วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ (Standard Operating Procedure)

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

โดยวิธี 5 Days Incubation และ Azide Modification

ปริมาณของออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Biochemical Oxygen Demand (BOD) คือ ค่าบีโอดีบ่งบอกถึงปริมาณความสกปรกของน้ำในรูปของปริมาณออกซิเจนที่ต้องการ เมื่อน้ำนั้นถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ การหาค่า BOD_5 จะเป็นการหาออกซิเจนที่แบคทีเรียใช้ไปภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน

1. ขอบข่ายการทดสอบ

วิธีนี้ใช้ได้กับการทดสอบตัวอย่างน้ำเสียจากชุมชนและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยถ้าจำเป็นจักต้องมีการทำ (seeding) และ (pretreatment)ที่เหมาะสม

2. ค่าที่รายงานผล(detection limits)

Minimum detection limit เท่ากับ 2 mg/l

3. รายละเอียดการประกันคุณภาพ(quality assurance criteria)

3.1 QA limit ของ “%ผลต่าง(relative percent difference)” สำหรับ การวิเคราะห์ซ้ำ(duplicate analysis) เท่ากับ 15%

3.2 ค่า BOD ของตัวอย่าง QC (Glucose-Glutamic acid) ควรมีค่า 198 ± 30.5 mg/l

3.3 ผลต่างของปริมาณ DO_0 และ DO_5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 2 mg/l

3.4 ปริมาณ DO_5 ต้องมีค่าอย่างน้อย 1 mg/l

3.5 ผลต่างของปริมาณ DO_0 และ DO_5 สำหรับ Blank ของน้ำเจือจางต้องมีค่าไม่มากกว่า 0.2 mg/l สำหรับกรณีที่เติมน้ำเชื้อ ความแตกต่างของ DO สำหรับ Blank ควรจะอยู่ระหว่าง 0.6 และ 1.0 mg/l

4. หลักการวิธีทดสอบ

สำหรับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ถ้าจำเป็นให้ทำการเจือจางในสัดส่วนที่เหมาะสมและให้มีปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพียงพอ และอาจต้องมีการเติมอากาศเพื่อปรับปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำในน้ำตัวอย่าง แล้วนำไปหาปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำตัวอย่างมาหาปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำที่เหลืออยู่ ค่า BOD หาได้จากปริมาณของออกซิเจนที่ลดลง

ในการทดสอบหาออกซิเจนละลายน้ำใช้วิธี Winkler (azide modification) โดยเติมสารละลาย Manganese Sulfate แล้วตามด้วยสารละลาย Alkali-Iodide-Azide ออกซิเจนละลายน้ำจะทำปฏิกริยากับ Manganese ได้ตะกอนสีแดงของ Manganese dioxide และภายใต้สภาวะที่เป็นกรด Iodide จะทำปฏิกริยากับ Manganese dioxide ได้เป็น Iodine จากนั้นไตรเตรต(titrate) หา Iodine ด้วย สารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate

5. การเก็บรักษาตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์หาค่า BOD ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ภายใน 2 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C และวิเคราะห์ตัวอย่างภายใน 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ให้ปรับอุณหภูมิของตัวอย่างให้ได้ประมาณ 20 ^{o}C ก่อนนำมาวิเคราะห์

6. ข้อควรระวัง

หลังจากที่ล้างขวด BOD ให้สะอาดแล้ว ก่อนนำมาใช้ให้ Rinse ด้วยน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่ตกค้าง และคว่ำให้เย็นและแห้งก่อนนำมาใช้

7. เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1 ขวด BOD ขนาด 250-300 ml พร้อมจุกปิดสนิทแบบ ground joint ส่วนใหญ่ใช้ขวดที่ทำพิเศษเพื่อการหาออกซิเจนละลายน้ำโดยเฉพาะ

7.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หรือ Water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 20 ± 1 ^{o}C และต้องมืดเพื่อป้องกันการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายในตัวอย่าง

7.3 อุปกรณ์สำหรับเติมอากาศในน้ำ

7.4 ปิเป็ต(pipets)

7.5 กระบอกตวง(cylinder)

7.6 อุปกรณ์สำหรับการไตรเตรต (titrate)

7.7 ขวดวัดปริมาตร(volumetric flasks)

8. สารเคมี

8.1 สารละลาย Phosphate Buffer

นำสาร KH_2PO_4 มา 8.5 g สาร K_2HPO_4 มา 21.75 g สาร $Na_2HPO_4.7H_2O$ มา 33.4 g และสาร NH_4Cl มา 1.7 g ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นประมาณ 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l ค่า pH ของสารละลายนี้ควรจะประมาณ 7.2 โดยไม่ต้องปรับ

8.2 สารละลาย Magnesium Sulfate

นำสาร $MgSO_4.\ 7H_2O$ มา 22.5 g ละลายในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l

8.3 สารละลาย Calcium Chloride

นำสาร $CaCl_2$ มา 27.5 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l

8.4 สารละลาย Ferric Chloride

นำสาร $FeCl_3\ .\ 6H_2O$ มา 0.25 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l

8.5 สารละลายกรดและด่าง 1 N เพื่อใช้ในการปรับค่า pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง

8.6 สารละลาย Sodium Sulfite

นำสาร Na_2SO_3 มา 1.575 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml สารละลายนี้ไม่อยู่ตัว ต้อง เตรียมในวันที่จะใช้

8.7 สารป้องกันการเกิด Nitrification : 2chloro-6-(trichoromethyl) pyridine

8.8 สารละลาย Glucose-Glutamic acid

อบ Glucose (reagent grade) และ Glutamic acid (reagent grade) ที่อุณหภูมิ 103 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ Glucose มา 150 mg และ Glutamic acid มา 150 mg ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่น จนได้ปริมาตร 1 l สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นได้ 3 สัปดาห์

8.9 สารละลาย Manganous sulfate (DO#1)

นำสาร $MnSO_4.4H_2O$ มา 480 g หรือสาร $MnSO_4.2H_2O$ มา 400 g หรือสาร$MnSO_4.H_2O$ มา 364 g ละลายในน้ำกลั่น กรอง แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l สารละลายที่เตรียมได้ไม่ควรให้สีกับน้ำแป้ง เมื่อนำไปเติมลงไปในสารละลาย Potassium iodide (KI) ที่มีสภาพเป็นกรด

8.10 สารละลาย Alkali-Iodide-Azide (DO#2)

นำสาร NaOH มา 500 g (หรือสาร KOH 700 g) และสาร NaI มา 135 g (หรือสาร KI 150 g) ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l หลังจากนั้นนำสาร NaN_3 มา 10 g ละลายในน้ำกลั่น 40 ml แล้วนำไปเติมในสารละลายที่เตรียมขึ้น

8.11 กรด H_2SO_4 เข้มข้น (DO#3)

8.12 น้ำแป้ง

ละลาย Soluble Starch 2 g และ Salicylic acid 0.2 g ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ที่ทำให้ร้อน

8.13 สารละลายมาตรฐาน Potassium bi-iodate (0.025 N)

ละลาย $KH(IO_3)_2$ 812.4 mg ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1 l

8.14 สารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate (0.025 N)

นำสาร $Na_2S_2O_3.5H_2O$ มา 6.205 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติม NaOH 6N จำนวน 1.5 ml หรือสาร NaOH จำนวน 0.4 g แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 l ให้ทำการ Standardize สารละลายนี้ด้วยสารละลาย bi-iodate ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

9. ขั้นตอนการวิเคราะห์

9.1 วิธีการหาโดยตรง

ในกรณีที่ตัวอย่างมีค่า BOD ไม่เกิน 7 mg/ส ไม่จำเป็นต้องเจือจางตัวอย่าง ส่วนใหญ่จะได้แก่น้ำจากแม่น้ำลำคลอง ให้วิเคราะห์ตัวอย่างตามขั้นตอนต่อไปนี้

9.1.1 ปรับอุณหภูมิตัวอย่างให้ได้ประมาณ 20 ^{o}C

9.1.2 เติมอากาศให้ตัวอย่างมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำใกล้จุดอิ่มตัว

9.1.3 เติมตัวอย่างในขวดBOD จำนวน 2 ขวด

9.1.4 วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในขวดที่ 1 ทันที

9.1.5 นำขวดที่ 2 เข้าเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน

9.1.6 หลังจาก 5 วัน วิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เหลืออยู่ในขวดที่ 2

9.2 วิธีการที่ต้องเจือจางตัวอย่าง

วิธีนี้ใช้กับตัวอย่างที่มีความสกปรกสูง โดยมีค่าBOD มากกว่า 7 mg/l ซึ่งถ้าไม่เจือจางตัวอย่างแบคทีเรียจะใช้ออกซิเจนจนหมดก่อนเวลา 5 วัน ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีค่าเท่ากับศูนย์ จึงไม่สามารถหาค่าBODได้

9.2.1 การเตรียมน้ำเจือจาง

1) ตวงน้ำกลั่นตามปริมาตรที่ต้องการใช้

2) เติมสารละลาย Phosphate Buffer, Magnesium Sulfate, Calcium Chloride และ Ferric Chloride อย่างละ 1 ml ต่อ น้ำกลั่น 1l

3) เติมอากาศอย่างน้อย 4 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มออกซิเจนที่ละลายน้ำ

4) ปรับอุณหภูมิให้ได้ 20 ^{o}C

5) เติมน้ำเชื้อ (seed) ถ้าจำเป็น โดยปกติแล้วถ้าเป็นน้ำเชื้อจากน้ำเสียชุมชนจะใช้น้ำเชื้อ 2 ml ต่อน้ำเจือจาง 1 L

9.2.2. การเติมน้ำเชื้อ (seeding)

ตัวอย่างจำเป็นต้องมีจุลินทรีย์ ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ในปริมาณที่เพียงพอ น้ำเสียชุมชน น้ำที่ผ่านการบำบัดแบบชีวภาพและยังไม่มีการฆ่าเชื้อหรือเติมคลอรีน และน้ำผิวดินจะมีปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพียงพอ แต่ตัวอย่างบางประเภทมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่เพียงพอ เช่น น้ำเสียจากโรงงานบางประเภท น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ น้ำเสียที่มีอุณหภูมิสูงหรือน้ำเสียที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูง เป็นต้น สำหรับน้ำเสียประเภทเหล่านี้จำเป็นต้องเติมน้ำเชื้อลงในน้ำเจือจางด้วย น้ำเชื้อที่ใช้สามารถใช้น้ำเสียชุมชน โดยนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แต่อย่าให้นานเกิน 36 ชั่วโมง แล้วนำส่วนที่ใสมาใช้เป็นน้ำเชื้อ

การควบคุมน้ำเชื้อ(seed control) คือการวิเคราะห์ค่าBODของน้ำเชื้อที่ใช้เติมลงในน้ำเจือจาง ค่าที่ได้จะนำไปใช้คำนวณภายหลัง

9.2.3. การจัดการขั้นต้นกับตัวอย่าง

1) ตัวอย่างที่มีความเป็นกรดหรือด่างให้ปรับให้เป็นกลางโดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 ด้วย H_2SO_4 หรือ NaOH โดยปริมาณของกรดหรือด่างที่เติมไม่ควรมากกว่า 5% ของปริมาตรตัวอย่าง

2) ตัวอย่างที่มีสารประกอบคลอรีนตกค้าง : ถ้าเป็นไปได้ควรหลีกเลี่ยงตัวอย่างที่มีสารคลอรีนตกค้าง โดยเก็บตัวอย่างก่อนที่จะผ่านเข้าขบวนการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ถ้าตัวอย่างผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้วตรวจไม่พบสารคลอรีนตกค้างให้เติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจางด้วย ถ้าพบปริมาณคลอรีนตกค้างให้กำจัดคลอรีนก่อนและเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจางด้วย

3) ตัวอย่างที่มีสารพิษ : น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น โรงงานชุบโลหะ จะมีโลหะที่เป็นสารพิษอยู่ ตัวอย่างประเภทนี้จำเป็นต้องได้รับการศึกษาและบำบัดเป็นกรณีพิเศษ

4) ตัวอย่างที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเกินจุดอิ่มตัว : ตัวอย่างที่มีค่าออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 9 mg/L ที่อุณหภูมิ 20 ^{o}C ให้ลดปริมาณออกซิเจนลงมาจนถึงจุดอิ่มตัว โดยการเติมตัวอย่างไม่ต้องเต็มขวดแล้วเขย่า หรือ โดยการเติมอากาศ

5) การป้องกันการเกิด nitrification : ถ้าต้องการป้องกันความผิดพลาดของค่าBODจากการเกิด nitrification ให้เติม 2-chloro-6- (trichloro methyl) pyridine (TCMP) จำนวน 3 mg ในขวดBOD ขนาด 300 ml ก่อนปิดจุกหรือเติมในน้ำเจือจาง ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10 mg/l

9.2.4. การทำ Blank

นำน้ำเจือจางมาเทใส่ขวดBOD 6 ขวด นำ 3 ขวดไปวิเคราะห์หา DO ทันที และ 3 ขวดที่เหลือไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปหา DO

9.2.5. การทำตัวอย่าง QC

1) เลือกตัวอย่างน้ำเสียชุมชนมา 1 ตัวอย่างใช้เป็นน้ำเชื้อ(seed) โดยนำมา 10 ml ใส่ลงไปในกระบอกตวง 1000 ml

2) เติม สารละลาย Glucose-Glutamic acid จำนวน 20 ml

3) เติมน้ำเจือจางจนได้ปริมาตร 1000 ml

4) กวนสารละลายในกระบอกตวงให้เข้ากันด้วยแท่งกวน

5) ค่อยๆ เทสารละลายในกระบอกตวงใส่ขวดBOD 3 ขวด พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

6) ขวด 1 นำไปหา DO ทันที

7) ขวด 2 และ 3 นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่20°Cเป็นเวลา5วันแล้วจึงนำไปหา DO

9.2.6. การทำ Duplicate

ให้ทำ Duplicate สำหรับตัวอย่างน้ำที่ใช้ทำ QC โดยเจือจางตัวอย่างให้ได้ 1000 ml แล้วเทใส่ขวด BOD 3 ขวดนำไปหา DO ทันที 1 ขวด แล้วนำ 2 ขวดที่เหลือไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไปหาค่า DO

9.2.7. การเจือจางตัวอย่าง

การเจือจางตัวอย่างสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเจือจางในกระบอกตวง และการเจือจางโดยตรงในขวดBOD สำหรับการเจือจางโดยตรงในขวดBOD ถ้าใช้ตัวอย่างน้อยกว่า 0.5 ml ให้เจือจางตัวอย่างเบื้องต้นก่อน

1) เติมอากาศให้ตัวอย่างประมาณ 2 นาที

2) กำหนดปริมาณการเจือจางตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่กำหนด 3 ช่วง ให้ครอบคลุมค่าBODที่ประเมินไว้ การเจือจางที่ดีควรให้ผลของ DO ที่เวลา 5 วัน มีค่าอย่างน้อย 1 mg/l และปริมาณของ DO ที่ลดลงหลังจากเวลา 5 วัน ควรมีค่าอย่างน้อย 2 mg/l การหาค่า CODของตัวอย่าง ซึ่งสามารถรู้ผลภายในเวลา ประมาณ 2 ชั่วโมง สามารถช่วยในการเลือกช่วงที่จะเจือจางตัวอย่างได้ โดยส่วนใหญ่ค่า BOD จะมีประมาณ 60% ของค่าCOD หรืออาจจะประเมินจากประเภทของตัวอย่าง ดังนี้

น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ให้เจือจาง น้อยกว่า 1.0%

น้ำเสียชุมชน ให้เจือจาง 1 ถึง 5%

น้ำที่ผ่านการบำบัดทางชีวภาพ ให้เจือจาง 5 ถึง 25%

น้ำแม่น้ำที่เน่าเสีย ให้เจือจาง 25 ถึง 100%

สำหรับช่วงของค่าBODที่สัมพันธ์กับสัดส่วนการเจือจางนั้นแสดงไว้ในตารางข้างล่าง

ตารางที่ 1 ช่วงของค่า BOD กับวิธีการเจือจางต่างๆ ของตัวอย่าง*

Using Percent mixtures		By direct pipetting into 300-ml bottles	
% mixture	Range of BOD	ml	Range of BOD
0.01	20,000-70,000	0.02	30,000-105,000
0.02	10,000-35,000	0.05	12,000-42,000
0.05	4,000-14,000	0.10	6,000-21,000
0.1	2,000-7,000	0.20	3,000-10,500
0.2	1,000-3,500	0.50	1,200-4,200
0.5	400-1,400	1.0	600-2,100
1.0	200-700	2.0	300-1,050

2.0	100-350	5.0	120-420
5.0	40-140	10.0	60-210
10.0	20-70	20.0	30-105
20.0	10-35	50.0	12-42
50.0	4-14	100	6-21
100	0-7	300	0-7

*ข้อมูลจาก : Chemistry for Environmental Engineering, Sawyer and McCarty, 3rd ed., p.424

สำหรับการเลือกช่วงเจือจางนั้น ให้ประมาณค่าBODของตัวอย่างก่อน เช่น ประมาณว่าตัวอย่างมีค่า BODเท่ากับ 500 mg/l จากตารางแนะนำให้เจือจางตัวอย่าง 1% สำหรับBODที่มีค่าอยู่ระหว่าง 200 ถึง 700 mg/l จากนั้นให้เลือกเจือจางตัวอย่างอีก 2 ช่วง ที่มากกว่าและน้อยกว่า 1% อยู่ 1 ขั้น คือ 0.5% และ 2.0% ช่วงของBODที่ทำการเจือจางจะเป็น 100 ถึง 1400 mg/l ซึ่งน่าจะครอบคลุมค่า BODของตัวอย่างและสามารถป้องกันการผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการประมาณขั้นต้น

3) เทตัวอย่างในปริมาณที่ต้องการลงในกระบอกตวง 1 l

4) เติมน้ำเจือจางลงไปจนปริมาตรได้ 700 ml

6) กวนตัวอย่างให้เข้ากันดีด้วยแท่งกวน

7) ค่อยๆ เทตัวอย่างลงในขวดBOD จำนวน 2 ขวด พยายามอย่างให้เกิดฟองอากาศ เพราะจะถือว่า DO ของตัวอย่างทั้ง 2 ขวด มีค่าเท่ากัน ปิดจุกหล่อน้ำ ใส่ฝาครอบ

8) นำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ^{o}C 1 ขวด ขวดที่เหลือนำไปวิเคราะห์หาค่า DO ทันที ด้วยวิธี Azide Modification

ในกรณีที่หาค่า DO โดยใช้วิธี Membrane Electrode ให้เตรียมตัวอย่างขวดเดียว และหาค่า DO เริ่มต้นก่อน แล้วจึงปิดฝาอย่าให้มีฟองอากาศในขวด หล่อน้ำ แล้วนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

9.2.8. การหาค่า DO เริ่มต้นและสุดท้าย

การหาค่า DO สามารถทำได้ 2 วิธี คือวิธี Winkler (azide modification) และ วิธี Membrane Electrode

ขั้นตอนการหา DO โดยวิธี Winkler (azide modification)

1) เทน้ำที่หล่อจุกขวดตัวอย่างออก

2) เปิดจุก เติมสารละลาย Manganese sulfate (DO#1) 1 ml โดยขณะเติมให้ปลายปิเป็ต(pipet) อยู่ใต้ผิวน้ำ

3) เติมสารละลาย Alkali-Iodide-Azide (DO#2) 1 ml โดยให้ปลาย ปิเป็ต(pipet) อยู่ใต้ผิวน้ำขณะเติม

4) ปิดจุกโดยอย่าให้มีฟองอากาศภายในขวด คว่ำขวดไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้สารผสมกัน

5) ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส เกินครึ่งหนึ่งของขวด

6) เติมกรด H2SO4 เข้มข้น(DO#3) 1 ml โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้าง ๆ คอขวด ปิดจุกคว่ำขวดขึ้นลงหลายครั้งจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

7) ตวงปริมาตร 201 ml นำไป ไตรเตรต(titrate) กับสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate (0.025 N) จนได้สีเหลืองอ่อน

8) เติมน้ำแป้ง 2-3 หยดจะได้สีน้ำเงินเข้มทำการไตรเตรตต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงนหายไปปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate ที่ใช้จะเทียบเท่ากับปริมาณของออกซิเจน(DO)ของน้ำตัวอย่างโดยมีหน่วยเป็น mg/l

10. การคำนวณ

10.1 กรณีไม่มีการเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจาง

$$BOD = \frac{DO_0 - DO_5}{P}$$

โดยที่ BOD_5 = ค่า BOD ที่ระยะเวลากักเก็บตัวอย่าง 5 วันมีหน่วยเป็น mg/l

DO_0 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างที่หาได้ทันที, mg/l

DO_5 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 วัน, mg/l

P = สัดส่วนปริมาณของตัวอย่างที่ใช้เจือจาง โดยคิดปริมาณทั้งหมดเป็น 1 ส่วน

10.2 กรณีเติมน้ำเชื้อในน้ำเจือจาง

BOD_5 =

โดย BOD_5 = ค่า BOD ที่ระยะเวลากักเก็บตัวอย่าง 5 วัน, mg/l

DO_0 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างที่หาได้ทันที, mg/l

DO_5 = ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตัวอย่างหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 วัน, mg/l

P = สัดส่วนปริมาณของตัวอย่างที่ใช้เจือจาง โดยคิดปริมาณทั้งหมดเป็น 1 ส่วน

B_1 = DO ของ seed control ก่อนนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ, mg/l

B_2 = DO ของ seed control หลังจากเก็บไว้ 5 วัน

f = อัตราส่วนน้ำเชื้อในตัวอย่างที่เจือจางกับใน seed control

11. การรายงานผล

รายงานผลค่า BOD เป็นเลขจำนวนเต็มมีหน่วยเป็น mg/l

12. เอกสารอ้างอิง

วิธีการทดสอบนี้ยึดหลัก (followed) วิธีที่ 5210 B ของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition, 1992. APHA, AWWA, WEF.

ปฏิบัติการเรื่อง การวิเคราะห์ค่า COD

(Determination of chemical Oxygen Demand)

ค่า COD หมายถึง ปริมาณออกซิเจนทั้งหมดที่ต้องการ เพื่อใช้ในการ oxidize สารอินทรีย์ใน น้ำเสียให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยที่สารอินทรีย์เกือบทั้งหมด (95-100 %) จะถูก oxidize โดยตัวเติมออกซิเจนอย่างแรง (Strong oxidizing agent) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ดังสมการที่ 1

$$C_nH_aO_bN_c + (n + a/4 - b/2 - 3/4c)O_2 \longrightarrow nCO_2 + (a/2 - 3/2c)H_2O + NH_3 \ldots..(1)$$

จะเห็นว่าสมการการเกิดปฏิกิริยาของ COD คล้ายกับ BOD คือสารอินทรีย์ในน้ำจะถูก oxidize จนได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ต่างกันตรงที่ BOD นั้นใช้แบคทีเรียในการย่อยสลาย ส่วน COD ใช้ตัวเติมออกซิเจน (oxidizer) ดังกล่าวแล้ว โดยปกติค่า COD จะสูงกว่าค่า BOD ทั้งนี้เพราะสารอินทรีย์คาร์บอนจะถูก oxidize อย่างสมบูรณ์โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการดูดซึมทางชีวะ (biological assimilation) ของสารเหล่านั้น เช่น กลูโคส ลิกนิน เซลลูโลส โดยเฉพาะถ้าน้ำเสียนั้นมีสารอินทร์ที่ไม่สามารถถูก oxidize ทางชีวะปนอยู่ด้วย จะทำให้ค่า COD สูงกว่าค่า BOD มาก ในกรณีที่น้ำเสียมีสารอินทรีย์บางพวกเช่น straight-chain aliphatic compound, aromatic hydrocarbon, pyridine และ betaine ปะปนอยู่ ซึ่งสารเหล่านี้จะไม่ถูก oxidize ทางเคมี ค่า COD จะน้อยกว่าค่า BOD อิออนของสารอินทรีย์บางตัว เช่น halogen (F^-, Cl^-, Br^-), NO^{2-}, S^{2-} และ Fe^{2+} มีผลทำให้ค่า COD มีค่ามากกว่าความเป็นจริง การหาค่า COD จะรู้ผลในเวลาไม่เกิน 3 ชม. ดังนั้นจึงเหมาะในการควบคุมระบบบำบัดน้ำเสียเพราะสามารถแก้ไขข้อบกพร่องได้ทันท่วงที และใช้ในการประเมินค่า BOD อย่างคร่าว ๆ

Strong oxidizing agent ที่ใช้ในการหาค่า COD มีด้วยกันหลายตัวคือ potassium permanganate, ferric sulfate, potassium iodate และ potassium dichromate การหาค่า COD โดยใช้โปแตสเซียมไดโครเมตเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเพราะให้ผลที่น่าเชื่อถือและแน่นอน หลักการของวิธีนี้คือ สารอินทรีย์คาร์บอนจะถูก oxidized โดยโปแตสเซียมไดโครเมตในสภาวะที่เป็นกรดอย่างรุนแรง ดังนั้นจึงใช้การ reflux เพื่อป้องกันการระเหยสูญหายของสารเคมี จากนั้นจึงไทเทรตหาปริมาณโปแตสเซียม- ไดโครเมตที่เหลืออยู่ด้วย ferrous ammonium sulfate โดยใช้ ferroin เป็นอินดิเคเตอร์ ปฏิกิริยาที่เกิดเป็นดังนี้

$$3\ \text{Org.carbon} + 2\ Cr_2O_7^{2-} + 16H^+ \longrightarrow 3CO_2 + 4Cr^{3+} + 8\ H_2O \ldots\ldots\ldots(2)$$

$$Cr_2O_7 + 6Fe^{2+} + 14H^+ \longrightarrow 6Fe^{3+} + 2Cr^{3+} + 7H_2O \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(3)$$

มีการเติม $AgSO_4$ เป็นตัว catalyst เพื่อเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดส์ของพวกกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ (straight chain aliphatic) นอกจากนี้ $AgSO_4$ ที่ใส่ไปจะไปทำปฏิกิริยากับ Cl^-, Br^- หรือ I^- ได้ แต่ $AgSO_4$ เป็น catalyst ที่ไม่ได้ผลในการออกซิไดส์สารประกอบพวก aromatic และ pyridine สารรบกวนที่สำคัญคือ Cl^- จึงต้องใส่ $HgSO_4$ ลงไปก่อนเพื่อไปจับกับ Cl^- ให้อยู่ในรูปของ mercuric chloride complex โดยวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีค่า COD ตั้งแต่ 50 มก. /ล ขึ้นไปได้และแน่นอน

การ reflux มี 2 วิธี คือ แบบเปิด (Open Reflux) และแบบปิด (Closed Reflux) ทั้งสองวิธีการมีหลักการเหมือนกัน ต่างกันตรงอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ และแบบปิดสารอินทรีย์ที่ระเหยจะสามารถถูกออกซิไดส์ได้มากกว่าระบบเปิด เพราะมีเวลาในการสัมผัสกับสารออกซิไดส์ได้นานกว่า

<u>ตอนที่ 1</u> การวิเคราะห์หา COD แบบ Open Reflux

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. Reflux apparatus ประกอบด้วยขวดรูปชมพู่ก้นแบนขนาด 250-500 มล. ซึ่งต้องมีคอทำด้วย ground glasses 24/40 และ condenser 300 มม. Jacket Liebig ซึ่งต้องมีข้อต่อทำด้วย ground glass 24/40 เช่นกัน
2. Hot plate
3. Burette ขนาด 50 มล.

<u>รีเอเจนต์</u>

1. สารละลายมาตรฐาน Potassium dichromate 0.25 N

   ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 12.259 กรัม ซึ่งอบแห้งที่ 103 ^oC เป็นเวลา 2 ชม.ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
2. กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม Ag_2SO_4 (Sulfuric Acid reagent)

   ละลาย Ag_2SO_4 22 กรัมใน Conc. H_2SO_4 ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้สารละลาย
3. สารละลายมาตรฐาน Ferrous ammonium sulfate (FAS) 0.1 N

   ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 39 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติม conc. H_2SO_4 ลงไป 20 มล. ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

   สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 0.25 N ดังนี้ คือ นำสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 0.25 N 10 มล. มาเติมน้ำกลั่น 90 มล. แล้วเติม

conc. H_2SO_4 ลงไป 30 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลาย ferrous ammonium sulfate (FAS) โดยใช้ ferroin จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็น สีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

$$\text{Normality of FAS solution} = \frac{\text{ml } K_2Cr_2O_7}{\text{ml Fe } (NH_4)_2(SO_4)_2} \text{ X}$$

4. สารละลาย ferroin อินดิเคเตอร์

ละลาย 1-10 phenantroline monohydrat 1.485 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 695 มก. ในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มล.

5. Mercuric sulfate ($HgSO_4$)
6. Silver sulfate ($AgSO_4$)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

น้ำทิ้งบางชนิดมีค่า COD สูงมาก ถ้าไม่ได้ทำการทดลองหาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมแล้ว การวิเคราะห์ COD อาจล้มเหลว เนื่องจากอัตราส่วน $K_2Cr_2O_7$: conc. H_2SO_4 with $AgSO_4$ ที่ใช้เพื่อให้เกิดการออกซิไดส์ได้ดีที่สุดคือ 1 : 3 และปริมาณของตัวอย่างน้ำ + $K_2Cr_2O_7$: conc. H_2SO_4 with $AgSO_4$ จะเป็น 1 : 1 ในการทดลองเพื่อไม่ให้สิ้นเปลืองมาก มักใช้ตัวอย่างน้ำ 20 มล. + $K_2Cr_2O_7$: conc. H_2SO_4 with $AgSO_4$ 30 มล. ดังนั้นถ้าตัวอย่างเข้มข้นมากเกินไปก็สามารถทำการเจือจางตัวอย่างน้ำก่อนด้วยอัตราส่วนหนึ่ง แล้วจึงนำน้ำมาไม่เกิน 20 มล. มาใช้ในการวิเคราะห์

1. ใส่ $HgSO_4$ ประมาณ 0.4 กรัม ลงในขวดรีฟลักซ์พร้อมด้วย glass bead 2-3 เม็ด จากนั้นเติมตัวอย่างน้ำที่ได้หาปริมาณที่เหมาะสมแล้วลงในขวด ปิเปตสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 10 มล.เติมลงไปเขย่าให้เข้ากัน
2. ค่อย ๆ เติม กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ ลงไป 30 มล. (ไม่ต้องเขย่า)
3. นำขวดรีฟลักซ์นี้ไปต่อกับเครื่องควบแน่น ค่อยๆหมุนขวดให้ส่วนผสมเข้ากันดีก่อนแล้วจึงทำการรีฟลักซ์หรือต้มให้เดือดเป็นเวลานาน 2 ชม. ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างเครื่องควบแน่นก่อนที่จะถอดขวดรีฟลักซ์ออกไปไทเทรต
4. ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มล. และน้ำยาเคมีต่าง ๆ เหมือนที่ใช้วิเคราะห์น้ำตัวอย่าง แล้วทำการ รีฟลักซ์ไปพร้อมกับตัวอย่าง
5. ไทเทรตหาปริมาณ $K_2Cr_2O_7$ ที่เหลือ หรือมาเกินพอด้วยสารละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ โดยใช้สารละลาย ferroin เป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที

การคำนวณ

$$\text{COD, mg / L} = \frac{(a - b) \times N \times 8000}{\text{ml sample}}$$

a = ml ของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรต Blank

b = ml ของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรต น้ำตัวอย่าง

N = Normality ของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้

<u>ตอนที่ 2</u> การวิเคราะห์หา COD แบบ Close Reflux, Titrimetric Method

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. หลอดทดลองชนิด borosilicate ขนาด 25 x 150 มม. พร้อมจุก TFE
2. ที่ใส่หลอดทดลอง
3. เตาอบ (oven) ที่อุณหภูมิ 150 ± 2 ^{o}C.
4. ปิเปตขนาด 1,10 มล.
5. บิวเรตขนาด 50 มล.
6. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

<u>รีเอเจนต์</u>

1. สารละลาย digestion reagent

   ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 4.913 กรัม ซึ่งอบแห้งที่ 103 ^{o}C เป็นเวลา 2 ชม.ในน้ำกลั่น 500 มล. ค่อย ๆ เติม conc. H_2SO_4 167 มล. เติม $HgSO_4$ ลงไป 33.3 กรัม คนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ (Sulfuric Acid reagent)

   ละลาย $AgSO_4$ 22 กรัมใน Conc. H_2SO_4 ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย

3. สารละลายมาตรฐาน ferrous ammonium sulfate (FAS) 0.1 N

   ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 39 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเติม conc. H_2SO_4 ลงไป 20 มล. ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนครบปริมาตร 1 ลิตร

   สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลาย digestion reagent ดังนี้ คือ เติมน้ำกลั่น 10 มล. สารละลาย digestion reagent 14 มล.จากนั้นใช้ปิเปตค่อย ๆ เติม Sulfuric Acid reagent ลงไป 14 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลาย Ferrous ammonium sulfate (FAS) โดยใช้ ferroin จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

$$\text{Normality of FAS solution} = \frac{\text{ml } K_2Cr_2O_7}{\text{ml Fe } (NH_4)_2(SO_4)_2} \times$$

4. สารละลาย ferroin อินดิเคเตอร์ วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ล้างหลอดทดลอง และฝาจุกด้วยกรด H_2SO_4 20 % ก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำมา 10 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม digestion reagent ลงไป 6 มล.
3. ค่อย ๆ เติม กรด sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ ลงไป 14 มล. ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นของน้ำตัวอย่างและ digestion reagent

   หมายเหตุ ภายหลังการเติมกรดซัลฟุริก ให้สังเกตสีของตัวอย่างดังต่อไปนี้

   - ถ้าได้สีเขียว แสดงว่าปริมาณ $K_2Cr_2O_7$ เหลืออยู่มาก ใช้ปริมาณน้ำตัวอย่างน้อยเกินไป ต้องเพิ่มปริมาณน้ำตัวอย่างอีก
   - ถ้าได้สีเขียวอมเหลือง แสดงว่าปริมาณน้ำตัวอย่างเหมาะสม สามารถนำตัวอย่างไปรีฟลักซ์ได้
   - ถ้าได้สีเขียวอมฟ้า แสดงว่าปริมาณน้ำตัวอย่างมากเกินไป ต้องทำการเจือจางน้ำตัวอย่างให้มีความเข้มข้นน้อยกว่านี้.

   โดยจะใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำตัวอย่าง : น้ำกลั่น เท่าไหร่ก็ได้ แต่ผลรวมของปริมาตรน้ำตัวอย่างต้องเท่ากับ 10 มล.
4. ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่น แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปรีฟลักซ์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งอาจแตกได้ในขณะทำการรีฟลักซ์
5. ให้ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง ประมาณ 1-2 หลอด
6. นำหลอดแก้วทั้งหมดที่ใส่น้ำตัวอย่างและ Blank วางบนที่ตั้งหลอดทดลอง แล้วเข้าเตาอบที่ทำให้อุณหภูมิสูงถึง 150 ± 2 $^{\circ}$C ก่อนหน้านี้แล้ว เมื่อครบเวลา 2 ชม. ให้นำตัวอย่างออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเย็น
7. เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้ไทเทรตกับสารละลาย FAS จนกระทั้งถึงจุดยุติ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที

   การคำนวณ คำนวณเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของตัวอย่างน้ำและ Reagent ต่าง ๆ ในหลอดทดลอง

Digestion vessel	Sample (ml)	Digestion solution (ml)	H_2SO_4 reagent (ml)	Total final volume (ml)
Culture Tube :				
16 x 100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 mm	10.0	14.0	14.0	30.0
Standard 10-ml ampule	2.5	1.5	3.5	7.5

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์หา COD แบบ Close Reflux, Colorimetric Method

เครื่องมือและอุปกรณ์

1 หลอดทดลองชนิด borosilicate ขนาด 16 x 100 มม. พร้อมจุก TFE
2 ที่ใส่หลอดทดลอง
3 COD Reactor ที่อุณหภูมิ 150 ± 2 ^{o}C.
4 Spectrophotometer ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
5 ปิเปตขนาด 1,10 มล.
6 บิวเรตขนาด 50 มล.

รีเอเจนต์

1. Digestion reagent

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 10.216 กรัม ซึ่งอบแห้งที่ 103 ^{o}C เป็นเวลา 2 ชม.ในน้ำกลั่น 500 มล. ค่อย ๆ เติม conc. H_2SO_4 167 มล. เติม $HgSO_4$ ลงไป 33.3 กรัม คนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. กรด Sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$

ละลาย $AgSO_4$ 22 กรัมใน conc. H_2SO_4 ซึ่งมีน้ำหนัก 4.1 กิโลกรัม (2.5 ลิตร) แล้วตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันเพื่อให้ละลาย

3. สารละลายมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate(KHP)

ละลาย Potassium hydrogen phthalate (KHP) ($HOOCC_6H_4COOK$) 0.425 กรัม ซึ่งอบแห้งที่ 120 ^{o}C เป็นเวลา 2 ชม. ในน้ำกลั่น 500 มล. คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

โดย KHP 1 กรัม จะให้ค่า COD = 1176 mg

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ล้างหลอดทดลอง และฝาจุกด้วยกรด H_2SO_4 20 % ก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์
2. ปิเปตตัวอย่างน้ำมา 2.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม digestion reagent ลงไป 1.5 มล.
3. ค่อย ๆ เติม กรด sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ ลงไป 3.5 มล. ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นของน้ำตัวอย่างและ digestion reagent

   หมายเหตุ ภายหลังการเติมกรดซัลฟุริก ให้สังเกตสีของตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 2
4. ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่น แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ใน Block heater ของเครื่อง COD Reactor เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด
5. ให้ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง ประมาณ 1-2 หลอด
6. การเตรียม Calibration curve
   - 6.1 เตรียม standard potassium hydrogen phthalate(KHP) ประมาณ 5 จุด โดยให้ค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20-900 mg / L
   - 6.2 ปิเปต สารละลายมาตรฐาน KHP ในแต่ละความเข้มข้นมา 2.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม digestion reagent ลงไป 1.5 มล.
   - 6.3 ค่อย ๆ เติม กรด sulfuric เข้มข้นที่ผสม $AgSO_4$ ลงไป 3.5 มล. ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นของน้ำตัวอย่างและ digestion reagent
   - 6.4 ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่น แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ใน Block heater ของเครื่อง COD Reactor เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด ซึ่งอาจแตกได้ในขณะทำการทดลอง
5. นำหลอดแก้วทั้งหมดที่ใส่น้ำตัวอย่าง Blank และ Standard KHP ที่เตรียมได้ทั้ง 5 จุด ไปใส่ใน Block heater ของเครื่อง COD Reactor ที่ทำให้อุณหภูมิสูงถึง 150 ± 2 ^{o}C ก่อนหน้านี้แล้ว เมื่อครบเวลา 2 ชม. ให้นำตัวอย่างออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเย็น
6. เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงใน cuvette วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
7. นำค่า % Absorbance ของ standard KHP ไปพล๊อตกับค่าความเข้มข้นของ KHP จะได้กราฟเป็นเส้นตรง

การคำนวน

$$\text{COD as mg } O_2 \text{ / ml} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ final volume x 1000}}{\text{ml sample}}$$

<u>คำถาม</u>

1. จงบอกข้อดี-ข้อเสีย ของการวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำใดๆด้วยการวิเคราะห์หา ค่า COD
2. จงบอกถึงวิธีเก็บและรักษาตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์หาค่า COD หากไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทันทีภายหลัง เก็บตัวอย่าง
3. จงบอกวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำที่มีค่า COD < 50 mg/L