

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น 8350, Hewlett Packard, U.S.A)
2. เครื่องอะตอมมิกส์แอฟซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรี (AAS)
(รุ่น novAA 350, Analytikjena, UK)
3. เครื่องให้ความร้อน (Heat block, รุ่น 949511, Talboys, U.S.A)
4. เครื่องกลั่นน้ำสองครั้ง (Hamilton, England)
5. เครื่องทำน้ำปราศจากไอออน (Barnstead/Thermolyne, U.S.A)
6. เครื่องชั่งแบบละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
(รุ่น AG204, Mettler Toledo, Switzerland)
7. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (รุ่น TC6, Sorvall, American)
8. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (รุ่น Φ 34, Beckman, U.S.A)
9. เซลล์ใส่ตัวอย่าง ขนาด 500 ไมโครลิตร
สำหรับเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (Hellma, Germany)
10. ไมโครปิเปต ขนาด 20, 300 ไมโครลิตร และ 5.00 มิลลิลิตร
(Thermo scientific, Finland)
11. ไมโครไซริงค์ ขนาด 10, 100, 250 และ 500 ไมโครลิตร (Agilent, U.S.A)

3.2 สารเคมีและวัสดุ

1. สารละลายมาตรฐานโครเมตสำหรับอะตอมมิกส์แอฟซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรี
โพแทสเซียมโครเมตในน้ำ ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chromate standard
solution for AAS, Potassium chromate in water, 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร, MERCK,
Germany)
2. สารละลายมาตรฐานโครเมียมสำหรับอะตอมมิกส์แอฟซอร์พชันสเปกโตรโฟโตเมทรี
โครเมียมไนเตรด ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในกรดไนตริก ความเข้มข้น
0.5 โมลต่อลิตร (Chromium standard solution for AAS, Chromium(III)nitrate in
nitric acid 0.5 โมลต่อลิตร, 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร, MERCK, Germany)

3. 1,5-ไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (1,5-Diphenylcarbazide, DPC)
(MW=242.28 กรัมต่อโมล, $C_{13}H_{14}N_4O$, MERCK, Germany)
4. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
(MW=58.44 กรัมต่อโมล, NaCl, BDH Prolabo, UK)
5. โดเดซิลเบนซีนซัลโฟนิก แอซิด (Dodecylbenzenesulphonic acid)
(MW= 326.49 กรัมต่อโมล, $C_{18}H_{30}O_3S$, Fluka, Switzerland)
6. กรดฟอสฟอริก (Orthophosphoric acid) 85% (v/v) Grade AR
(MW=98.00 กรัมต่อโมล, H_3PO_4 , Ajax Finechem, New Zeland)
7. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous)
(MW=142.00 กรัมต่อโมล, Na_2SO_4 , Fisher Scientific, UK)
8. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) Grade HPLC
(MW=84.93 กรัมต่อโมล, CH_2Cl_2 , BDH Prolabo, UK)
9. โทลูอีน (Toluene) Grade AR
(MW=92.14 กรัมต่อโมล, $C_6H_5CH_3$, BDH Prolabo, UK)
10. เฮกเซน (Hexane) Grade AR (MW=84.93 กรัมต่อโมล, CH_2Cl_2 , BDH Prolabo, UK)
11. เมทานอล (Methanol) Grade HPLC
(MW=32.00 กรัมต่อโมล, CH_3OH , BDH Prolabo, UK)
12. อะซีโตน (Acetone) Grade AR (MW=58.08 กรัมต่อโมล, C_3H_6O , New Zealand)
13. อะซีโตรไนไทรล์ (Acetonitrile) Grade AR
(MW=41.05 กรัมต่อโมล, CH_3CN , QRëC, New Zealand)
14. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate)
(MW= 158.03 กรัมต่อโมล, $KMnO_4$, AJAX, Australia)
15. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)
(MW= 34.00 กรัมต่อโมล, H_2O_2 , MERCK, Germany)
16. ซีเรียมซัลเฟต (Cerium (IV)sulfate)
(MW= 404.30 กรัมต่อโมล, $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$, MERCK, Germany)
17. กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid) 98% (w/w)
(MW= 98.08 กรัมต่อโมล, H_2SO_4 , QRëC, New Zealand)
18. กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) 70% (w/w)
(MW= 100.46 กรัมต่อโมล, $HClO_4$, Redel, France)

19. กรดโบรมิก (Bromic acid) 48% (w/w)
(MW= 80.91 กรัมต่อโมล, HBr, PS, Australia)
20. กรดไนตริก (Nitric acid) 65% (w/w)
(MW= 63.01 กรัมต่อโมล, HNO₃, QR&C, New Zealand)
21. น้ำปราศจากไอออน (DI-water) จากเครื่องทำน้ำปราศจากไอออน
(Barnstead/Thermolyne, U.S.A)
22. กระดาษกรอง เบอร์ 5 (Whatman, UK)

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.3.1 สารละลายมาตรฐานโครเมต (Cr(VI))

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโครเมต (stock solution) ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยไมโครปิเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.3.2 สารละลายมาตรฐานโครเมียม (Cr(III))

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโครเมียม (stock solution) ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยไมโครปิเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.3.3 สารละลายมาตรฐานโครเมียมรวม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐาน โครเมียมรวม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งเป็นการผสมกันระหว่าง Cr(III) กับ Cr(VI) โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Cr(III) กับ Cr(VI) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตรดังตารางที่ 1ก ในภาชนะวัด ก ลงในขวดแก้วฝาปิดขนาด 40 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายตัวอย่างบรรจุอยู่ตามสถานะที่เหมาะสม

3.4 การเตรียมสารเคมี

3.4.1 สารละลายกรดหรือเบสความเข้มข้นสูง (ของเหลว)

ดวงกรดหรือเบสตามปริมาตรที่คำนวณลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออน ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรที่ต้องการเตรียม จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้ ปริมาตรตามที่ต้องการ แล้วใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น การเตรียมกรด ฟอสฟอริก (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เตรียมได้ดังนี้ ดวงกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้น 14.67 โมลต่อลิตร ด้วยกระบอกตวง 8.5 มิลลิลิตร เทลงใน บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออนประมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำ ปราศจากไอออนลงไปจนได้ปริมาตรตามที่ต้องการโดยตวงจากกระบอกตวงและใช้แท่งแก้วคนจน สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.2 สารละลายเกลือ กรด หรือเบส (ของแข็ง)

ชั่งสารที่ต้องการเตรียมที่น้ำหนักแน่นอนในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำปราศจาก ไอออนลงไปเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วคนสารจนละลายแล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรที่เตรียมไว้ ทำซ้ำประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้ปริมาตรตามต้องการ ปิดฝาขวดวัด ปริมาตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น เตรียมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 30% (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมได้โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนประมาณ 20 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ทำซ้ำจนโซเดียมคลอไรด์ละลายหมดและ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ตามขีดบอกปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.4.3 สารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ดวงกรดฟอสฟอริกที่มีความเข้มข้น 14.67 โมลต่อลิตร ด้วยกระบอกตวง 8.5 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออนประมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้ปริมาตรตามที่ต้องการและใช้แท่งแก้วคนจนสารละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10.8 โมลต่อลิตร ให้ได้พีเอช ตามต้องการโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ในการวัดค่าพีเอช

3.4.4 สารละลาย 1,5-ไดฟีนิลคาร์บาไซด์ (DPC)

ความเข้มข้น 0.50% (w/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในเมทานอล

ชั่ง 1,5-ไดฟีนิลคาร์บาไซด์ ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด 0.1250 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ ปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดบอกปริมาตรและเขย่าให้เข้ากัน

3.4.5 สารละลาย dodecyl benzene sulphonic acid (DBSA)

ความเข้มข้น 0.50% (w/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในสารละลายไคคลอโรมีเทน
ชั่ง DBSA 0.1250 กรัม ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
ละลายด้วยไคคลอโรมีเทนเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอก
ปริมาตรด้วยไคคลอโรมีเทนและเขย่าให้เข้ากัน

3.4.6 สารละลาย dodecyl benzene sulphonic acid (DBSA) ความเข้มข้น 0.05% (w/v)

ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในไคคลอโรมีเทนที่ผสมเมทานอล (70:30)

ปิเปตสารละลาย 0.50% (w/v) DBSA ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ด้วยออดิ์ปิเปต
ขนาด 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลลงไป 7.5 มิลลิลิตร
จากนั้นปรับปริมาตรด้วยไคคลอโรมีเทนจนถึงขีดบอกปริมาตรและเขย่าให้เข้ากัน

3.4.7 สารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 2.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 18.64 โมลต่อลิตร ด้วยกระบอกตวง
ประมาณ 13.6 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากไอออนประมาณ 50
มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปจนได้ปริมาตรตามที่ต้องการและใช้แท่งแก้วคนจน
สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.8 สารละลาย Ce(IV)ซัลเฟต ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลต่อลิตร

เตรียมสารละลาย Ce(IV) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
หนัก 0.0144 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลต่อลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอก
ปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 โมลต่อลิตรและเขย่าให้เข้ากัน

3.4.9 สารละลายไอออนบวกและไอออนลบชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10000

มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายไอออนต่าง ๆ ความเข้มข้น 10000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร
25 มิลลิลิตร โดยใช้สารและชั่งตามตารางที่ 2ก และ 3ก ในภาคผนวก ก ละลายด้วยน้ำปราศจาก
ไอออน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและเขย่าให้เข้ากัน

3.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม

การเตรียมสารละลายน้ำตัวอย่าง เตรียมโดยกรองตัวอย่างน้ำที่เก็บมาด้วยกระดาษกรอง
Whatman เบอร์ 5 จากนั้นปิเปตตัวอย่างน้ำที่กรองแล้ว ตัวอย่างละ 45 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด
250 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 30% (v/v) 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วปิดด้วยกระบอก

นาฬิกาจับเวลา นำสารละลายไปทำการย่อยตัวอย่างด้วยความร้อน 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระหว่างการย่อยสารละลายตัวอย่างต้องระวังไม่ให้สารละลายแห้ง โดยการเติมน้ำปราศจากไอออนลงไปปริมาณเล็กน้อยเมื่อตัวอย่างจะแห้ง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำสารละลายตัวอย่างออกมารอให้เย็น จะสังเกตเห็นสารละลายใส กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 การถ่ายเทสารละลายต้องทำการกั้วบริเวณด้านในของกระบอกนาฬิกา รวมทั้งด้านในของบีกเกอร์ ตัวอย่างและปรับปริมาตรสุดท้ายให้มีปริมาตรเท่ากับ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (Chow et al., 1995; Jin, Eugene, & Charles, 1997; วิรัช เรื่องศรีตระกูล, 2011)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การหาสถานะที่เหมาะสมของสารเชิงซ้อนที่เกิดจาก Cr(VI) กับ DPC

1) ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารเชิงซ้อน Cr-DPC

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(VI) ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการปิเปต Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วฝาปิด ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 1.50) ความเข้มข้น 0.50 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำปราศจากไอออนลงไปตามปริมาตรที่กำหนดด้วยยอดปิเปตให้ได้ปริมาตรรวมสุดท้าย 10.00 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายดิแกนด์ (DPC) ความเข้มข้น 0.5000% (w/v) 100 ไมโครลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง สังเกตสีที่เกิดขึ้นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของการเกิดสารเชิงซ้อนของ Cr(VI) กับ DPC เพื่อหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยศึกษาในช่วง 200-800 นาโนเมตร

2) ความเป็นกรดเบสของสารละลาย (พีเอช)

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 1.5-12 โดยการปิเปตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ที่พีเอชต่าง ๆ ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ DPC ความเข้มข้น 0.5000% (w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปตน้ำปราศจากไอออนด้วยยอดปิเปตให้มีปริมาตรรวมสุดท้าย 10 มิลลิลิตร สังเกตผลที่เกิดขึ้นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกพีเอชที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

3) ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05–1.50 โมลต่อลิตร โดยปิเปตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.50 โมลต่อลิตร ที่พีเอชที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 2) ที่

ปริมาตร ต่าง ๆ ตามที่คำนวณลงในขวดแก้วฝาปิดขนาด 40 มิลลิลิตร ที่มี Cr(VI) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม DPC ความเข้มข้น 0.5000% (w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปิดน้ำปราศจากไอออนด้วยออดิปีเปิดตามปริมาตรที่คำนวณให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตร สังเกตผลที่เกิดขึ้นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

4) ความเข้มข้นของลิแกนด์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(VI) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.10, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นและพีเอชที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2) และ 3) เติม DPC ในช่วงความเข้มข้น 5.0×10^{-4} – 1.0×10^{-2} % (w/v) จากสารละลาย DPC ความเข้มข้น 0.5000% (w/v) ปิเปิดน้ำปราศจากไอออนด้วยออดิปีเปิดจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของลิแกนด์และสัญญาณของสเปกตรัมที่สูงขึ้นของสารเชิงซ้อน Cr(VI) กับ DPC เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัด ซึ่งหาได้จากความชันของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Cr(VI) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ DPC เลือกความเข้มข้นของ DPC ที่เหมาะสม

5) เวลาในการเกิดสารเชิงซ้อน

เตรียมสารละลาย Cr(VI) ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ทำการจับเวลาหลังจากเติม DPC ลงไป โดยศึกษาในช่วงเวลา 0-90 นาที นำสารเชิงซ้อน Cr(VI) กับ DPC ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตามเวลาที่ศึกษา เลือกเวลาในการเกิดสารเชิงซ้อน Cr(VI) กับ DPC ที่มีความเสถียรที่สุด โดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่คงที่

ตารางที่ 3-1 ปัจจัยและขอบเขตที่ศึกษาในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดสารเชิงซ้อน

ปัจจัยที่ศึกษา	ขอบเขตที่ศึกษา
ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารเชิงซ้อนที่เกิดจาก Cr(VI) กับ DPC	200-800 นาโนเมตร
ความเป็นกรดเบสของสารละลาย (พีเอช)	1.5-12
ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์	0.05–1.5 โมลต่อลิตร
ความเข้มข้นของลิแกนด์	5.0×10^{-4} – 1.0×10^{-2} % (w/v)
เวลาในการเกิดสารเชิงซ้อน	0-90 นาที

3.6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลว

แบบแพร่กระจาย (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)

1) ความเข้มข้นของ ion pair reagent

เตรียมสารละลายเชิงซ้อน Cr-DPC ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.1 ใช้ออโต้เปิดดูดสารละลาย DBSA ที่ละลายในไดคลอโรมีเทนที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-0.5000% (w/v) ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ฉีดลงในสารละลายเชิงซ้อน Cr-DPC เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไป 5.0000 กรัม นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้หลอดหยดดูดสารเชิงซ้อนที่อยู่ในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกความเข้มข้นของ DBSA ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

2) อัตราเร็วในการเหวี่ยง (Centrifugation rate)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1) โดยเลือกความเข้มข้นของ DBSA ที่เหมาะสม นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง โดยทำการศึกษาอัตราการเหวี่ยงสารละลายที่ความเร็ว 1000-3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกอัตราการเหวี่ยงที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

3) เวลาในการเหวี่ยง (Centrifugation time)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2) โดยเลือกความเร็วในการเหวี่ยงสารเชิงซ้อนตามสภาวะที่เหมาะสมและทำการศึกษาเวลาในการเหวี่ยงสารเชิงซ้อนที่เวลา 2-15 นาที ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกเวลาในการเหวี่ยงที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

4) ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด (Extraction solvent)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3) โดยเลือกเวลาในการเหวี่ยงที่เหมาะสม ทำการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายในการสกัดจากไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ โทลูอีนและเฮกเซน ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนสังเกต

ว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

5) ปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัด (Extraction solvent)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4) โดยเปลี่ยนปริมาตรของ 0.0500% (w/v) DBSA ที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ดังข้อ 4) ทำการศึกษาปริมาตรสกัดที่ 50-500 ไมโครลิตร ตามสภาวะที่เหมาะสม ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกปริมาตรของตัวทำละลายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

6) ชนิดของสารที่เป็นตัวแพร่กระจาย (Disperser solvent)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5) โดยเลือกปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัดที่เหมาะสมและศึกษาชนิดของสารที่เป็นตัวแพร่กระจายโดยเตรียมสารละลายในข้อ 3.4.6 แต่เปลี่ยนจากเมทานอลเป็นเอทานอล อะซีโตนและอะซีโตรไนไตรล์ ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกชนิดของสารที่เป็นตัวแพร่กระจายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

7) อัตราส่วนของสารที่เป็นตัวแพร่กระจาย (Disperser solvent)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6) โดยเลือกชนิดของสารที่เป็นตัวแพร่กระจายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและศึกษาปริมาตรของสารที่เป็นตัวแพร่กระจาย โดยการเตรียมสารละลายในข้อ 3.4.6 ใช้สารที่เป็นตัวแพร่กระจายต่อตัวทำละลายที่ใช้สกัดในช่วง 0-90% (v/v) ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกอัตราส่วนของสารที่เป็นตัวแพร่กระจายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

8) เวลาในการสกัด (Extraction time)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7) โดยเลือกปริมาตรสารที่เป็นตัวแพร่กระจายที่เหมาะสม ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นเขย่าสารเชิงซ้อนเป็นเวลา 10 วินาที ถึง 5 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายใน

ไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่ดูดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกเวลาในการสกัดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

9) การเติมเกลือ (Effect of salting out)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 8) โดยเลือกเวลาในการสกัดที่เหมาะสม ศึกษาการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 0-30% (w/v) โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลาย ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่ดูดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

10) ชนิดของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดซ้ำ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 9) โดยเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยการเติมสารที่เป็นตัวช่วยสกัดลงไป เนื่องจากช่วยให้ประสิทธิภาพการสกัดสมบูรณ์ขึ้น โดยเติมสารที่เป็นตัวช่วยสกัดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอทานอล เมทานอล อะซิโตนและอะซิโตนไนไตรล์ ลงไป 500 ไมโครลิตร หลังทำการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสม นำสารเชิงซ้อนไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกชนิดของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

11) ปริมาตรของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดซ้ำ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 10) โดยเลือกชนิดของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดที่เหมาะสม ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยการเติมสารที่เป็นตัวช่วยสกัดที่ปริมาตรต่าง ๆ โดยทำการเติมสารที่เป็นตัวช่วยสกัดลงไปทีละปริมาตร 200 ไมโครลิตร ถึง 2.00 มิลลิลิตร หลังทำการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสม นำสารเชิงซ้อนไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ใช้ไมโครไซริงค์ดูดสารเชิงซ้อนที่ละลายในไดคลอโรมีเทนลงขวดแก้วฝาปิดขนาดเล็ก เติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปจนสังเกตว่าไม่มีน้ำเจือปน บันทึกปริมาตรของสารเชิงซ้อนที่สกัดได้ นำสารเชิงซ้อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกปริมาตรของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและให้ค่า enrichment factor สูงสุด

ตารางที่ 3-2 ปัจจัยและขอบเขตในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยเทคนิค
ตัวทำละลายของเหลวแบบแพร่กระจาย

ปัจจัยที่ศึกษา	ขอบเขตที่ศึกษา
ความเข้มข้นของ ion pair reagent	0-0.5% (w/v)
อัตราเร็วในการเหวี่ยง	1000-3000 รอบต่อนาที
เวลาในการเหวี่ยง	2-15 นาที
ชนิดของตัวทำละลายในการสกัด	ไดคลอโรมีเทน โทลูอิน เฮกเซน
ปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัด	100-500 ไมโครลิตร
ชนิดของสารที่เป็นตัวแพร่กระจาย	ไดคลอโรมีเทน เอทานอล เมทานอล อะซีโตน อะซีโตรไนไตรล์
อัตราส่วนของสารที่เป็นตัวแพร่กระจาย	0-90% (v/v)
เวลาในการสกัด	10 วินาที - 5 นาที
การเติมเกลือ	0-30% (w/v)
ชนิดของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดซ้ำ	ไดคลอโรมีเทน เอทานอล เมทานอล อะซีโตน อะซีโตรไนไตรล์
ปริมาตรของสารที่เป็นตัวช่วยสกัดซ้ำ	200 ไมโครลิตร ถึง 2 มิลลิลิตร

3.6.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์ Cr(III) เป็น Cr(VI)

1) ชนิดของตัวออกซิไดซ์

ศึกษาชนิดของตัวออกซิไดซ์โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ Cr(VI) ละลายในน้ำปราศจากไอออนในขวดแก้วฝาปิดขนาด 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวออกซิไดซ์ชนิดต่าง ๆ ตามสภาวะการออกซิไดซ์ ดังตารางที่ 3-3 เพื่อเปลี่ยน Cr(III) เป็น Cr(VI) ทำการเกิดสารเชิงซ้อนและสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกับ Cr(VI) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับค่าการดูดกลืนแสงของ Cr(VI) กับ DPC ที่ไม่ออกซิไดซ์

ตารางที่ 3-3 ชนิดของตัวออกซิไดซ์ที่สภาวะเหมาะสมในการออกซิไดซ์ จากงานวิจัยอื่น ๆ

ตัวออกซิไดซ์	สภาวะในการออกซิไดซ์	เวลา (นาท)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อ้างอิง
H ₂ O ₂	เบส (NaOH, KOH, NH ₃)	30-60	60-70	Cherrine (2007)
NaClO ₂	เบส (NaOH)	30-60	60	Huijian et al. (2006)
MnO ₂	กรด	-	-	Rai, Eary, & Zachara (1989)
K ₂ S ₂ O ₈	กรด (H ₂ SO ₄)	45	65	Narin et al. (2006)
Ce(IV)	กรด (HNO ₃ , H ₂ SO ₄)	5-30	40-45	Luque-Castro (2006)
KMnO ₄	กรด (H ₂ SO ₄)	15	100	Yousefi and Shemirani (2013)

2) อุณหภูมิในการออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1) โดยเลือกชนิดของสารที่เป็นตัวออกซิไดซ์ที่เหมาะสมนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 25–100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการเกิดสารเชิงซ้อนและสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัดซึ่งหาได้จากความชัน ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Cr(III) กับค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในการออกซิไดซ์ เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์เป็นสภาวะที่เหมาะสม

3) เวลาในการออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2) โดยเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการออกซิไดซ์เป็นเวลา 5-50 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัด เลือกเวลาที่ทำให้สภาพไวในการตรวจวัดสูงสุดเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์

4) ชนิดของกรดที่ใช้ในการออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโครเมียมรวม 0, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3) ศึกษาชนิดของกรดในการออกซิไดซ์ โดยเปรียบเทียบกรดซัลฟิวริกและกรดไนตริก โดยเติมกรดนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัด เลือกชนิดกรดที่ทำให้สภาพไวในการตรวจวัดสูงสุดเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์

5) ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกในการออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3) โดยศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการออกซิไดซ์ในช่วง 0–1 โมลต่อลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัดของกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการออกซิไดซ์ เลือกความเข้มข้นของกรดที่ให้สภาพไวในการตรวจวัดสูงสุดเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์

6) ความเข้มข้นของตัวออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลือกชนิดของตัวออกซิไดซ์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดตามข้อ 1) แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวออกซิไดซ์ที่ความเข้มข้น 0–10 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซิไดซ์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2) เป็นเวลา 5 นาที ทำการเกิดสารเชิงซ้อนและสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารที่เป็นตัวออกซิไดซ์ เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่เป็นตัวออกซิไดซ์

7) ชนิดสารในการกำจัดตัวออกซิไดซ์ที่มากเกินไป

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6) หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จากนั้นเติมกรดชนิดต่าง ๆ ลงไป เพื่อกำจัดตัวออกซิไดซ์ที่มากเกินไป ได้แก่ กรดโบรมิกและกรดเปอร์คลอริก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการเกิดสารเชิงซ้อนและสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เลือกชนิดกรดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อน Cr-DPC ใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนที่เกิดจาก Cr(VI) ที่ไม่ถูกออกซิไดซ์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดตัวออกซิไดซ์ที่มากเกินไป

8) ความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวกำจัดปริมาณที่มากเกินไปของตัวออกซิไดซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโครเมียมรวม 0, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 7) เลือกชนิดของกรดที่สามารถกำจัดปริมาณสารที่เป็นตัวออกซิไดซ์ที่มากเกินไปได้จากข้อ 7) ศึกษาความเข้มข้นของกรดในช่วง 0–2 โมลต่อลิตร ทำการเกิดสารเชิงซ้อนและสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบสภาพไวในการตรวจวัดที่เวลาต่าง ๆ ในการออกซิไดซ์ เลือกความเข้มข้นของกรดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อน Cr-DPC ใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนที่เกิดจาก Cr(VI) ที่ไม่ถูกออกซิไดซ์และให้สภาพไวในการตรวจวัดสูงสุดเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์

ตารางที่ 3-4 ปัจจัยและขอบเขตในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์

ปัจจัยที่ศึกษา	ขอบเขตที่ศึกษา
ชนิดของตัวออกซิไดซ์	Ce(IV)
อุณหภูมิในการออกซิไดซ์	25-100 องศาเซลเซียส
เวลาในการออกซิไดซ์	5-50 นาที
ความเข้มข้นกรดในการออกซิไดซ์	0-1 โมลต่อลิตร
ความเข้มข้นของตัวออกซิไดซ์	H ₂ SO ₄ และ HNO ₃
ชนิดกรดในการกำจัดตัวออกซิไดซ์ที่มากเกินไป	HBr และ HClO ₄
ความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวกำจัดปริมาณที่มากเกินไปของตัวออกซิไดซ์	0-2 โมลต่อลิตร
ชนิดของกรดในการออกซิไดซ์	H ₂ SO ₄ และ HNO ₃

3.6.4 สารรบกวนการวิเคราะห์ (Interference)

ศึกษาสารรบกวนการวิเคราะห์ โดยเตรียมสารมาตรฐานโครเมียมรวม 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมไอออนบวกและไอออนลบชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ดังตารางที่ 2ก และ 3ก ในภาคผนวก ก ลงไปที่มีความเข้มข้นมากกว่าโครเมียมรวม 1000, 500, 100, 50, 20 และ 10 เท่า จากนั้นทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสม วัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณความคลาดเคลื่อน (error) โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ไม่เติมไอออนต่าง ๆ ลงไป ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนที่ได้ต้องอยู่ในช่วง $\pm 5\%$ (Narin et al., 2006; Baliza, Teixeira, & Lemos, 2009; Wen, Wu, & Zhu, 2013) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ error} = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \times 100 \quad (\text{Yousefi and Shemirani, 2013})$$

เมื่อ $\bar{X}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่เติมไอออนลงไป

μ = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ไม่เติมไอออนลงไป

3.6.5 ศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

1) ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

หลังจากได้สถานะที่เหมาะสมของการเกิดสารเชิงซ้อนแล้ว ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานโครเมียมรวม ที่ความเข้มข้นต่ำสุดจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง สร้างกราฟหาความสัมพันธ์เส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

2) ขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection: LOD) และ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantification: LOQ)

ทำการสกัดตามสถานะที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานแล้วแทนค่าลงในสมการ $y = (k \times SD) + \text{blank}$ (IUPAC method)

เมื่อ $k = 3$ สำหรับ LOD และ 10 สำหรับ LOQ

จากนั้นแทนค่า y ที่ได้ลงสมการจากกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้น (x)

3) การสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

หลังจากได้สถานะที่เหมาะสมของการเกิดสารเชิงซ้อนแล้ว ทำการเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Cr(III) และ Cr(VI) ที่มีความเข้มข้นในช่วง LOD-LOL แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลการวิเคราะห์พลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง เพื่อนำสมการที่ได้คำนวณหาความเข้มข้นของ Cr(III) และ Cr(VI) ที่มีในตัวอย่าง

4) การศึกษาความเที่ยงในการวิเคราะห์ (Precision)

สกัดสารละลายมาตรฐาน Cr(III) และ Cr(VI) ที่ 3 ความเข้มข้นในช่วงที่ทำให้ความเป็นเส้นตรง คือ ช่วงความเข้มข้นต่ำและช่วงความเข้มข้นสูง ทำการทดสอบการทำซ้ำ (repeatability) โดยวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง ของแต่ละความเข้มข้นในวันเดียวและทดสอบ intermediate precision โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 วัน วันละ 3 ครั้ง ในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เปรียบเทียบค่า % RSD จากสมการ $RSD < 2^{(1-0.5 \log c)} + 0.67$ (AOAC)

5) การศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์ (Accuracy)

ศึกษาความแม่นยำในการวิเคราะห์จากร้อยละการได้กลับคืน (% recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน Cr(III) และ Cr(VI) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในตัวอย่างน้ำ ทำการสกัดด้วยสถานะที่เหมาะสม แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาความเข้มข้นของโครเมียมที่มีในตัวอย่างน้ำและนำความเข้มข้นที่หาได้คำนวณร้อยละการได้กลับคืน (% recovery) จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(\text{ความเข้มข้นหลังเติมสารมาตรฐาน}) - (\text{ความเข้มข้นก่อนเติมสารมาตรฐาน}) \times 100}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

เปรียบเทียบกับค่า % recovery ที่ได้จากค่ามาตรฐานจาก AOAC

3.6.6 ศึกษาปริมาณ Cr(III) และ Cr(VI) ในตัวอย่างน้ำ

1) ตัวอย่างน้ำสำหรับวัดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เตรียมตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม (ดังข้อ 3.5) หลังจากได้เจสต์ตัวอย่างน้ำแล้วนำตัวอย่างน้ำมา 16 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วฝาปิด ทำการออกซิไดซ์โดยเติม Ce(IV) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ละลายในกรดซัลฟิวริก 2.5 โมลต่อลิตร ลงไป 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมกรดเปอร์คลอริก 10 โมลต่อลิตร ลงไป 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายตัวอย่างเย็นลง เติม DPC 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 35 นาที จะสังเกตเห็นว่าสารละลายมีสีม่วง ทำการสกัดตามสภาวะที่เหมาะสม โดยการฉีดสารละลาย DBSA 0.05% (w/v) ที่ละลายในสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลอัตราส่วน 70:30 ที่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงไป 6 กรัม ฉีดเอทานอลลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าสารละลาย 4 นาที นำสารละลายไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ดูดชั้นของไดคลอโรมีเทนที่ตกลงก้นขวดแก้วฝาปิดนำมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรตเพื่อกำจัดน้ำ แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่าการดูดกลืนแสง คำนวณหาความเข้มข้นของ Cr(III) โดยนำความเข้มข้นของโครเมียมรวมที่คำนวณได้ หักลบกับความเข้มข้นของ Cr(VI) ที่ทำการสกัดตัวอย่างน้ำโดยไม่ออกซิไดซ์ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำปราศจากไอออนที่ใช้ในการทดลอง บ่อน้ำตึกเคมีและบ่อน้ำหอสมุด เติมสารมาตรฐานโครเมียมลงไปที่มีความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานโครเมียม ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 56 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างน้ำหลังได้เจสต์ แล้วทำการวิเคราะห์ดังข้อ 1) เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้โดยเทคนิคที่เสนอกับเทคนิค AAS

2) ตัวอย่างน้ำสำหรับวัดด้วยเครื่องอะตอมมิกส์แอฟฟอร์ตพั่น-สเปกโตรสโกปี (AAS)

เตรียมตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม (ดังข้อ 3.5) หลังจากได้เจสต์ตัวอย่างน้ำแล้วนำตัวอย่างน้ำมา 16 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วฝาปิดขนาด 40 มิลลิลิตร ปิเปต Cr(VI) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 56 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นสุดท้าย 70 ไมโครกรัมต่อลิตร) เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยการเติมกรดไนตริก 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย

0.5%) เติม KCl 1% ลงไป 2 มิลลิเมตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1%) เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดด้วยเครื่อง AAS ตามสภาวะดังนี้

2.2) สภาวะของเครื่อง AAS

1. Main line: 357.9 nm
2. Slit width: 0.2 nm
3. HCL current: 5.0 mA
4. Flame: C_2H_2 /Air
5. Alternative flame: C_2H_2/N_2O
6. Diluent for stock solution: HNO_3 1%
7. Ionization buffer: KCl 0.1%

3) เปรียบเทียบปริมาณโครเมียมรวมจากวิธีที่เสนอ (UV-VIS) กับวิธีอะตอมมิกส์ แอปซอร์พชัน-สเปกโตรสโกปี (AAS)

เปรียบเทียบความเข้มข้นของสองวิธีข้างต้น โดยใช้ The student t-test คำนวณความแตกต่างระหว่าง 2 วิธี เป็นการทดสอบผลการทดลองของสองวิธีที่ได้จากสารตัวอย่างเดียวกัน วิธีที่หนึ่งทำการทดลองด้วยวิธีที่เสนอและอีกวิธีหนึ่งทำการวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับ (AAS) โดยคำนวณค่า t จากผลของการทดลองทั้งสอง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า t จากทฤษฎี แสดงค่า t ที่ขีดจำกัดความเชื่อมั่น 95% โดยค่า t ที่คำนวณได้ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า t จากทฤษฎี จึงสรุปได้ว่าไม่เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธี คำนวณจากสมการ

$$t = \frac{\bar{D}}{S_d} \sqrt{N} \quad (\text{ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์, 2550: James \& Janc, 2005})$$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (D_i - \bar{D})^2}{N-1}}$$

D_i – ความแตกต่างของผลการทดลองโดยวิธีวิเคราะห์ทั้งสองต่อสารตัวอย่างแต่ละสาร

$\bar{D}$ – ค่าเฉลี่ยของ D_i

N – จำนวนสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

S_d = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน