

การหาปริมาณออกซิเจนละลายโดยการวัดสีด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

Determination of dissolved oxygen by measuring the color with spectrophotometer

บุญสิทธิ์ วัฒนไทย
สุสติ มุหะหมัด
พลอยภัค หวังสถิตทองใบ
ภัทรา ทิพย์เดช

หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประเภทการพัฒนาคน พัฒนางาน
ปีงบประมาณ 2559

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้คิดขึ้นเพื่อการพัฒนาเทคนิคด้านวิเคราะห์/ทดสอบของหน่วยเครื่องมือกลาง และต้องขอขอบคุณ โครงการสนับสนุนทุนพัฒนาคน พัฒนางานจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ วท. 59001 นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณนักศึกษาสหกิจศึกษา จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต สุราษฎร์ธานี ที่ได้ร่วมทดลองและร่วมทำงานวิจัยนี้สำเร็จเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ หากมีสิ่งผิดพลาดประการใด ผู้เขียนใคร่ขออภัยเป็นอย่างสูงด้วย และหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้คงมีประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนท่านผู้สนใจ

คณะผู้จัดทำ

23 กันยายน 2559

บทคัดย่อ

การศึกษากการหาปริมาณออกซิเจนละลายด้วยการวัดค่าสีโดยใช้เทคนิค สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีของสารละลายไตรไอโอดีดกับปริมาณออกซิเจนละลาย โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Azide Modification Method และศึกษาผลของเวลาที่มีต่อค่าสี เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำทิ้ง ผลการศึกษาพบว่า ความสัมพันธ์ของค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลายเป็นเส้นตรงในช่วงปริมาณออกซิเจนละลาย 0.75-7.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9991 และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำทิ้งจำนวน 41 ตัวอย่าง พบว่า ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับการศึกษาคผลของเวลาต่อค่าสีพบว่า ที่เวลา 0 - 20 นาที จะให้ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เช่นเดียวกัน

ABSTRACT

This study aims to investigate the analysis of dissolved oxygen using spectrophotometer. Color intensity was measured at 340-nm wavelength correlated to the reaction between tri-iodide solution and dissolved oxygen at different concentrations. The results were compared to a standard method (Azide modification method). Furthermore we also investigate the effect of reaction time on the color intensity in both sample blank and wastewater samples. The results showed that the relationship between color intensity and the dissolved oxygen concentration was linear in the dissolved oxygen range of 0.75-7.75 mg/l ($R^2 = 0.9991$). For 41 wastewater samples testing, it was found that there was no time effect on color intensity during the time period of 0-20 min. Statistically, no significant difference was detected at 95 % confidence level.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 ตรวจสอบเอกสาร	2
1.3 วัตถุประสงค์	9
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	9
บทที่ 2 วิธีดำเนินการ	10
2.1 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ	10
2.2 ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี	11
2.3 วิธีการดำเนินการ	12
บทที่ 3 ผลการทดลอง	14
3.1 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร	14
3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีของสารละลายกับปริมาณออกซิเจนละลาย	15
3.3 ผลของเวลาที่มีต่อค่าสี	18
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก ก หลักการทำงานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectroquant NOVA 60	24

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1.1 ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำบริสุทธิ์และน้ำที่มีเกลือคลอไรด์ ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0-50 °C และความดันอากาศ 1 บรรยากาศ	3
ตารางที่ 3.1 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร	14
ตารางที่ 3.2 ผลในการตรวจวัดค่าสี (Hazen unit) กับปริมาณออกซิเจนละลาย	15
ตารางที่ 3.3 การเทียบค่า DO ₅ ระหว่างวิธีการวัดสีและวิธีการไตเตรท	16
ตารางที่ 3.4 ผลของเวลาต่อค่าสี	18
ตารางที่ 3.5 ค่าข้อมูลจากวิธี ANOVA ในช่วง 0-20 นาที	19
ตารางที่ 3.6 ค่าข้อมูลจากวิธี ANOVA ในช่วง 30-120 นาที	19

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีและปริมาณออกซิเจนละลาย	15
รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าสี	20
รูปที่ (ก-1) หลักการทำงานของเครื่อง single beam spectrophotometer	25
รูปที่ (ก-2) หลักการทำงานของเครื่อง double beam spectrophotometer	26
รูปที่ (ก-3) หลักการทำงานของเครื่อง spectrophotometer แบบ diode array detector	27

บทที่ 1

บทนำ

1.5 ที่มาและความสำคัญ

ก๊าซออกซิเจนเป็นก๊าซจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งบนบกและในน้ำ ซึ่งใช้ในกระบวนการต่างๆ เพื่อความอยู่รอดในการดำรงชีวิต ในบรรยากาศนั้นจะมีออกซิเจนอยู่ประมาณ 21 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ก๊าซออกซิเจนเป็นก๊าซที่ละลายน้ำได้น้อยและไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ ความสามารถในการละลายน้ำจึงขึ้นกับความดันและอุณหภูมิ ถึงแม้ว่าออกซิเจนในอากาศจะมีมากถึง 21% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 210,000 ppm แต่ออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำได้เพียงประมาณ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 8 ppm เท่านั้น (มันสิน, 2543) ก๊าซออกซิเจนสามารถแพร่จากบรรยากาศลงสู่แหล่งน้ำจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ในแหล่งน้ำ การสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช แต่บางกระบวนการเช่นการหายใจของสิ่งมีชีวิต กระบวนการย่อยสารอินทรีย์ที่เกิดจากจุลินทรีย์ รวมถึงการทำปฏิกิริยากับสารอนินทรีย์ต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำทำให้แหล่งน้ำสูญเสียออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen, DO) คือปริมาณออกซิเจนอิสระที่ไม่ผสมในน้ำหรือของเหลวอื่น เป็นดัชนีสำคัญที่ใช้บ่งบอกคุณภาพของน้ำ เนื่องจากมีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ (มันสิน, 2543) โดยน้ำในธรรมชาติทั่วไปปกติจะมีค่า DO ประมาณ 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นมาตรฐานน้ำที่มีคุณภาพดี และน้ำเสียจะมีค่า DO ต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (สถาบันวิศวกรรมเครื่องกล, 2525) ดังนั้นในการวัดคุณภาพของน้ำจึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณออกซิเจนละลายโดยวิธีการหาปริมาณออกซิเจนละลายน้ำนั้นมีด้วยกัน 2 วิธี คือ การวิเคราะห์ทางเคมี (การไตเตรต) เป็นวิธีที่แม่นยำและเชื่อถือได้ที่สุดในการวิเคราะห์ DO โดยวิธีการไตเตรตคือ Iodometric method และวิธี Azide modification โดยน้ำเสียส่วนใหญ่จะใช้วิธี Azide modification ซึ่งวิธีนี้มีการเพิ่มโซเดียมไฮไดรด์ เข้าไปในวิธี Iodometric method เพื่อลดการรบกวนของสารไนไตรท์ ที่ปนเปื้อนในน้ำเสีย (มันสิน, 2543) ส่วนอีกวิธีคือการใช้เครื่องมือวัดออกซิเจนโดยตรง

เนื่องจากหน่วยเครื่องมือกลางได้รับตัวอย่างเป็นจำนวนมากทำให้วิเคราะห์ DO และปริมาณออกซิเจนที่จุลชีพใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biochemical Oxygen Demand, BOD) ดังนั้นหน่วยฯ จึงหาวิธีในการลดระยะเวลาในการหาค่า DO เพื่อความสะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลา และให้ค่าที่แม่นยำไม่ต่างจากวิธีมาตรฐาน ซึ่งเดิมหน่วยฯ ได้ใช้วิธีการไตเตรต (Azide modification) เป็นการทำให้ออกซิเจนทำปฏิกิริยากับอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างให้เกิด Mn^{4+} ซึ่งสามารถออกซิไดซ์อออนไอโอไดด์ (I^-) ให้กลายเป็นไอโอดีน (I_2) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ปริมาณไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะสมมูลกับปริมาณ DO ที่มีอยู่ในน้ำ แล้ววัดปริมาณไอโอดีนด้วยการไตเตรตกับโซเดียมไทโอซัลเฟต (มันสิน, 2002) แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาในการไตเตรต จึงไม่เหมาะสมในกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างในปริมาณมาก จึงได้หาวิธีใหม่เพื่อใช้แทนวิธีเดิม เนื่องจากวิธีการไตเตรตดังกล่าว เป็นการเติมสารเคมีเพื่อทำให้เกิดสีซึ่งเป็นสีของไอโอดีน

โดยค่าสีสามารถตรวจวัดได้จากการดูดกลืนแสงของสารในช่วงความยาวคลื่นที่มองเห็นได้ (UV-VIS) โดยสีที่เกิดขึ้นมีที่มาจาก 2 แหล่งคือ สีที่เกิดจาก I_2 ซึ่งใช้ในการไตเตรทสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดในช่วง 456 นาโนเมตร (ไพทอร์ย์, 2532) และสีที่เกิดจาก I_3^- ซึ่งเกิดจากการรวมกันของไอโอดีนกับไอโอดีนที่ขี้เกลือในปฏิกิริยาสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 315-351 นาโนเมตร จากการสังเกตสีของตัวอย่างก่อนไตเตรทหาปริมาณสารละลายไอโอดีน เพื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจนละลายพบว่า สีที่เกิดขึ้นในน้ำตัวอย่างมีความเข้มของสีไม่เท่ากัน หลังจากไตเตรทเทียบกับความเข้มของสี พบว่าความเข้มของสีดังกล่าวแปรผันตามปริมาตรการไตเตรท โดยสีเข้มมากจะใช้โซเดียมไฮโอซัลเฟตในการไตเตรทมาก สีอ่อนใช้สารในการไตเตรทน้อย จึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีของตัวอย่างกับปริมาณออกซิเจนละลาย โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อใช้แทนวิธีการไตเตรทแบบเดิม

1.2 การตรวจสอบเอกสาร

1.2.1 นิยามและความหมาย

การหาค่าออกซิเจนละลาย (Dissolved Oxygen : DO) คือ การหาปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำ เป็นลักษณะสำคัญที่จะบอกให้ทราบว่าน้ำนั้นมีความเหมาะสมเพียงใดต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และแนวการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำว่าเป็น แบบใช้ออกซิเจนอิสระ (aerobic) หรือไม่ใช้ออกซิเจนอิสระ (anaerobic) ปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในน้ำมีความสัมพันธ์กับ อุณหภูมิของน้ำ ความดันบรรยากาศ และสิ่งเจือปนในน้ำ (impurities)

ความสำคัญของค่า DO

1. ค่า DO ในลำน้ำธรรมชาติ จะเป็นตัวชี้บ่งถึงความสามารถของน้ำที่จะรับการถ่ายเทของเสียหรือการฟอกตัวเองให้บริสุทธิ์ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังแสดงถึงความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาและสัตว์อื่นๆ (เช่น ไม่ควรน้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร)
2. ช่วยในการควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยาในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้อากาศ เพื่อให้แน่ใจว่ายังคงรักษาภาวะที่ใช้ออกซิเจนไว้ได้ และป้องกันการให้อากาศมากเกินไป
3. ใช้สำหรับหาค่า BOD
4. ใช้ในการควบคุมการกัดกร่อนของเหล็กในท่อประปา และหม้อต้มน้ำ เพราะพบว่าออกซิเจนในน้ำทำให้เกิดการกัดกร่อน (corrosion) ดังนั้นจึงไม่ควร มี DO เลยในหม้อต้มน้ำ (แต่ถ้าความดันต่ำกว่า 250 psi มี DO ได้ 0.015 ppm)

อุณหภูมิมีผลต่อการละลายของก๊าซทั้งสอง โดยที่ก๊าซสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ น้ำเย็นจึงมีออกซิเจนละลายได้มากกว่าน้ำร้อน ออกซิเจนละลายในน้ำจืด ณ บรรยากาศปกติได้ 14.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 0°C และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 35°C ออกซิเจนละลายในน้ำเค็มได้น้อยกว่าในน้ำจืด ด้วยเหตุนี้ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะมีปริมาณต่ำลงเมื่อน้ำในแม่น้ำไหลไปถึงปากอ่าวซึ่งเป็นน้ำกร่อย ตารางที่ 1.1 แสดงความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำบริสุทธิ์และน้ำที่

มีเกลือคลอไรด์ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0-50 °C และ ความดันอากาศ 1 บรรยากาศ คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นทำให้ออกซิเจนละลายน้ำลดความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนจะลดลงประมาณ 5% ต่อทุกๆ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นออกซิเจนละลายในน้ำเค็มจึงมีค่าต่ำกว่าในน้ำจืดได้ถึง 20% ในธรรมชาติออกซิเจนสามารถละลายน้ำได้ประมาณ 8-9 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20-25 °C

ตารางที่ 1.1 ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในน้ำบริสุทธิ์และน้ำที่มีเกลือคลอไรด์ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0-50 °C และความดันอากาศ 1 บรรยากาศ

Temperature (°C)	oxygen solubility (mg/L)					
	chlorinity:0	5	10	15	20	25
0.0	14.621	13.728	12.888	12.097	11.355	10.657
1.0	14.216	13.356	12.545	11.783	11.066	10.392
2.0	13.829	13.000	12.218	11.483	10.790	10.139
3.0	13.460	12.660	11.906	11.195	10.526	9.897
4.0	13.107	12.335	11.607	10.920	10.273	9.664
5.0	12.770	12.024	11.320	10.656	10.031	9.441
6.0	12.447	11.727	11.046	10.404	9.799	9.228
7.0	12.139	11.442	10.783	10.162	9.576	9.023
8.0	11.843	11.169	10.531	9.930	9.362	8.826
9.0	11.559	10.907	10.290	9.707	9.156	8.636
10.0	11.288	10.656	10.058	9.493	8.959	8.454
11.0	11.027	10.415	9.835	9.287	8.769	8.279
12.0	10.777	10.183	9.621	9.082	8.586	8.111
13.0	10.537	9.961	9.416	8.899	8.411	7.949
14.0	10.306	9.747	9.216	8.716	8.242	7.792
15.0	10.084	9.541	9.027	8.540	8.079	7.642
16.0	9.870	9.344	8.844	8.370	7.922	7.496
17.0	9.665	9.153	8.667	8.207	7.770	7.356
18.0	9.467	8.959	8.427	8.049	7.624	7.221
19.0	9.276	8.792	8.333	7.896	7.483	7.090
20.0	9.092	8.621	8.174	7.749	7.346	6.964
21.0	8.915	8.456	8.021	7.607	7.216	6.842
22.0	8.743	8.297	7.873	7.470	7.087	6.723
23.0	8.578	8.143	7.730	7.337	6.963	6.609

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Temperrature (°C)	oxygen solubility (mg/L)					
	chlorinity:0	5	10	15	20	25
24.0	8.418	7.994	7.591	7.208	6.844	6.499
25.0	8.263	7.850	7.457	7.083	6.728	6.390
26.0	8.113	7.711	7.327	6.962	6.615	6.285
27.0	7.968	7.575	7.201	6.845	6.506	6.184
28.0	7.827	7.444	7.079	6.731	6.400	6.085
29.0	7.691	7.317	6.961	6.621	6.297	5.990
30.0	7.559	7.194	6.845	6.513	6.197	5.896
31.0	7.430	7.073	6.733	6.409	6.100	5.808
32.0	7.305	6.957	6.624	6.307	6.005	5.717
33.0	7.183	6.843	6.518	6.206	5.912	5.631
34.0	7.065	6.732	6.415	6.111	5.822	5.546
35.0	6.950	6.624	6.314	6.017	5.734	5.464
36.0	6.837	6.519	6.215	5.925	5.648	5.384
37.0	6.727	6.416	6.119	5.835	5.564	5.305
38.0	6.620	6.316	6.025	5.747	5.481	5.228
39.0	6.515	6.217	5.932	5.660	5.400	5.152
40.0	6.412	6.121	5.842	5.576	5.321	5.078
41.0	6.312	6.026	5.753	5.493	5.243	5.005
42.0	6.213	5.934	5.667	5.411	5.167	4.933
43.0	6.116	5.843	5.591	5.331	5.091	4.862
44.0	6.021	5.753	5.497	5.252	5.017	4.793
45.0	5.927	5.665	5.414	5.174	4.944	4.724
46.0	5.835	5.578	5.333	5.097	4.872	4.656
47.0	5.744	5.493	5.252	5.021	4.801	4.589
48.0	5.654	5.408	5.172	4.947	4.730	4.523
49.0	5.565	5.324	5.094	4.872	4.660	4.457
50.0	5.477	5.242	5.016	4.799	4.591	4.392

แหล่งที่มา : (<http://www2.diw.go.th/research/เอกสารเผยแพร่/A13-DO-BOD-w.pdf>. ไพฑูรย์

หมายนันสมสุข. กรมโรงงานอุตสาหกรรม. สืบค้น: 30 มีนาคม 2558)

1.2.2 วิธีวิเคราะห์ห่ออกซิเจนละลาย

วิธีวิเคราะห์ห่ออกซิเจนละลายมี 3 วิธี ได้แก่

1. วิธีไอโอดิเมตริก (Iodometric method) หรือวิธีวินเคลอ (Winkler method)
2. วิธีไอไซด์แบบปรับปรุง (Azide modification) หรือวิธีวินเคลอแบบปรับปรุง
3. วิธีเมมเบรนอิเล็กโทรด

วิธีมาตรฐานที่ใช้วัด DO ในน้ำคือ วิธีไอโอดิเมตริก หรือวิธีวินเคลอ ซึ่งมีหลักการคือ ให้ออกซิเจนละลายทำปฏิกิริยากับอ็อกซิดอนแมงกานีส (Mn^{2+}) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างให้เกิด Mn^{4+} ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ไอโอดีนไอโอไดด์ (I^-) ให้กลายเป็นไอโอดีน (I_2) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ปริมาณไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะสมมูลกับปริมาณ DO ที่อยู่ในน้ำ การวัดปริมาณไอโอดีน กระทำได้ง่ายโดยไทเทรตกับโซเดียมไธโอซัลเฟต

วิธีวินเคลอแบบเดิมมีสิ่งรบกวนหลายอย่าง จึงมีการปรับปรุงให้ดีขึ้นและเรียกว่าวิธีวินเคลอแบบปรับปรุงหรือวิธีไอไซด์แบบปรับปรุง วิธีไอไซด์แบบปรับปรุงเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณออกซิเจนละลายได้ดีในน้ำเกือบทุกชนิด วิธีนี้เหมาะสมที่จะวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและไม่เหมาะที่จะใช้ในภาคสนามหรือใช้วัดออกซิเจนในแม่น้ำและในระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งต้องวัดออกซิเจนละลายอย่างต่อเนื่อง สำหรับวิธีเมมเบรนอิเล็กโทรด (ใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำแบบเมมเบรน) สามารถลดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งรบกวนต่างๆที่มีอยู่ในน้ำที่มีตะกอนแขวนลอย น้ำที่มีสีมาก และน้ำทิ้งของระบบน้ำเสีย วิธีนี้ยังนิยมที่จะนำไปใช้ในภาคสนามอีกด้วย

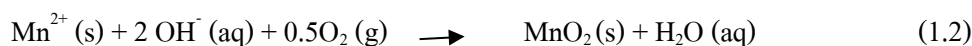
1.2.2.1 วิธีวินเคลอแบบเดิม

วิธีวินเคลอแบบเดิมมีสิ่งรบกวนการวิเคราะห์หลายอย่าง ออกซิไดซิงเอเจนต์บางอย่าง เช่น ไนโตร (NO_2^-) และเหล็กเฟริก (Fe^{3+}) สามารถทำปฏิกิริยากับ I^- เช่นเดียวกับ O_2 จึงทำให้วัดได้ค่า DO สูงกว่าความเป็นจริง ส่วนรีดิวซิงเอเจนต์ เช่น Fe^{2+} , SO_3^{2-} , S^{2-} และโพลิไทโอเนต สามารถรีดิวซ์ I_2 ให้เป็น I^- จึงทำให้วัดได้ DO ที่ต่ำกว่าสภาพจริง ด้วยเหตุนี้วิธีวินเคลอแบบเดิมจึงเหมาะสมสำหรับน้ำสะอาดเท่านั้น

การวิเคราะห์หา DO ทำในขวด DO ซึ่งมีจุกแก้วปิดได้สนิท ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเริ่มจากปฏิกิริยาระหว่าง Mn^{2+} และ OH^- เกิดผลึกสีขาวของ $Mn(OH)_2$ ดังนี้



ถ้าตัวอย่างน้ำไม่มี DO สารละลาย $MnSO_4$ และสารละลายอัลคาไล-ไอโอดีน (Alkali-Iodide หรือ $NaOH + KI$) ที่เติมให้กับตัวอย่างน้ำจะเกิดตะกอนผลึกสีขาวดังกล่าว แต่ถ้ามี DO ออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับบางส่วนของ Mn^{2+} เกิดผลึกสีน้ำตาล



การเปลี่ยน Mn^{2+} ให้เป็น Mn^{4+} เรียกว่า การตรึงออกซิเจน (Fixation of Oxygen) ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นช้าโดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ การกวนหรือเขย่าตัวอย่าง (ในขวด DO) เพื่อให้ออกซิเจนในน้ำทำปฏิกิริยากับ Mn^{2+} อย่างช้าถึงเป็นเวลายาวนานน้อย 20 วินาที เป็นเรื่องจำเป็นเพื่อเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา ถ้าตัวอย่างน้ำเป็นน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย ต้องกวนหรือเขย่าให้นานมากขึ้น

หลังจากเขย่าขวดเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ฟล็อกสีน้ำตาลตกตะกอนไม่น้อยกว่า 5-10 นาที เพื่อให้ได้ชั้นน้ำใสตอนบนประมาณ 5 เซนติเมตร หรือมากกว่า เติมกรดกำมะถันเพื่อให้เกิด I_2 ดังนี้



เมื่อเติมกรดเสร็จแล้วต้องรีบปิดจุกขวด DO และพลิกขวดกลับไปมาหลายๆครั้ง จนกระทั่งฟล็อกละลายหมด ได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง

นำสารละลายที่เตรียมได้ 200 มิลลิลิตร นำมาไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไซโอซัลเฟตเข้มข้น N/40 โดย Standard Method แนะนำให้ใช้ขนาดตัวอย่าง 203 มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาตรที่ต้องการใช้ 3 มิลลิลิตร เพื่อชดเชยให้กับปริมาตรของสารละลาย MnSO_4 2 มิลลิลิตร และสารละลายอัลคาไล-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 มิลลิลิตร ที่เติมในตัวอย่างน้ำ 300 มิลลิลิตร เนื่องจากตัวอย่างน้ำถูกแทนที่ทิ้งไปมีปริมาตร 4 มิลลิลิตร ต่อปริมาตร 300 มิลลิลิตร ดังนั้น ถ้าต้องการใช้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จึงต้องใช้เกิน 3 มิลลิลิตร (ได้จากการคำนวณ $200 \times 4 / 300 = 2.7 \sim 3$ มิลลิลิตร) ซึ่งจริงๆแล้วมีการเติมกรดกำมะถันอีก 2 มิลลิลิตร แต่ไม่ได้นำมาคำนวณเนื่องจากสารละลายกรดใช้ละลายโดยไม่แทนที่สารละลายในขวด DO ปริมาตรของไทเทรนต์ที่ใช้ 1 มิลลิลิตร จะสมมูลกับความเข้มข้น DO 1 มิลลิกรัมต่อลิตรพอดี

การเลือกสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ DO

วิธีวิเคราะห์ DO อาศัยหลักการวัดไอโอดีนที่ถูกปล่อยจากปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่างออกซิเจนและสารเคมีที่เติม ปริมาณไอโอดีนจะสมมูลกับปริมาณ DO ในตัวอย่างน้ำ สารเคมีที่เติมให้ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนสารรีดิวซิงมาตรฐาน ซึ่งนิยมใช้โซเดียมไซโอซัลเฟตโดยมีน้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์บอกจุดยุติ สีของการไทเทรตจะเริ่มดำนจากสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนน้ำแบ่ง-ไอโอดีน ระหว่างการไทเทรต ไอโอดีนจะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จนกระทั่งไม่มีไอโอดีนเหลืออีกเลย ทำให้สีน้ำเงินหายไปกลายเป็นไม่มีสี

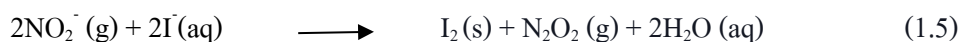
เนื่องจากน้ำหนักสมมูลของออกซิเจนเท่ากับ 8 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไซโอซัลเฟตจึงควรเท่ากับ N/8 เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นของ DO จากสารละลายมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตเป็นไปดังนี้

$$\text{สารละลายมาตรฐาน } 1.0 \text{ มิลลิกรัม} = \text{DO } 1.0 \text{ มิลลิกรัม}$$

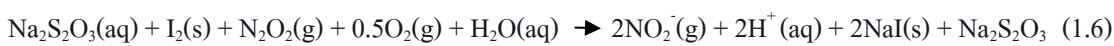
อนึ่ง เนื่องจาก DO ของตัวอย่างน้ำมักมีค่าไม่เกิน 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ DO ในตัวอย่างน้ำจึงไม่เกิน $8 \times 1000 / 200 = 1.6$ มิลลิกรัม ถ้าใช้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น N/8 ปริมาณไทเทรนต์จะได้ไม่เกิน 1.6 มิลลิลิตร เท่านั้นซึ่งนับว่าน้อยเกินไป ในทางปฏิบัติ จึงนิยมใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่ำเพียง N/40 และใช้ขนาดตัวอย่างไม่เกิน 200 มิลลิลิตร มีผลทำให้ทุกๆ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐานมีค่าสมมูลกับ DO 0.2 มิลลิกรัม

1.2.2.2 วิธีเอไซด์แบบปรับปรุง

เมื่อวิเคราะห์หา DO ด้วยวิธีวินเคลอที่กล่าวข้างต้น บางครั้งพบว่าจุดยุติไม่นิ่งหรือไม่คงที่ นั่นคือ เมื่อไทเทรตด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟตจนสีน้ำเงินหายไปชั่วคราวสีน้ำเงินจะกลับมาให้ ผู้วิเคราะห์ไม่สามารถไทเทรตได้ถึงจุดยุติได้เลย สาเหตุเกิดจากตัวอย่างน้ำมีไนไตรต์ (NO_2^-) ซึ่งทำปฏิกิริยากับ I^- ภายใต้สภาวะเป็นกรดสร้าง N_2O_2 ดังนี้

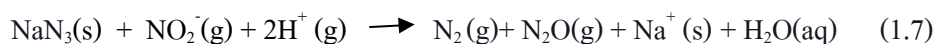
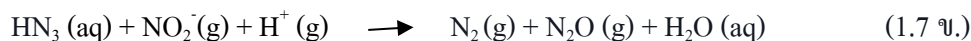


ปฏิกิริยาข้างต้นเกิดขึ้นพร้อมกับปฏิกิริยาที่ (1.4) ซึ่งใช้ละลายฟลักซ์ MnO_2 เมื่อเริ่มไทเทรตด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟต N_2O_2 จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนสร้าง NO_2^-



เนื่องจากตัวอย่างน้ำมี I^- มากเกินไป ไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจึงทำปฏิกิริยากับ I^- อีก และได้ I_2 ทำให้อินดิเคเตอร์เกิดสีน้ำเงินขึ้นมาอีก ปฏิกิริยาจึงเกิดวนเวียนไปมา และไม่สามารถทำให้ถึงจุดยุติซึ่งไม่มีสีอย่างถาวรได้

การรบกวนของไนไตรต์แก้ไขได้ง่ายโดยใช้โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) ซึ่งทำลายไนไตรต์ได้สภาวะที่เป็นกรดให้กลายเป็น N_2 และ NO_2^- ดังนี้



วิธีวินเคลอที่ใช้ NaN_3 เรียกว่า วิธีปรับปรุงแบบเอไซด์ (Azide modification of Winkler method) โซเดียมเอไซด์จะถูกเติมผสมกับสารละลายอัลคาลิ-ไอโอไดด์ เรียกสารละลายใหม่ว่า AIA หรือสารละลายอัลคาลิ-ไอโอไดด์-เอไซด์

1.2.3 BOD (Biochemical Oxygen Demand)

BOD คือ ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสารอินทรีย์ชนิดที่ย่อยสลายได้ (decomposable organic matter) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จากกระบวนการนี้แบคทีเรียจะได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการออกซิไดส์สารอาหารเหล่านี้จะเป็น CO_2 H_2O หรือ NH_3 ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหาร ค่า BOD จะบ่งบอกถึงความสกปรกของน้ำเสียต่างๆ ในเทอมของออกซิเจนที่ต้องการใช้เมื่อปล่อยน้ำเสียนั้นลงสู่แม่น้ำลำคลอง ใช้ในการควบคุมความสกปรกของลำธาร แม่น้ำต่างๆ เพราะจากค่า BOD จะบอกถึงองศาของความสกปรกของแหล่งน้ำนั้นได้ทันที นอกจากนี้ยังใช้ในการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสีย การสืบค้นขั้นตอน และวิธีการวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลายโดยการวัดสีจากสารละลาย ไอโอดีนจากฐานข้อมูล SciVerse ScienceDirect พบว่ามีการศึกษาดังต่อไปนี้

Pai และคณะ (1993) ได้ปรับปรุงวิธีการหาค่าออกซิเจนละลายในน้ำทะเล ให้มีความแม่นยำและถูกต้องยิ่งขึ้น โดยการวัดสีของไอโอดีนอิสระด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 456 นาโนเมตร แทนวิธีการไตเตรตของ Winkler ในการหาค่าออกซิเจนละลายในน้ำทะเล ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จะมีความแม่นยำที่ดีกว่า 0.2% r.s.d. และมีความสะดวกรวดเร็วกว่าวิธีการไตเตรตแบบมาตรฐาน

Labasque และคณะ (2004) หาค่าออกซิเจนละลายด้วยวิธีของ Winkler โดยการวัดไอโอดีนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเขาได้เลือกทฤษฎีและปัจจัยที่จำเป็นของงานที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้มาทำใหม่ จากการศึกษาเขาเลือกใช้ความยาวคลื่นช่วง 466 นาโนเมตร เพราะความยาวคลื่นช่วงนี้เมื่อเทียบกับความยาวคลื่นช่วงอื่นๆ จะได้กราฟมาตรฐาน เป็นเส้นตรงประมาณ 1000 ไมโครโมลาร์ต่อกิโลกรัมของออกซิเจน และจากการศึกษาปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณของสาร เวลา โดยที่อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการดูดกลืนของแสง ดังนั้นควรที่จะเก็บตัวอย่างและสารมาตรฐานที่อุณหภูมิเดียวกัน วิธีการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหาค่าออกซิเจนละลายในตัวอย่างน้ำจืดหรือน้ำทะเลหรือน้ำที่มีออกซิเจนละลายอิมตัวมากๆ และก็เป็นวิธีที่ง่าย เร็ว ในการหาค่าออกซิเจนละลายมากกว่าวิธีการไตเตรต

Helm และคณะ (2012) พัฒนาวิธีการหาความเข้มข้นของออกซิเจนละลายจากการไตเตรตด้วยวิธีของ Winkler ให้มีความแม่นยำสูงขึ้น โดยใช้ gravimetric วัดสารละลายทั้งหมดก่อนที่จะนำมาไตเตรต ซึ่งจะทำให้ผลกระทบของ ไอโอดีนระเหย และการตรวจวัดความแม่นยำของจุดยุติลดน้อยลง

1.3 วัตถุประสงค์

- 1.3.1 เพื่อศึกษาช่วงการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร
- 1.3.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลาย
- 1.3.3 เพื่อศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสี
- 1.3.4 เพื่อศึกษาการวัดค่าสี และนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.4.1 เพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน เนื่องจากแบบไตเตรตเดิม ต้องใช้เวลานาน และต้องใช้สารเคมี และต้องเสียเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างมาก ประกอบกับการบริการรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งของหน่วยซึ่งมีปริมาณมาก ไม่น้อยกว่า 50 ตัวอย่างต่อสัปดาห์ หากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยการวัดสี จะทำให้ประหยัดเวลา ประหยัดทรัพยากร ลดขั้นตอนในการทำงาน สามารถทำงานได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

1.4.2 สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้น มีผู้ใช้บริการเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เงินรายได้จากบริการวิชาการของหน่วยฯ และคณะฯ เพิ่มขึ้นตามไปด้วย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการ

2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

2.1.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ส่งมาวิเคราะห์ค่า BOD₅

2.1.2 สารเคมี

1. แมงกานีสซัลเฟต (MnSO₄)
2. สารละลายอัลคาไล-ไฮโดรเจนไอโอดีน-ไอโซไดรด์-ไฮไดรด์ (NaOH KI Na₂N)
3. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H₂SO₄)
4. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.025 N (Na₂S₂O₃·H₂O)
5. น้ำแข็ง

2.1.3 วัสดุและเครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น SpectroquantNOVA60A
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
3. ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร
4. คิวเวตขนาด 20 มิลลิเมตร
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
7. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. บิวเรต ขนาด 25 มิลลิลิตร
9. ขาตั้งบิวเรต
10. ไมโครปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
11. บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

2.2.1 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต (manganese (II) sulfate solution)

ละลายแมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) หนัก 480 กรัมหรือละลายแมงกานีสซัลเฟตไดไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) หนัก 400 กรัม หรือแมงกานีสซัลเฟตโมนोไฮเดรต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) หนัก 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรองแล้วทำให้เจือจางเป็น 1000 มิลลิลิตร

2.2.2 อัลคาลิ-ไอโอดิด-เอไซด์ รีเอเจนต์ (Alkali-Iodide-Azide Reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หนัก 500 กรัม หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) หนัก 700 กรัม และโซเดียมไอโอดิด (NaI) หนัก 135 กรัม หรือโพแทสเซียมไอโอดิด (KI) หนัก 150 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) หนัก 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น

2.2.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 % (38 โมลาร์) เป็นกรดซัลฟูริกซึ่ง 1 มิลลิลิตรจะสมมูลกับ 3 มิลลิลิตรอัลคาลิ ไอโอดิด-เอไซด์ รีเอเจนต์

2.2.4 น้ำแป้ง

ละลายแป้ง (soluble starch) หนัก 2 กรัม ในน้ำกลั่นที่ร้อน จำนวน 100 มิลลิลิตรและกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) หนัก 0.2 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

2.2.5 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต (Standard Sodium Thiosulfate Solution) เข้มข้น 0.025 โมล/ลิตร

ละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) หนัก 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 โมล/ลิตร จำนวน 1.5 มิลลิลิตร หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 0.4 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1000 มิลลิลิตร

2.3 วิธีดำเนินการ

2.3.1 การศึกษาการดูดกลืนแสงที่ใช้ในการวัดค่าสีที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร

1) เตรียมสารละลายไอโอดีนเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร โดยใช้ไอโอดีน ละลายในเอทานอล นำไปเจือจางด้วยน้ำแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง

2) เตรียมสารละลายไอโอไดด์เข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร โดยใช้ไอโอดีนผสมกับ KI ละลายในน้ำ นำไปเจือจางด้วยอัตราส่วน 1 : 5 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง

3) เตรียมน้ำใส่ขวด BOD เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ 1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 ขวด รีบปิดฝาและพลิกขวดไปมาประมาณ 20 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ฟลอคสีน้ำตาลตกตะกอนไม่น้อยกว่า 5-10 นาที เพื่อให้ได้ชั้นน้ำใสตอนบนประมาณ 2 ใน 3 ของขวดแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดฝาพลิกขวดไปมาประมาณ 20 ครั้ง ให้ละลายหมด ได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง นำไปเจือจางแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง

2.3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีของสารละลายกับปริมาณออกซิเจนละลาย (DO)

2.3.2.1. หาค่าความสัมพันธ์ของค่าสีกับค่า DO

1) นำน้ำ 1000 มิลลิลิตร เติมอากาศด้วยเครื่องเติมอากาศอย่างน้อยประมาณ 30 นาที เพื่อให้มีน้ำมีออกซิเจนเต็มที่ หรืออิมตัว แล้วนำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ออกซิเจนละลายได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง

2) นำน้ำที่เตรียมมาใส่ขวด BOD จำนวน 2 ขวด ปิดฝาขวดเท่านั้นส่วนที่เกินออก

3) เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ 1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 ขวด รีบปิดฝาและพลิกขวดไปมาประมาณ 20 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ ฟลอคสีน้ำตาลตกตะกอนไม่น้อยกว่า 5-10 นาที เพื่อให้ได้ชั้นน้ำใสตอนบนประมาณ 2 ใน 3 ของขวดแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดฝาพลิกขวดไปมาประมาณ 20 ครั้ง ให้ฟลอคละลายหมด ได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง

4) นำตัวอย่างน้ำทั้ง 2 ขวดผสมเข้าด้วยกัน แล้วตวงใส่ขวดรูปชมพู่ 2 ใบ ใบละ 203 มิลลิลิตร โดยติดฉลากขวดที่ 2 ว่า “ตัวเต็ม”

5) นำทั้งสองขวดมาไตเตรทด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 N ขวดละ 1 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารจากขวดที่ไม่มีฉลาก 2 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ที่มีน้ำ DI อยู่ 8 มิลลิลิตรแล้วนำไปวัดสีบนที่กผล ปิดน้ำจากขวดตัวเต็มใส่ในอีกขวด 2 มิลลิลิตร

6) ทำซ้ำข้อ 5) จนกระทั่งถึงจุดยุติ หรือน้ำใส ไม่มีสี

7) ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ

8) นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างค่า DO กับค่าสี

2.2.3.2 การนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

เก็บข้อมูลค่า DO_5 จากน้ำตัวอย่างที่วิเคราะห์ค่า BOD_5 จำนวน 41 ตัวอย่าง ดังวิธีต่อไปนี้

1) นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำที่เดิมออกซิเจนจันอิมตัวในสัดส่วนต่างๆ ขึ้นกับสภาพตัวอย่างแล้วนำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

2) นำตัวอย่างมาเติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร สารละลายอัลคาไล-ไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าไปมาประมาณ 20 ครั้ง เกิดเป็น ฟลอคสีน้ำตาล รอนจนฟลอคตกลงก้นขวดประมาณ 2 ใน 3 ของขวดแล้วเติมกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วพลิกขวดไปมา 20 ครั้ง

3) ปิเปตตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ที่มีน้ำ DI 8 มิลลิลิตรแล้วนำไปวัดสีนำไปเทียบกราฟมาตรฐาน

4) นำตัวอย่างที่เหลือ 203 มิลลิลิตรไปไตเตรตด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟต เพื่อหาค่า DO_5 แล้วนำไปเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟ

5) การคำนวณหาค่า ความเที่ยงของวิธีโดยทดสอบข้อมูลด้วย t-test

2.3.3 ทดสอบเวลาที่มีผลต่อสี

นำน้ำ DI และสุ่มตัวอย่างอย่างละ 5 ขวด ใส่สารละลายแมงกานีสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร สารละลายอัลคาไล-ไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาและเขย่าไปมาประมาณ 20 ครั้ง เกิดเป็น ฟลอคสีน้ำตาล รอนจนฟลอคตกลงก้นขวดประมาณ 2 ใน 3 ของขวดแล้วเติมกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วพลิกขวดไปมา 20 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าสีครั้งละ 5 นาทีจนครบ 1 ชั่วโมง บันทึกผล

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร

โดยการเตรียมสารละลายไอโอดีนและไตรไอโอดด์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร แล้วนำตัวอย่างมาตรฐานมาเทียบ ดูการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร ได้ค่าดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร

ชื่อสารละลาย	ค่าการดูดกลืนแสง (340 nm)	ค่าการดูดกลืนแสง (466 nm)
Iodine solution	0.6562	1.4062
Tri-iodide	2.1387	0.1256
Sample standard	2.3921	0.1890

จากตารางที่ 3.1 เมื่อนำสารมาตรฐานมีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 466 นาโนเมตร พบว่า สารมาตรฐานมีช่วงการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ ไตรไอโอดด์ และจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ดีที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรในการวัดค่าสี

3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลาย

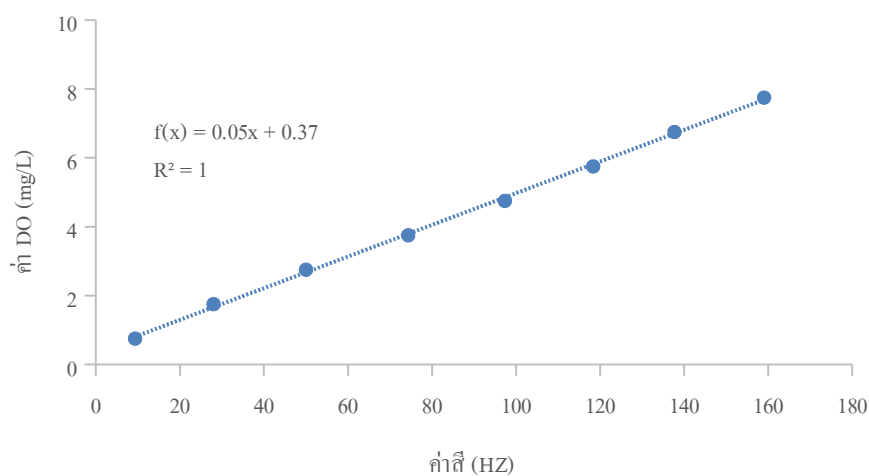
3.2.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงระหว่างค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลาย

เตรียมน้ำที่มีออกซิเจนละลายในช่วง 7.5 -8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมจาก น้ำ DI นำมาเติมอากาศจนอิ่มตัวและวางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาไตเตรตด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟตครั้งละ 1 มิลลิลิตร จนถึงจุดยุติ (ทำ 3 ซ้ำ) ได้ค่าดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ผลในการตรวจวัดค่าสี กับปริมาณออกซิเจนละลาย

DO (mg/L)	ค่าสี			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.75	10	8	10	9.33±1.15
1.75	31	23	30	28.00±4.35
2.75	55	47	53	51.66±4.24
3.75	79	71	73	74.33± 4.16
4.75	100	95	97	97.33 ±2.51
5.75	123	114	115	118.33±4.50
6.75	144	132	137	137.66±6.02
7.75	160	161	156	159.00±2.64

จากข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 3.2 นำไปสร้างกราฟระหว่างค่าสี (แกน x) กับปริมาณออกซิเจนละลาย (แกน y) ผลเป็นดังกราฟที่ 3.1 ให้กราฟที่เป็นเส้นตรง ในช่วงปริมาณออกซิเจนละลาย 0.75-7.75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นเท่ากับ $y = 0.046x + 0.3736$ ด้วยค่า R^2 เท่ากับ 0.9991



รูปที่ 3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีและปริมาณออกซิเจนละลาย

3.2.2 การประยุกต์ใช้จริงกับตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่วางไว้เป็นเวลา 5 วันในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หา DO₅ จำนวน 41 ตัวอย่าง นำไปวัดสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเทียบกับวิธีการไตเตรต ได้ค่าดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การเทียบค่า DO₅ ระหว่างวิธีการวัดสีและวิธีการไตเตรต

ตัวอย่าง	ค่าสี (HZ)	ค่า DO ₅ (mg/L)	
		วิธีวัดสี	วิธีไตเตรต
1	182	8.75	7.00
2	138	6.73	6.84
3	128	6.26	7.05
4	167	8.06	7.50
5	124	6.08	5.60
6	147	7.14	6.60
7	127	6.22	5.35
8	131	6.40	7.35
9	139	6.77	6.30
10	162	7.83	7.90
11	142	6.91	7.60
12	121	5.94	6.10
13	56	2.95	2.60
14	169	8.15	6.90
15	183	8.80	7.35
16	136	6.63	6.00
17	117	5.76	4.50
18	121	5.94	5.15
19	153	7.42	7.55
20	46	2.49	1.64
21	125	6.13	5.30
22	165	7.97	7.25
23	126	6.17	7.05
24	138	6.73	6.70
25	174	8.38	7.25

ตัวอย่าง	ค่าสี (HZ)	ค่า DO ₅ (mg/L)	
		วิธีวัดสี	วิธีไตเตรท
26	126	6.17	6.25
27	153	7.42	6.75
28	91	4.56	3.85
29	91	4.56	3.65
30	88	4.42	3.80
31	89	4.47	3.50
32	152	7.37	7.00
33	129	6.31	6.15
34	149	7.23	6.30
35	121	5.94	6.05
36	140	6.82	7.80
37	158	7.65	7.15
38	104	5.16	4.80
39	129	6.31	5.15
40	116	5.71	5.65
41	103	5.11	5.30
Mean		6.38	5.98
Variance		1.96	2.20
Observations		41	41
Pearson Correlation		0.8952	
Hypothesized Mean Difference		0.0000	
df		40.000	
T Stat		3.7791	
P(T<=t) one-tail		0.0003	
T Critical one-tail		1.6839	
P(T<=t) two-tail		0.0005	
T Critical two-tail		2.0211	

จากการทดสอบ t-test ค่า DO₅ จากทั้งสองวิธี คือ วิธีการไทเทรทเดิมและการหาจากค่าสี ค่า t stat > t critical และค่า P-value < ค่าความเชื่อมั่น ดังนั้น ค่าทางสถิติของทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน ที่นัยสำคัญ 0.05

3.3 ผลของเวลาที่มีต่อค่าสี

เมื่อนำสารละลายจำนวน 5 ตัวอย่าง มาวัดสีที่เวลาแตกต่างกันเริ่มครั้งละ 5 นาทีจนกระทั่งครบ 1 ชั่วโมงทำซ้ำ 5 ครั้ง โดยควบคุมอุณหภูมิ ค่าออกซิเจนละลาย จะได้ค่าดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ผลของเวลาต่อค่าสี

เวลา(นาที)	ค่าสีของสารมาตรฐาน (mg/L)					ค่าเฉลี่ย
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ขวดที่ 3	ขวดที่ 4	ขวดที่ 5	
0	146	142	141	142	141	142.4±2.07
5	146	141	144	141	143	143.0±2.12
10	145	143	141	141	142	142.4±1.67
15	145	142	141	139	143	142.0±2.24
20	145	137	142	146	138	141.6±4.04
30	139	133	133	130	133	133.6±3.29
45	135	134	132	130	126	131.4±3.58
60	139	137	130	127	105	127.6±13.56
75	139	137	133	134	129	134.4±3.85
90	137	137	128	132	135	133.8±3.83
105	135	135	127	133	130	132.0±3.46
120	136	139	139	137	132	136.6±2.88

จากตารางที่ 3.4 นำไปหาค่าความเบี่ยงเบนด้วยวิธี ANOVA พบว่าค่าสีในช่วง 0 – 20 นาที แรกจะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 3.5

จากตารางที่ 3.4 นำไปหาค่าความเบี่ยงเบนด้วยวิธี ANOVA พบว่าค่าสถิติในช่วง 0 – 20 นาทีแรกจะมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ค่าข้อมูลจากวิธี ANOVA ในช่วง 0-20 นาที

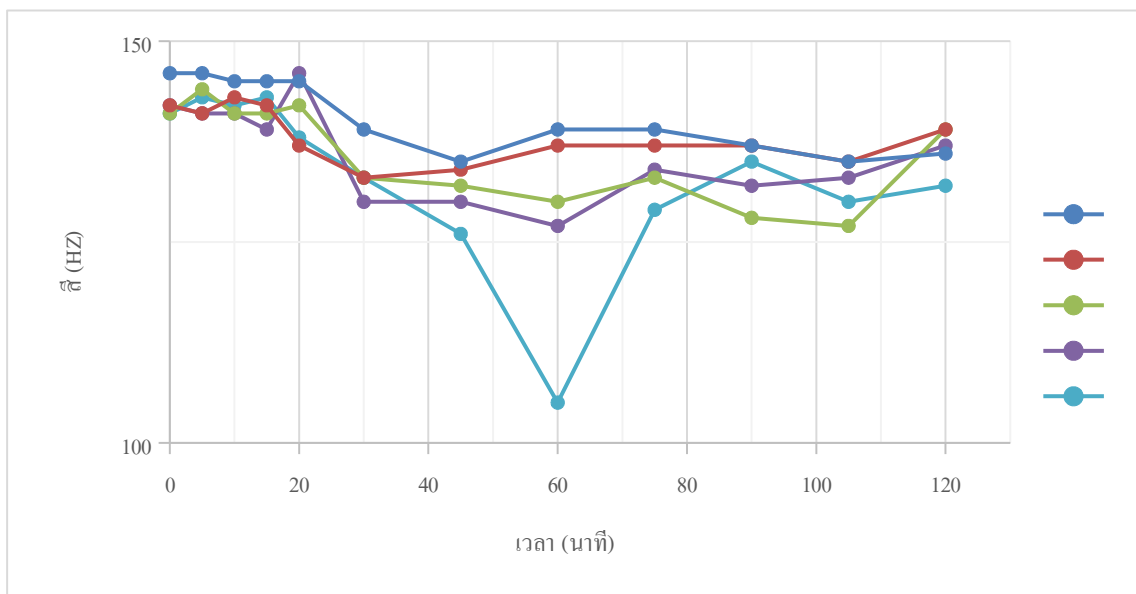
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.440	4	1.360	.207	.932
Within Groups	131.600	20	6.580		
Total	137.040	24			

จากข้อมูลในตารางที่ 3.5 พบว่าค่า p-value ในช่อง sig เท่ากับ 0.932 เมื่อเทียบกับค่าช่วงความเชื่อมั่นที่ 0.05 ค่า p-value มีค่ามากกว่าค่าความเชื่อมั่นแสดงว่า ข้อมูลช่วง 0-20 นาทีแรกมีค่าไม่แตกต่างกันในช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% ส่วนหลังจาก 20 นาทีมีค่าแตกต่างกันดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.6 แสดงค่าข้อมูลจากวิธี ANOVA ในช่วง 30-120 นาที

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1565.333	11	142.303	5.886	.000
Within Groups	1160.400	48	24.175		
Total	2725.733	59			

จากตารางที่ 3.6 พบว่าค่า p-value ในช่อง sig เท่ากับ 0.000 เมื่อเทียบกับค่าช่วงความเชื่อมั่นที่ 0.05 ค่า p-value มีค่าน้อยกว่าค่าช่วงความเชื่อมั่นแสดงว่า ข้อมูลที่เวลาตั้งแต่ 30 -120 นาทีมีค่าแตกต่างกันในช่วงความเชื่อมั่น 95% สังเกตได้จากกราฟที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับค่าสี

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การหาค่าสีของสารละลายไอโอดีนโดยวิธีสเปกโทรสโกปี ด้วยการศึกษสัมพันธ์ระหว่างสีของสารละลายไอโอดีนกับปริมาณออกซิเจนละลายที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากแนวโน้มความเป็นเส้นตรงของกราฟ และนำกราฟมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงเพื่อทดสอบค่าความแตกต่างของวิธีการไทเทรตเดิมกับค่าของวิธีใหม่

4.1 การศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร และ 466 นาโนเมตร

ในการศึกษาการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดจากตัวอย่างมาตรฐาน และเทียบค่าการดูดกลืนแสงด้วยสารละลายไอโอดีน กับไตรไอโอดด์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ถึง 466 นาโนเมตร พบว่า สีที่เกิดในตัวอย่างมาตรฐานมีช่วงความยาวคลื่นแบบเดียวกับไตรไอโอดด์ ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ตั้งแต่ช่วง 340 นาโนเมตร และไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของไอโอดีน ที่ 466 นาโนเมตร ซึ่งการไตเตรตจะใช้ไอโอดีนในการวัดค่า DO เพราะค่าสมมูลกัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่กำหนดความยาวคลื่นในการวัดสีอัตโนมัติ ที่ 340 นาโนเมตร การวัดสีที่ใช้จึงเป็นการวัดสีไตรไอโอดด์

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลาย

4.2.1 ความสัมพันธ์ของค่าสีกับปริมาณออกซิเจนละลาย

เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนละลาย (แกน y) กับค่าสี (แกน x) ผลเป็นดังรูปที่ 3.1 มีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรง ในช่วงปริมาณออกซิเจนละลายตั้งแต่ 0.75-7.75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีสมการถดถอยเชิงเส้นเท่ากับ $y = 0.046x + 0.3736$ ด้วยค่า R^2 เท่ากับ 0.9991

4.2.2 การนำกราฟไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

เมื่อนำตัวอย่างจริงมาวัดค่าสี เพื่อนำไปหาค่า DO_5 กับกราฟที่สร้างขึ้น แล้วนำไปเทียบกับค่า DO_5 ที่ได้จากการไตเตรต แล้วทดสอบความแตกต่างของข้อมูลด้วยการทดสอบทางสถิติ t-test พบว่าค่า P-value มีค่าน้อยกว่า ช่วงความเชื่อมั่น ซึ่งสรุปได้ว่า ค่าจากวิธีการหา DO_5 ด้วยสีแตกต่างจากวิธีการไตเตรต อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 0.05

4.3 ผลของเวลาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของสี

จากการศึกษาเวลาที่มีกับค่าสีพบว่า ค่าสีในช่วง 0-20 นาทีมีค่าไม่แตกต่างกันก่อนจะลดลงและมีค่าแตกต่างกันมากเมื่อเวลาผ่านไปหลัง 20 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.4 ดังนั้นในการวัดค่า DO ด้วยการวัดจากค่าสีควรจะวัดก่อนเวลา 20 นาที เพื่อความถูกต้อง

4.4 สรุปผลการทดลอง

จากการหาปริมาณออกซิเจนละลายด้วยการวัดค่าสีโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่กำหนดความยาวคลื่นที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการวัดค่าสีที่เกิดจากไตรโอไอโอดี เมื่อนำค่าสีดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนละลาย พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรง โดยมี $R^2 = 0.9991$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยเวลาหลังจาก 20 นาที มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสีเมื่อทดลองนำวิธีการวัดสีไปใช้กับตัวอย่างจริง โดยการนำตัวอย่างน้ำเสียไปหาค่า DO_5 ด้วยการวัดสีและเทียบกับการหาค่า DO_5 ด้วยการไตเตรตพบว่าค่า DO_5 ที่ได้จากการวัดสีแตกต่างจากวิธีการไตเตรตเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ 0.05

เอกสารอ้างอิง

1. กรรณิการ์ ศรีพันธ์, นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น. 2550. การหาปริมาณไอโอดีนในน้ำดื่มและน้ำแร่บรรจุขวดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกในระบบอัตโนมัติโพลีอินเจ็คชันแบบรีเวอร์ส. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง: ปีที่ 15 ฉบับที่ 3 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2550.
2. ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข กรมโรงงานอุตสาหกรรม. สมบัติของน้ำ. สืบค้นจาก: <http://www2.diw.go.th/research/เอกสารเผยแพร่/A13-DO-BOD-w.pdf>. (30 มีนาคม 2558).
3. มั่นสิน ต้นทลเวศม์. 2002. เคมีวิทยาของน้ำและน้ำเสีย. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
4. มั่นสิน ต้นทลเวศม์. 2543. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. สืบค้นจาก: http://www.reo13.go.th/KM_reo13/data_know/know_4_do.pdf. (21 มีนาคม 2558).
5. สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้. มหาวิทยาลัยมหิดล. สมบัติของน้ำ สืบค้นจาก: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ecology/chapter3/chapter3_water2.htm. (21 มีนาคม 2558).
6. Wong, G.T.F., Wu, Y.-C. Li, K.-Y. 2010. Winkler's method overestimates dissolved oxygen in natural water: Hydrogen peroxide interference and its implications. Marine Chemistry, 12, 83-90.
7. Helm, I. Jalukse, L. Leito, I. 2012. A highly accurate method for determination of dissolved oxygen: Gravimetric Winkler method. Analytical Chimica Acta, 741, 721-31.
8. Posavec, S.J. 1905. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Canada.
9. Pai, S.-C. Gong, G.-C. Liu, K.-K. 1993. Determination of dissolved oxygen in seawater by direct spectrophotometry of total iodine. Marine Chemistry, 41, 343-351.
10. Labasque, T. Chaumer, C. Aminot, A. Kergoat, G. 2014. Spectrophotometric Winkler determination of dissolved Oxygen: re-examination of critical factors and reliability. Marine Chemistry, 88, 53-60.

ภาคผนวก ก

หลักการการทำงานของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectroquant NOVA 60

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณของ สารเคมีชีวโมเลกุล รวมถึงจุลชีพทั้งหลาย โดยใช้หลักการวัดปริมาณของแสงที่ตัวอย่างดูดกลืนเข้าไป ตัวเครื่องประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสง (Light source) เลนส์ หรือกระจกรับแสง (Lens or Mirror) ตัวแยกความยาวคลื่น (Monochromator) และตัวตรวจจับสัญญาณ (Detector)

แหล่งกำเนิดแสงทำหน้าที่ให้แสงผ่านตัวอย่าง แหล่งกำเนิดแสงที่ดีควรให้แสงที่มีความเข้มสม่ำเสมอ และนิ่งตลอดความยาวคลื่นที่ใช้งาน ปัจจุบันแหล่งกำเนิดแสงที่นิยมนำมาใช้มีหลากหลายชนิดยกตัวอย่างเช่น Deuterium Arc (190-420 nm), Tungsten (350-2500 nm), และ Xenon Lamp (190-800 nm) อีกส่วนประกอบหนึ่งที่สำคัญนั่นคือตัวตรวจจับสัญญาณ สำหรับเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ PMT (photomultiplier tube), diode arrays และ CCDs (charge coupled devices) เครื่องจะทำการบันทึกค่าความยาวคลื่นร่วมกับค่ามุมของแต่ละความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืน ในการวัดตัวอย่างจะใช้ cuvette ซึ่งลักษณะเป็นหลอดสี่เหลี่ยมเล็กทำจากแก้ว พลาสติก หรือควอตซ์ ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีแตกต่างกันคือ cuvette ที่ทำจากควอตซ์จะมีราคาแพงแต่สามารถวัดได้ทั้งความยาวคลื่นได้ทั้ง UV-VIS ขณะที่ cuvette ที่ทำจากพลาสติก หรือแก้วจะวัดได้แค่แสงสีขาวย (vis) เท่านั้น

รูปแบบของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (types of Spectrophotometer)

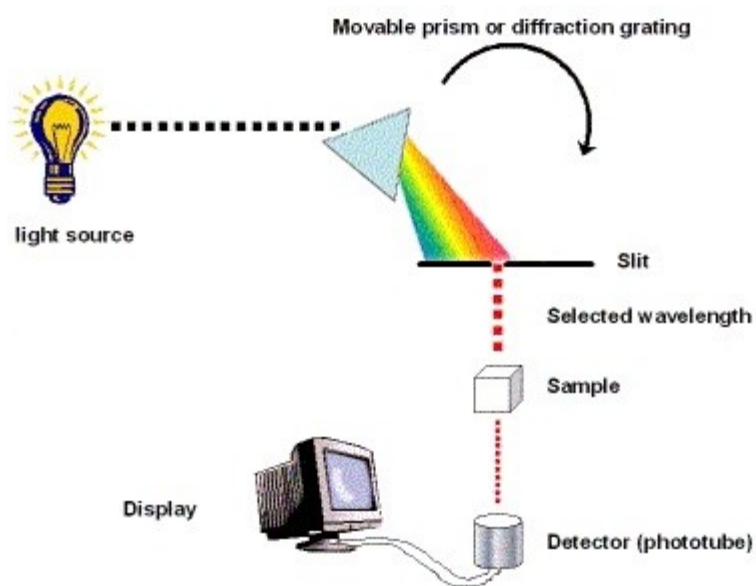
1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดี่ยว (single beam spectrophotometer)

หลักการของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงเดียวนั้น เมื่อแสงออกจากแหล่งกำเนิดแสงแล้ว จะผ่านโมโนโครเมเตอร์ที่เป็นเกรตติง และสารตัวอย่างตามลำดับ แล้วจึงเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณ ตลอดเส้นทางของลำแสงนี้มีลำแสงเดี่ยว จึงเรียก สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ว่าแบบลำแสงเดี่ยว เนื่องจากสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ใช้ลำแสงเพียงลำเดียวผ่านจากโมโนโครเมเตอร์ไปสู่สารละลายที่ต้องการวัดและเข้าสู่ตัวตรวจจับสัญญาณเลย ดังนั้นการวัดจึงต้องวัด 2 ครั้ง ดังนี้

- ครั้งแรกเซลล์บรรจุเบลนค์ (blank) ซึ่งเป็นตัวทำลายของตัวอย่างที่เราต้องการวัดเมื่อลำแสงผ่านเซลล์ ปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่งศูนย์ (set zero)

- ส่วนครึ่งหลังบรรจุสารละลายที่ต้องการวัด (sample) แล้วจึงให้ลำแสงผ่านเซลล์ ความแตกต่างระหว่างการดูดกลืนแสงของทั้ง 2 ครั้งจะปรากฏบนหน้าปัดมิเตอร์ จากนั้นก็สามารถวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นอื่นๆ ต่อไปได้เลย โดยไม่ต้องกลับไปวัดเบลนค์อีก

- การเปลี่ยนความยาวคลื่น จะต้องวัดเบลนค์ใหม่ทุกครั้ง



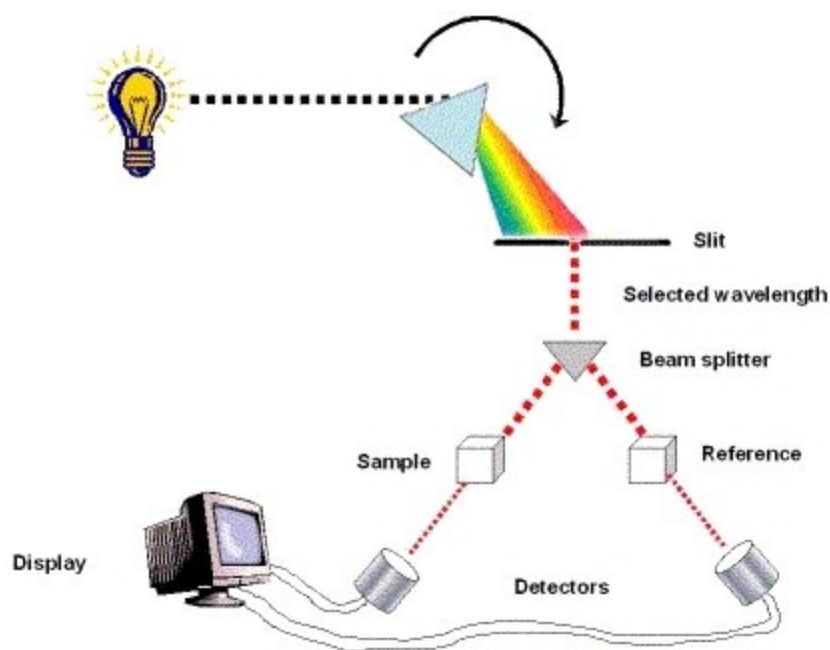
รูปที่ (ก-1) หลักการทำงานของเครื่อง single beam spectrophotometer

(http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html. สถาบันนวัตกรรมการศึกษาเรียนรู้.

มหาวิทยาลัยมหิดล.สืบค้น:21 มีนาคม 2558)

2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer)

สำหรับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำแสงคู่ เมื่อลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสงออกจากช่องแสงออก (exit slit) แล้ว ลำแสงจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำแสง (beam chopper) ซึ่งจะทำหน้าที่สะท้อนลำแสงไปผ่านสารตัวอย่าง (sample) ในขณะที่ลำแสงจะสะท้อนลำแสงไปผ่านสารอ้างอิง (reference) ซึ่งก็คือแบล็กกันเองโดยที่ลำแสงทั้งสองจะมีความเข้มแสงเท่ากันก่อนที่จะผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิง เมื่อลำแสงทั้งสองนี้ไปตกกระทบบนตัวตรวจจับสัญญาณ ความแตกต่างของความเข้มแสงหลังจากผ่านสารตัวอย่างหรือสารอ้างอิงจะกลายเป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



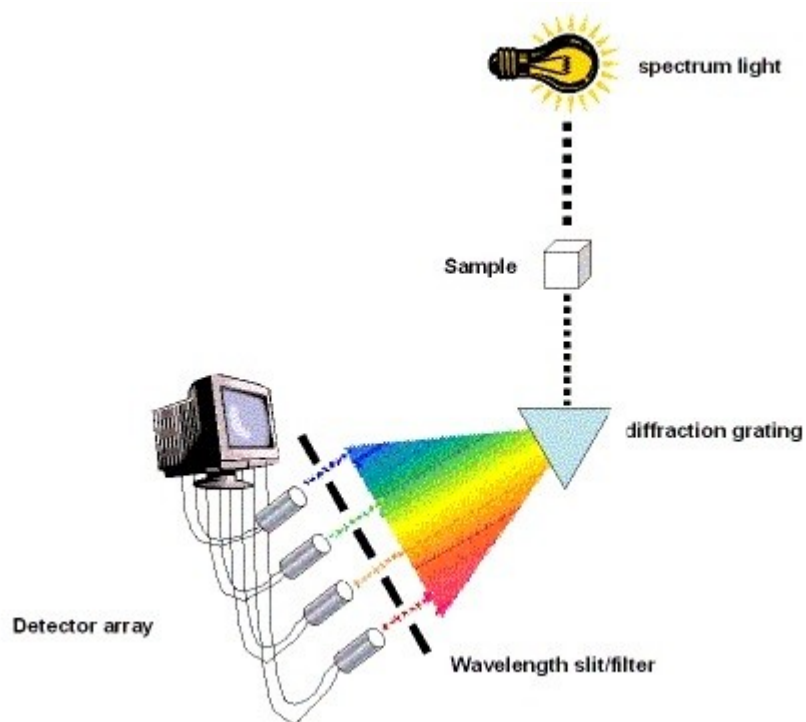
รูปที่ (ก-2) หลักการทำงานของเครื่อง double beam spectrophotometer

(http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html. สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้.

มหาวิทยาลัยมหิดล.สืบค้น:21 มีนาคม 2558)

3. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจจับสัญญาณ (spectrophotometer แบบ diodearray detector)

diode array detector เป็นการตรวจจับสัญญาณ โดยวัดการดูดกลืนของแสง เช่นเดียวกับ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทั่วไป เพียงแต่การเก็บข้อมูลมิใช่การเก็บเพียง 1 หรือ 2 ความยาวคลื่น เท่านั้น แต่สามารถเก็บข้อมูลได้เป็นช่วงของความยาวคลื่น ที่ผู้วิเคราะห์สามารถเลือกได้ โดยใช้ เวลาเพียงนิดเดียว เนื่องจากสามารถวัดทุก ความยาวคลื่น ได้ในเวลาเดียวกัน เหมาะสำหรับการเก็บ ข้อมูลที่เป็นสเปกตรัม หรือต้องการติดตามการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนของสารที่หลาย ความยาวคลื่น



รูปที่ (ก-3) หลักการทำงานของเครื่อง spectrophotometer แบบ diode array detector

(http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/color-light/page4_3.html, สถาบันนวัตกรรมการศึกษาเรียนรู้.

มหาวิทยาลัยมหิดล.สืบค้น:21 มีนาคม 2558