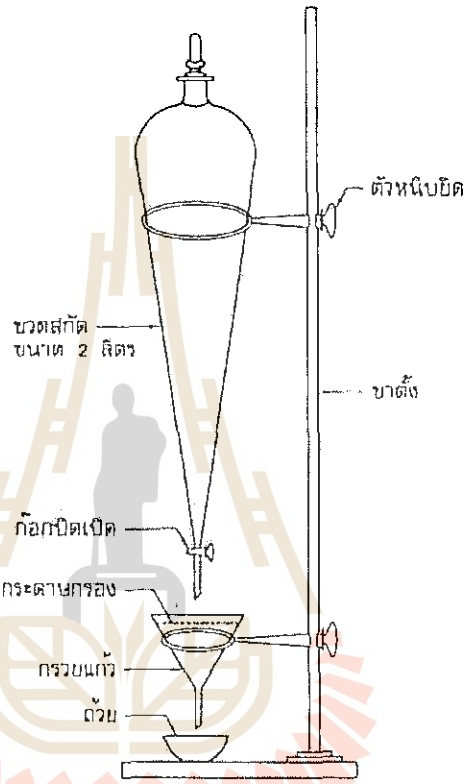
5. สกัดซ้ำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งไขมันและน้ำมันถูกสกัดออกจากตัวอย่างหมดแล้ว

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

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

การคำนวณ

ไขมันและน้ำมัน (มก./ลิตร) = $\frac{(B-A)\times 1000}{\text{ml Sample}}$



รูปที่ 5-1 อุปกรณ์สำหรับสกัดน้ำมันและไขมันด้วยกรวยแยก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

หลักการ

เป็นวิธีการที่จะแยกสารที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกันโดยอาศัยพื้นฐานการละลายในตัวทำละลายเช่น ฟรีออน, เฮกเซน, หรือ Carbon tetrachloride จากนั้นจึงนำตัวทำละลายที่มีไขมันและน้ำมันละลายอยู่ไประเหยจนแห้งที่อุณหภูมิ 103°C หรือต่ำกว่า ชั่งน้ำหนักตะกอนที่เหลือ ซึ่งจะเป็นปริมาณไขมัน และ น้ำมันในตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการวิเคราะห์

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) เช็ดไขมันที่ติดอยู่ที่ถ้วยบุคเนอร์ให้หมด แล้วนำสำลีไปใส่ใน Extraction Thimble ด้วย

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

4. **การสกัดน้ำมัน และไขมันจากตัวอย่าง**

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

* 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**

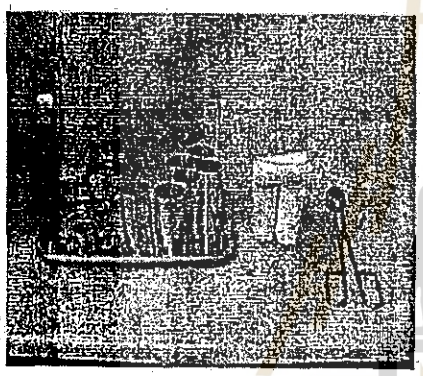
* นำ Extractioon vessel ไปที่อุณหภูมิ 80°C นาน 15 นาที ปล่อยทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

6. **การชั่งน้ำหนัก**

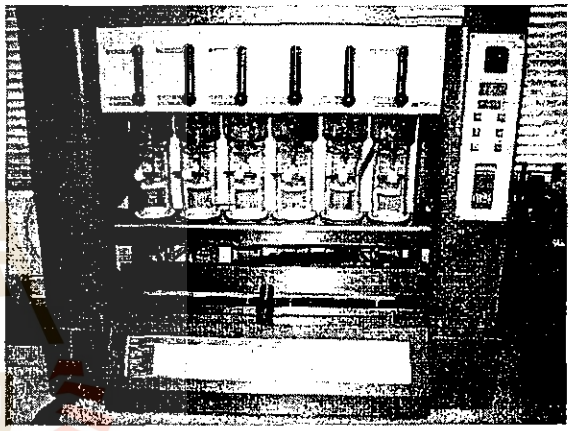
* ชั่ง Extraction vessel จากข้อ 5 ที่มี boiling stone อยู่ด้วย สมมติน้ำหนัก B มิลลิกรัม

7. **การคำนวณ และการแสดงผลการวิเคราะห์**

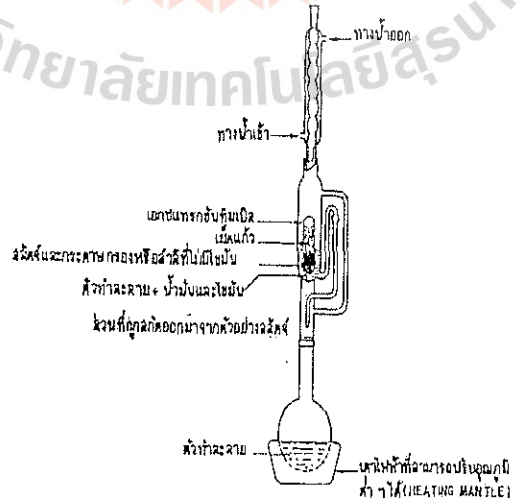
$$\text{ไขมัน และ น้ำมัน (mg/l)} = \frac{(B-A)\times 1000}{\text{ml Sample}}$$



Extraction vessels & Thimbles



Soxhlet Extraction Set



Soxhlet Extraction Set (แบบดั้งเดิม)

รูปที่ 5-2 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดน้ำมันและไขมัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เรื่องที่ 6
การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจหลักการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรียและสามารถตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย อันได้แก่ การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนีจาก Standard Plate Count, การตรวจวิเคราะห์ Coliform bacteria และ Fecal coliform ด้วยวิธี Standard Filter Technique ได้อย่างถูกต้อง

หลักการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางแบคทีเรีย

1. **อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ**

1.1 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ ควรเป็นขวดแก้วปากกว้างความจุประมาณ 125 มล. พร้อมฝาจุกแก้ว ผ่านการล้างให้สะอาด คว่ำ หรืออบให้แห้ง ปิดฝาจุกให้สนิท แล้วหุ้มด้วยกระดาษ Aluminum foil ตั้งแต่ฝาขวดถึงคอขวดสำหรับจับตอนเปิดหรือบรรจุลงกระป๋องโลหะเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ขวดเก็บตัวอย่างน้ำต้องปราศจากเชื้อโรค หรือ สิ่งปนเปื้อนโดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ การอบฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave แรงดันอัดไอ 15 psi ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับตัวอย่างน้ำประปา หรือ น้ำดื่มที่มีคลอรีนอิสระตกค้างเหลืออยู่ในตัวอย่างน้ำ จำเป็นต้องถูกจำกัดโดยการเติม $Na_2S_2O_3$ เข้มข้น 10% จำนวน 0.1 มล. ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

1.2 สำลี

1.3 แอลกอฮอล์ 70%

1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2. **การเลือกจุดเก็บตัวอย่างน้ำ**

2.1 น้ำดื่ม

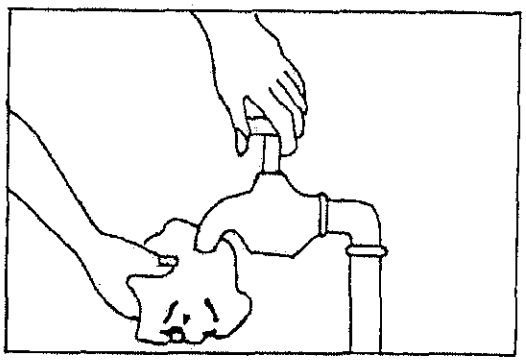
- ถ้าเป็นระบบประปามีท่อจ่ายน้ำ ควรเก็บตัวอย่างน้ำจากจุดที่น้ำออกจากระบบปรับปรุงคุณภาพน้ำจากต้นทางท่อจ่ายน้ำ และปลายทางท่อจ่ายน้ำ ถ้าระบบท่อจ่ายน้ำมีเส้นท่อแยกออกไปอีก ควรเก็บตัวอย่างที่เส้นท่อจ่ายน้ำที่แยกแขนงออกไปด้วย
- ถ้าเป็นน้ำจากบ่อตื้น หรือบ่อบาดาล เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อโดยตรง ถ้าจำเป็นให้ใช้ภาชนะที่สะอาดสุ่มเก็บหรือรองรับ แล้วถ่ายใส่ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

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

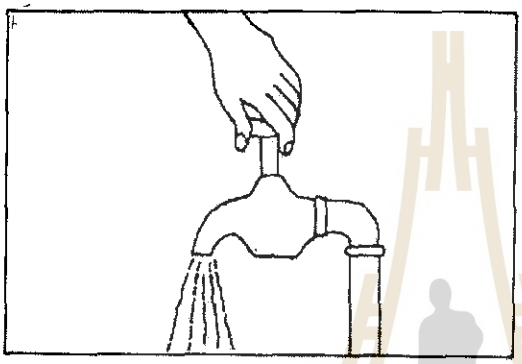
2.3 น้ำผิวดิน เก็บตัวอย่างน้ำ เหนือ ใต้ และ บริเวณแหล่งมลภาวะที่บริเวณ ¼, ½ และ ¾ ของความกว้างของแหล่งน้ำ ในกรณีที่แหล่งน้ำไม่กว้างมาก และต้องการเก็บเพียง 1 ตัวอย่างต่อ 1 จุด ให้เก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณกึ่งกลางน้ำที่ระดับความลึกใกล้ผิวน้ำนั้น

3. วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

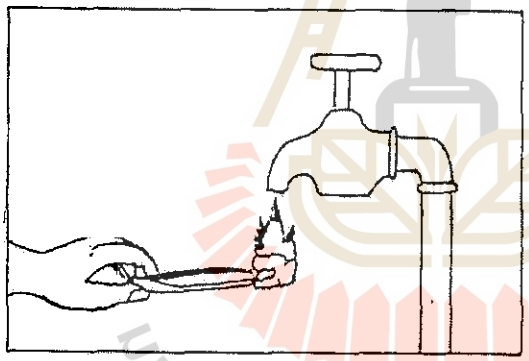
3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำจากก๊อก



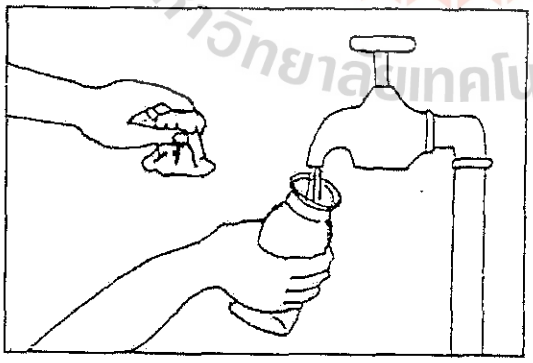
ก. ทำความสะอาดหัวก๊อกโดยใช้ผ้าสะอาดเช็ด



ข. เปิดน้ำที่ค้างอยู่ในท่อทิ้งไปก่อน โดยเปิดก๊อกให้น้ำไหลเต็มที่เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วปิดก๊อก

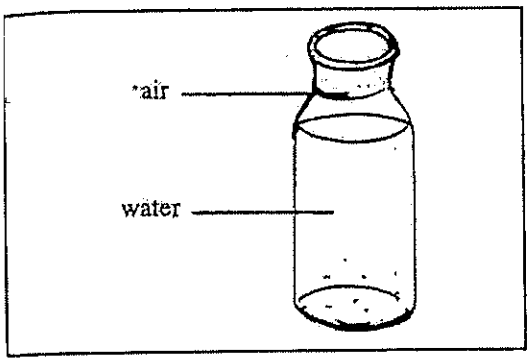


ค. ใช้ไฟลนปากก๊อก เพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 1 นาที



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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



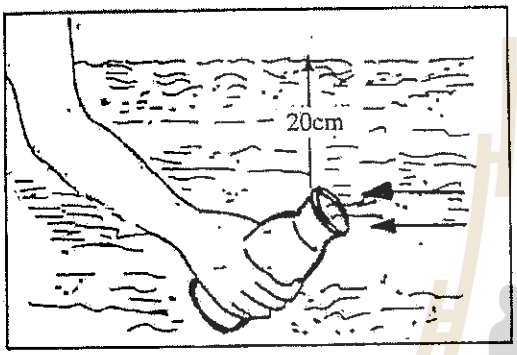
ฉ. พันรอยต่อของกระป๋องด้วยกระดาษกาวย่น 2-3 รอบ

ช. ปิดฉลากให้เรียบร้อย

ซ. นำกระป๋องบรรจุตัวอย่างน้ำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-10°C

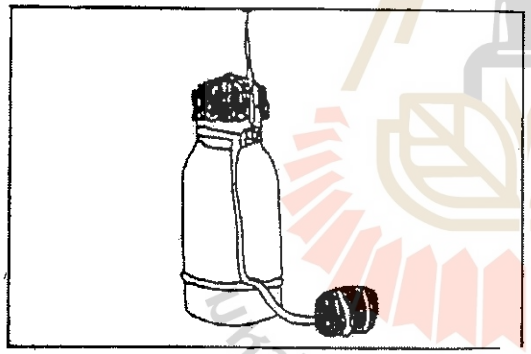
ฌ. นำส่งห้องปฏิบัติการทันที

3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทั่วไป

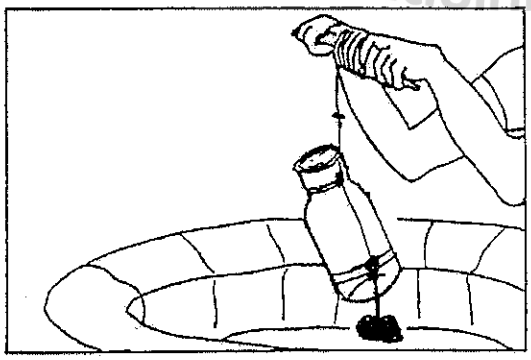


ก. เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถือขวดส่วนล่างจุ่มลงใต้แหล่งน้ำโดยหันปากขวดสวนทางกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำที่ระดับความลึก 20-30 cm จากผิวน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 4/5 ของขวด ปิดจุกนำขวดตัวอย่างบรรจุในกระป๋อง และ ปิดฉลาดข้างกระป๋อง

3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำ

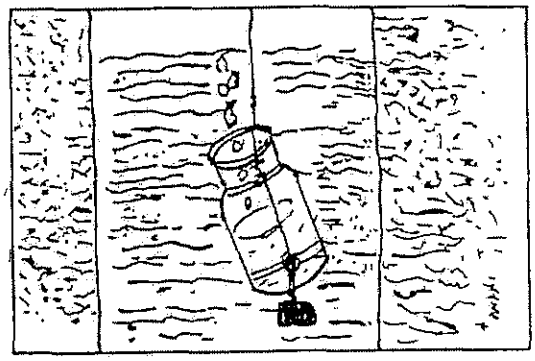


ก. เปิดขวดเก็บตัวอย่างซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เชือกผูกขวด และ ถ่วงติดกับพื้น

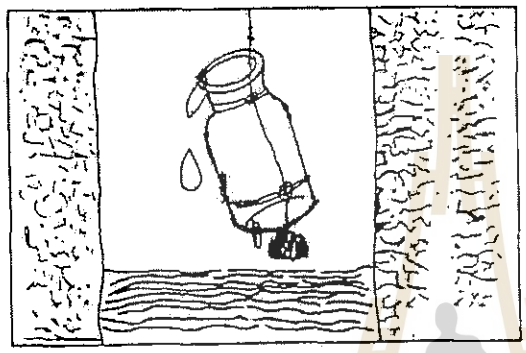


ข. หย่อนขวดเก็บตัวอย่างลงในบ่อ ระวังอย่าให้ขวดเก็บตัวอย่างน้ำไปถูกบริเวณขอบบ่อ

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.....

1. **การหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธี** Standard Plate Count

หลักการ

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป ซึ่งมีสมมุติฐานว่าเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต 1 เซลล์ ในจานเพาะเชื้อจะเจริญเติบโตเป็น 1 โคโลนี ดังนั้น จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในจานเพาะเชื้อก็คือจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำ

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. หลอดแก้วทดลอง
3. Plate Count Agar

Tryptone	5	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นตามสัดส่วนด้วยความร้อน ปรับเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้มีค่าเป็น 7.0 ± 0.2 แล้วตวงใส่หลอดที่มีจุกเกลียว หลอดละ ประมาณ 15 มล. 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

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำหลอดอาหารที่เตรียมแล้วมาต้มหลอมละลายอีกครั้ง แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 45°C
2. เตรียมตัวอย่างน้ำที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่จะเกิดโคโลนีในจานเพาะเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องเจือจางตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วยน้ำเจือจาง Dilution water

การเตรียม Dilution Water (DW) **ทำได้ดังนี้**

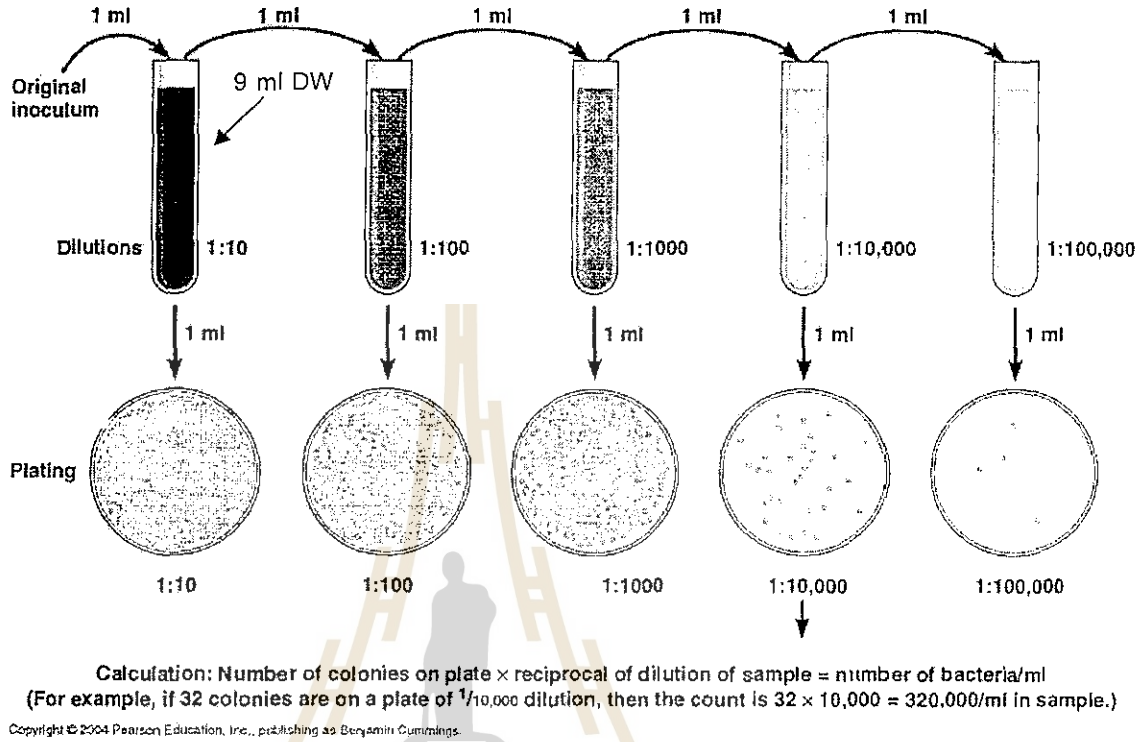
- เตรียม Potassium Phosphate Buffer Solution สามารถเตรียมได้โดยการละลาย KH_2PO_4 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. ต้มด้วยไฟอ่อนๆ ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 20°C กรอง แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย1 นอร์มัล NaOH (NaOH 40g ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร) เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

เตรียมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมจากการละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 60 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

เตรียม Dilution Water โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (Potassium Phosphate Buffer Solution) จำนวน 1.25 มล. และเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 5 มล. ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

- ปิเปตใส่หลอดทดลองจำนวนหลอดละ 9 มล.
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

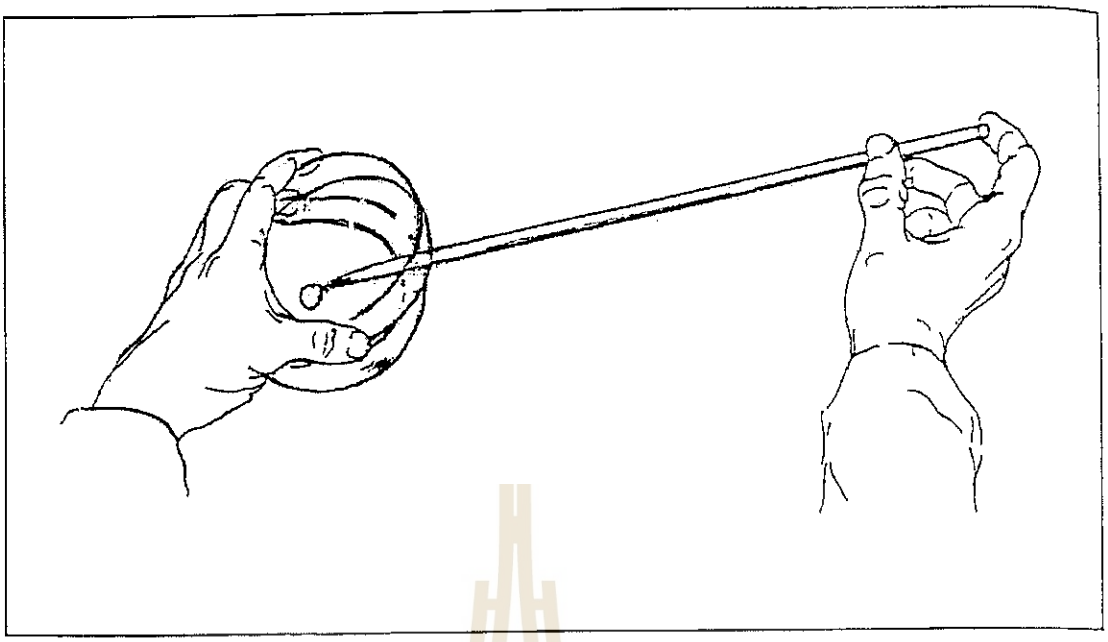
การเจือจางตัวอย่างทำได้โดยการดูดตัวอย่างน้ำ 1 มล. ใส่ลงในหลอดซึ่งมีสารละลายเจือจางตัวอย่าง 9.0 มล. เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียไม่เกาะกันเป็นกลุ่ม ตัวอย่างน้ำในหลอดตัวอย่างจะถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า (10^{-1}) และ ถ้าต้องการให้เจือจางลงอีก ให้ถ่ายตัวอย่างน้ำนี้ลงใส่สารละลายเจือจางอีกหลอดต่อไป



รูปที่ 6-1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำให้มีความเข้มข้นห่างกันระดับละ 10 เท่า โดยการใช้ Dilution Water (DW)

3. ถ่ายตัวอย่างน้ำที่เจือจางแล้วในข้อ 2 จากแต่ละ Dilution จำนวน 1 ลบ.ซม. (มล.) ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 ตามลงไป หมุนจากเพาะเชื้อในทิศทางตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง และหมุนไปทางซ้าย และ ขวา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างน้ำผสมกับอาหารกระจายไปทั่วจานเพาะเชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6-2 การใส่ตัวอย่างน้ำด้วยปิเปตลงในจานเพาะเชื้อ

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

การนับจำนวนโคโลนีและการรายงานผล

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ของแต่ละความเจือจางที่เหมาะสม
- คำนวณจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำ ดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย/ มิลลิลิตร (CFU/ml)} = \text{จำนวนโคโลนี} \times \frac{1}{\text{จำนวนเท่าที่เจือจาง}} \times \text{ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ใช้}$$

2. **การตรวจวิเคราะห์** Coliform bacteria **และ** Fecal coliform **ด้วยวิธีเยื่อกรอง**(Membrane Filter Technique)

หลักการ

การกรองตัวอย่างน้ำด้วยเยื่อกรอง (Membrane Filter) นั้นแบคทีเรียโดยทั่วไปจะไม่สามารถซึมผ่านเยื่อกรองได้เนื่องจากเยื่อกรองจะมี Pore Diameter ที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 0.45 ไมครอน แบคทีเรียที่ถูกดักจับอยู่บนผิวเยื่อกรองสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตเป็นโคโลนีอยู่บนแผ่นกรองด้วยอาหารที่เหมาะสมซึ่งสามารถซึมผ่านเยื่อกรองจากแผ่นซับ (Absorbent pad) ได้

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. Dilution Water
3. ปิเปตขนาด 1 ml และ 10 ml
4. กระบอกตวง
5. จานเพาะเชื้อ
6. ชุดกรอง
7. เยื่อกรอง
8. Sterile Absorbent Pad
9. Sterile Forceps
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. Colony Counter
12. Incubator
13. M-Endo Medium

Tryptose or Polypeptone	10	กรัม
Thiopeptone or Thiotone	5	กรัม
Casitone or Trypticase	5	กรัม
Yeast Extract	1.5	กรัม
Lactose	12.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
K_2HPO_4	4.375	กรัม
KH_2PO_4	1.375	กรัม
Sodium lauryl Sulfate	0.05	กรัม
Sodium Desoxycholate	0.1	กรัม
Na_2SO_2	2.1	กรัม
Basic Fuchsin	1.5	กรัม
95% Ethyl Alcohol	20	มล.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่นตามสวนซึ่งประกอบด้วย 95% Ethyl Alcohol ต้มจนเดือดเพื่อให้ละลาย แล้วยกออกจากเตาไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นลงจนอุณหภูมิต่ำกว่า 50°C ปรับ pH ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 7.1-7.3 (ไม่ต้องอบฆ่าเชื้อ) เก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ 2-10°C ใช้ภายใน 96 ชั่วโมง

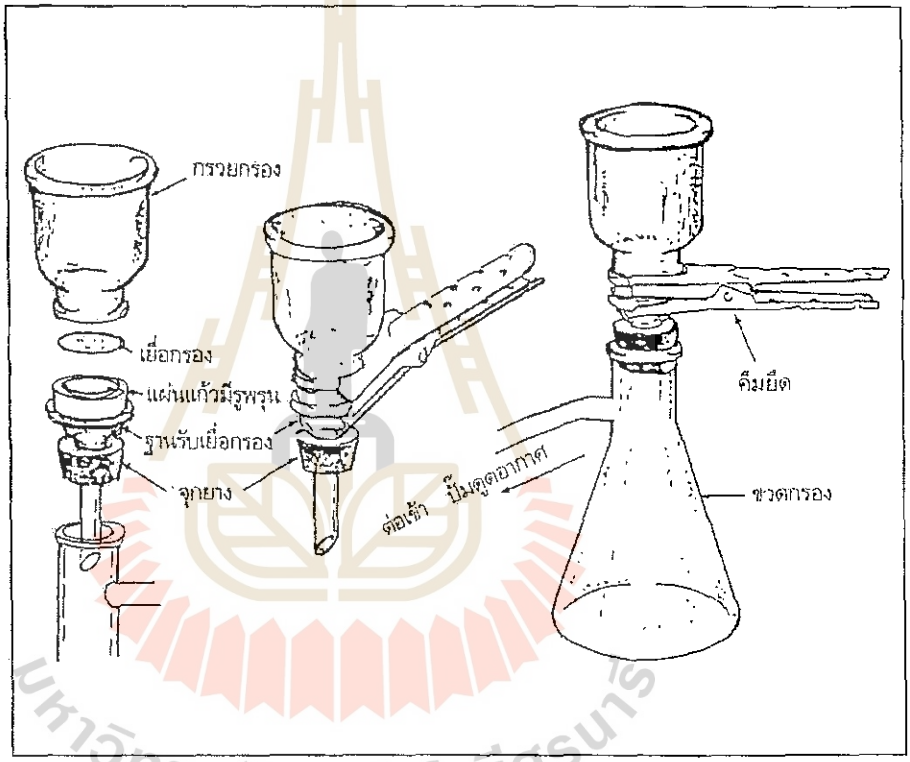
14. M-FC Medium

Tryptose or Biosate	10	กรัม
Proteose Peptone no.3 or Polypeptone	5	กรัม
Yeast Extract	3	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Lactose	12.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Bile Salts no.3 or Bile Salts Mixture	1.5	กรัม
Aniline Blue	0.1	กรัม
1% Rosoic Acid in 0.2 N NaOH	10	มล.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่นตามส่วน ต้มจนเกือบเดือดยกออกจากเตาไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นลงจนอุณหภูมิต่ำกว่า 50°C ปรับ pH ด้วย 0.2 N NaOH ให้ได้ 7.4 (ไม่ต้องอบฆ่าเชื้อ) เก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ 2-10°C ใช้ภายใน 2 สัปดาห์



รูปที่ 6-3 ส่วนประกอบของชุดเครื่องกรอง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเยื่อกรอง ควรตรวจสอบให้แน่ใจว่าวัสดุอุปกรณ์ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน

2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ M-Endo Medium เพื่อตรวจสอบปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และM-FC Medium เพื่อตรวจสอบปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

3. เตรียมตัวอย่างน้ำที่เหมาะสมตามที่แนะนำในตารางที่ 2

ตารางที่ 6-1 การคาดคะเนปริมาณตัวอย่างน้ำประเภทต่าง ๆ ที่ควรใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเยื่อกรอง

ประเภทของแหล่งน้ำ	ปริมาตรที่กรอง (มิลลิลิตร)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
น้ำดื่ม	x							
น้ำในสระว่ายน้ำ	x							
น้ำจากบ่อน้ำ	x	x	x					
น้ำจากทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ	x	x	x					
น้ำดิบเพื่อการประปา			x	x	x			
น้ำจากชายหาด			x	x	x			
น้ำจากแม่น้ำ ลำคลอง				x	x	x	x	
น้ำทิ้งผ่านคลอรีน				x	x	x		
น้ำทิ้ง				x	x	x	x	

4. ใช้ปากคีบที่สะอาดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์จนแอลกอฮอล์ระเหยหมด รอให้เย็นแล้วคีบแผ่นซับวางลงในจานเพาะเชื้อ ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ M-Endo Medium 2 มล. แล้วปล่อยให้ซึมทั่วแผ่นซับ และทำเช่นเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ M-FC Medium พร้อมเขียนฉลากให้ชัดเจน

5. ต่อชุดกรองให้เป็นดังรูปที่ 6-3

6. ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ คีบเยื่อกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว วางทาบลงบนฐานรับเยื่อกรอง โดยหันด้านที่มีขีดตารางอยู่ด้านบน (บางรุ่นอาจไม่มีขีดตาราง)

7. วางกรวยกรองทับลงบนเยื่อกรองแล้วยึดทั้งสองส่วนให้ติดกันแน่นด้วยตัวจับ (clamp)

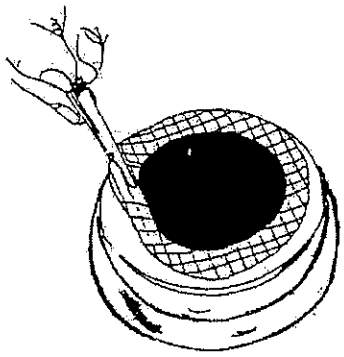
8. เทตัวอย่างน้ำที่ได้เตรียมไว้แล้วลงในกรวยกรองแล้วให้ไหลผ่านเยื่อกรองออกมาได้โดยการดูดอากาศออกจากขวดกรอง ของเหลวที่กรองได้จะถูกรวบรวมไว้ที่ขวดกรอง

9. ล้างกรวยกรองที่วางทับบนแผ่นเยื่อกรองด้วยน้ำทำเจือจางตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ 20-30 มล. 3 ครั้ง

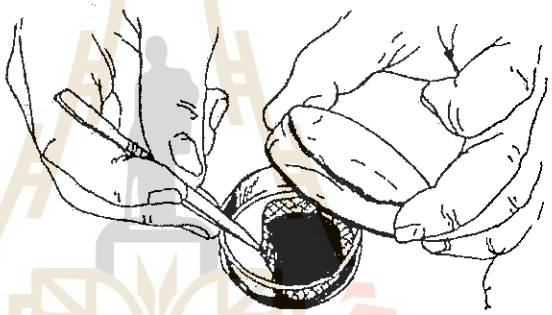
10. ปลด Clamp และกรวยกรองออกจากฐานรับเยื่อกรอง

11. ลอกเยื่อกรองออกจากฐานรับเยื่อกรองด้วยปากคีบที่ปราศจากเชื้อ แล้ววางทับลงบนแผ่นซับอาหารที่เตรียมด้วยวิธีการที่ทำให้ปราศจากฟองอากาศระหว่างแผ่นทั้งสอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6-4 การลอกเอาแผ่นกรองออกจากฐานรับเยื่อกรอง



รูปที่ 6-5 การทาบแผ่นกรองลงบนแผ่นดูดซับอาหารในจานเพาะเชื้อ

12. ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วคว่ำลงให้ฝาจานอยู่ด้านล่าง นำจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ M-Endo Medium ไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}C$ นาน 24 ชั่วโมง ส่วนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ M-FC Medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $44.5 \pm 0.2^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การนับจำนวนโคโลนี และ การรายงานผล

เมื่อบ่มเชื้อครบตามเวลาที่กำหนด ให้นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนแผ่นเยื่อกรอง โดยสังเกตลักษณะเฉพาะของโคโลนีแต่ละกลุ่ม

การนับจำนวนโคโลนีแต่ละประเภทขึ้นกับประเภทของแหล่งน้ำ โดยมีหลักการดังนี้

1. **น้ำบริโภค** ให้นับจำนวนโคโลนีบนแผ่นเยื่อกรอง แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างน้ำ 100 ml โดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนโคโลนี/100 ml} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x 100}}{\text{ปริมาณตัวอย่างน้ำที่ใช้}}$$

- ถ้าโคโลนีที่นับได้มากกว่า 200 โคโลนีต่อแผ่นให้รายงานว่า 'Too Numerous To Count' (TNTC)

2. **ประเภทแห่งน้ำอื่น ๆ** สามารถรวมผลจากการแยกกรองด้วยปริมาตรที่ต่างกัน แต่ปริมาณเดียวกัน เป็นผลรวมของโคโลนีต่อ 100 ml เช่น แยกกรองตัวอย่างน้ำ 2 ครั้ง ๆ ละ 50 ml ได้จำนวน โคโลนีบนแผ่นเยื่อกรอง เป็น 5 และ 3 โคโลนี ให้รายงานว่า

$$\text{จำนวนโคโลนี/100 ml} = \frac{[(5+3) \times 100]}{(50+50)}$$

$$= 8 \text{ โคโลนี/ 100 ml}$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

1) กรรณิการ์ สิริสิงห์. (2549) **เคมีของน้ำ น้ำโสโครก และการวิเคราะห์**. พิมพ์ครั้งที่ 4 คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

2) กรมอนามัย. (2539) **คู่มือการตรวจวิเคราะห์คุณภาพสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ** กระทรวงสาธารณสุข.

3) ธงชัย พรรณสวัสดิ์ และวิบูลลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์. (2547) **คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย** พิมพ์ครั้งที่ 4สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมไทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

4) มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และมั่นรักษ์ ตัณฑุลเวศม์ (2547) **เคมีวิทยาของน้ำและน้ำเสีย** พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5) มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. (2540) **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ** ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6) American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environment Federation (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington D.C., American Public Health Association.

7) Mamta Tomar (1999) Quality Assessment of WATER and WASTEWATER. 1st ed. USA, Lewis Publishers.

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กฎระเบียบพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

ในการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการควรเคร่งครัดในเรื่องดังต่อไปนี้

1. ความสะอาดเรียบร้อย
2. สารหก ทำความสะอาดทันที
3. มีฉลากที่ชัดเจนติดภาชนะใส่สารเคมี
4. เก็บสารที่เดิม
5. ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการทุกวัน
6. ห้ามใช้ Hood เก็บของ
7. ทิ้งสารเคมีที่เหลือหรือไม่ใช้แล้วในถัง Waste
8. ห้ามทานขนมในห้องปฏิบัติการ
9. No Smoking
10. ไม่วิ่งอึกทึก
11. สวมเสื้อกาวน์คลุม
12. ไม่สวมรองเท้าเปิดด้านบนหลังเท้า
13. ไม่วางสัมภาระระหว่างทางเดิน
14. สาว/ หนุ่มผมยาวต้องรวบผม
15. ล้างมือให้สะอาดก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ
16. มีระบบระบายอากาศที่ดี
17. จุดติดตั้งอุปกรณ์ความปลอดภัย
18. ภาชนะใส่สารเคมีเหมาะสม
19. ถังแก๊สมีที่ยึดจับ มีฝาครอบวาล์วและ regulator
20. มีถังแก๊สสำรอง
21. มีบันไดแข็งแรง
22. การถอดปลั๊ก
23. เครื่องมือที่เปิดค้างคืนต้องปลอดภัย
24. ของ/ สารอันตรายต้องมีฉลากติดไว้ชัดเจน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี