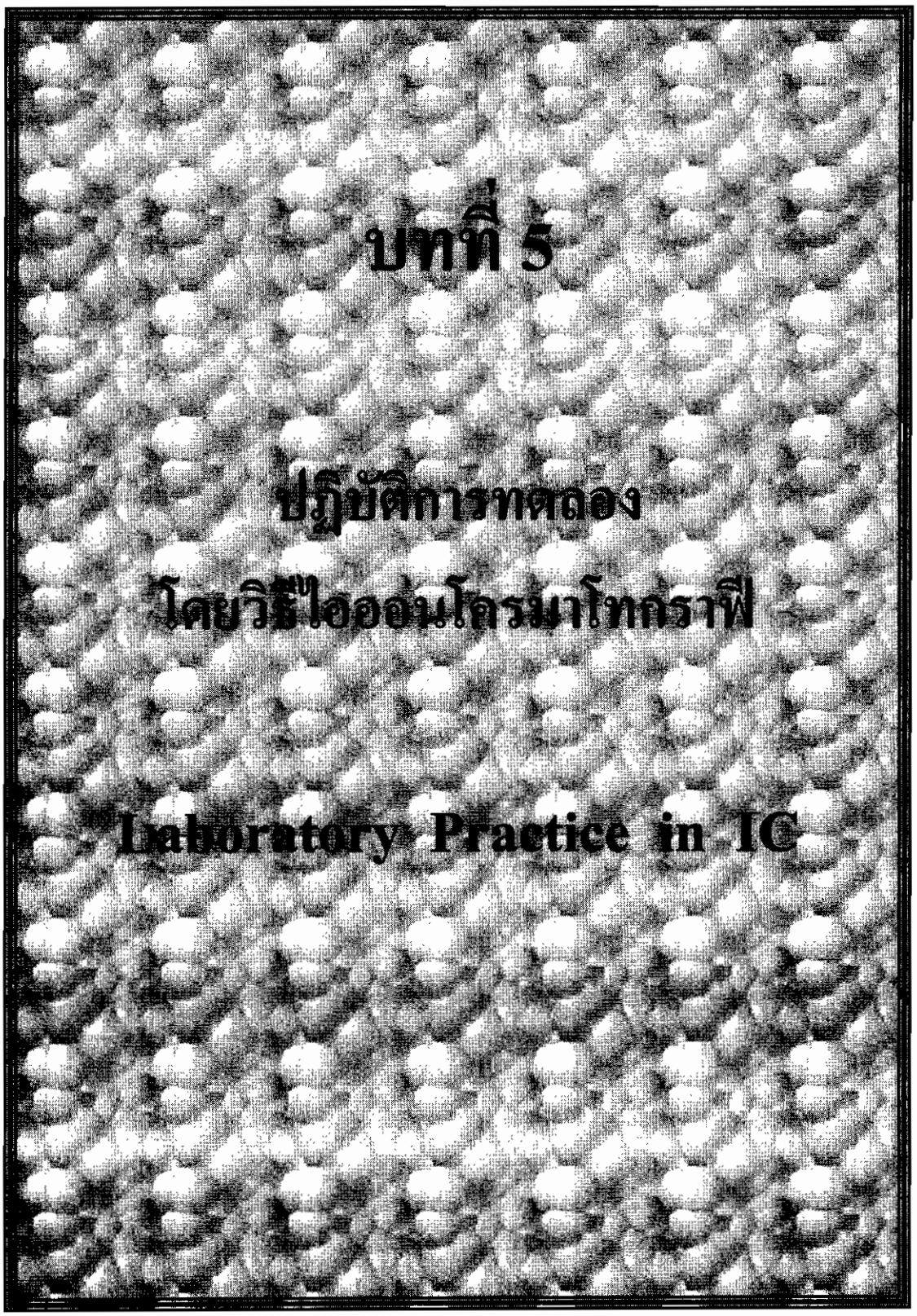
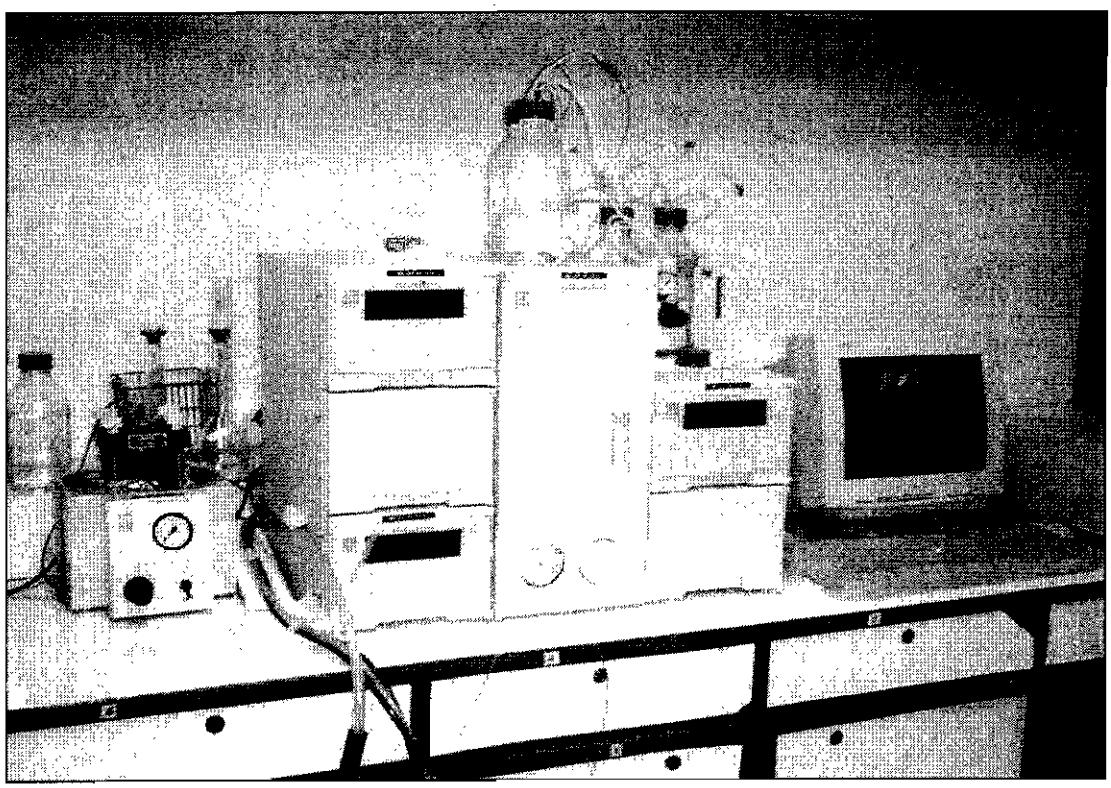

บทที่ 5
ปฏิบัติการทดลอง
โดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี
Laboratory Practice in IC

บทที่ 5

ปฏิบัติการทดลองโดยวิธี ไอออนโครมาโทกราฟี

Laboratory Practice in IC

เครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการทำปฏิบัติการทดลองของกระบวนวิชา CM437 คือ DX 500 ของบริษัท Dionex



รูปที่ 5.1 ชุดเครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟี DX 500 ในห้องปฏิบัติการ CM 437

(1) ขั้นตอนในการทำปฏิบัติการทดลอง มีดังนี้

1.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่หรือ ตัวชะ ที่ใช้ใน IC สำหรับห้องปฏิบัติการ CM 437 มี 3 ชนิด คือ ตัวชะที่ใช้ในการวิเคราะห์แอนไอออน ได้แก่ สารละลายผสม $NaHCO_3$ / Na_2CO_3 สำหรับคอลัมน์ AS12A ตัวชะที่ใช้ในการวิเคราะห์แคตไอออน ได้แก่ สารละลายของ H_2SO_4 สำหรับคอลัมน์ CS12A และตัวชะที่ใช้ในการวิเคราะห์โลหะหนัก หรือ ธาตุทรานสิชัน ได้แก่ สารละลายของ PDCA หรือ Oxalic Acid สำหรับคอลัมน์ CS5A

ควรเตรียมสารละลายเป็นสต็อกเมื่อต้องการใช้ให้นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 μm ด้วยชุดกรองตัวทำละลายแบบ suction เช่นเดียวกับการกรองตัวทำละลายในเรื่อง HPLC หลังจากนั้นนำมา sonicate เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วจึงนำไปใช้งาน

1.2 การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าเครื่อง

ตัวอย่างที่ใช้ใน IC ต้องเป็นตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ ลักษณะของตัวอย่างแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1.2.1 ตัวอย่างที่เป็นสารละลายของน้ำและปราศจากมลทินที่จะติดแน่นอยู่ในคอลัมน์ เช่น ตัวอย่างน้ำฝน น้ำดื่ม ก่อนฉีดเข้าเครื่องให้กรองด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.45 μm

1.2.2 ตัวอย่างที่เป็นสารละลายของน้ำแต่มีมลทินที่เป็นสารอินทรีย์ปะปนอยู่ มีโอกาสที่จะทำลายคอลัมน์ในการวิเคราะห์ ให้ใช้ RP cartridge ซึ่งเป็น SPE ชนิด reverse phase C_{18} ทำหน้าที่ดักจับสารมลทินนั้นก่อน แล้วจึงกรองผ่าน syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm อีกครั้งเพื่อกรองจุลินทรีย์ หรือ แบคทีเรียขนาดเล็กที่อาจติดมากับตัวอย่างได้ การวิเคราะห์นี้ได้แก่ การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสีย

1.2.3 ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เช่น พืช และ อาหารต่างๆ ซึ่งมีอินทรีย์สารเป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนมาก ให้ใช้วิธีย่อย (wet digestion) ด้วยกรด หรือ การเผาที่อุณหภูมิสูง (dry ashing) เพื่อทำลายสารประกอบอินทรีย์ เกลือที่เกิดขึ้นนำมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น กรดเจือจาง หรือน้ำปราศจากไอออน (DI water) และปรับ pH ให้เหมาะสม แล้วกรองผ่าน syringe membrane filter ขนาด 0.45 μm ก่อนฉีดเข้าเครื่อง IC การวิเคราะห์วิธีนี้ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในตัวอย่างต่างๆ

1.3 การ run chromatogram

ให้ศึกษารายละเอียดการใช้เครื่องมือ IC DX 500 ในหัวข้อ (2)

(2) วิธีการใช้เครื่อง IC DX 500

แบ่งวิธีการใช้เป็น 2 วิธี คือ

- **วิธีการใช้เครื่องสำหรับการวิเคราะห์แอนไอออน หรือแคตไอออน**

  โดยใช้ suppressed conductivity detector

- **วิธีการใช้เครื่องสำหรับการวิเคราะห์โลหะทรานสิชัน หรือโลหะหนัก**

  โดยใช้ UV detector ร่วมกับ post column reagent

2.1 วิธีการใช้เครื่องสำหรับการวิเคราะห์แอนไอออน หรือแคตไอออน

มีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 วิธีเปิดเครื่อง IC

1. **เสียบปลั๊ก**เครื่อง IC DX 500 และคอมพิวเตอร์ (ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง) เข้ากับ stabilizer แล้วเปิดสวิทซ์ที่เครื่อง stabilizer เมื่อมีเสียงร้องให้กด Reset

2. **ที่ถังไนโตรเจน** (purity 99.99%) ทำดังนี้

   2.1) เปิดวาล์ว 1 ทวนเข็มนาฬิกา ถ้าอ่านค่าความดัน (Psi) น้อยกว่า 100 ควรเปลี่ยนถัง

   2.2) เปิดวาล์ว 2 ทวนเข็มนาฬิกา ให้อ่านค่าความดัน (Psi) อยู่ระหว่าง 80-100 Psi
   (ถ้าตอนปิดถังไม่ได้ปิดวาล์ว 2 ไว้ ก็ไม่ต้องเปิดหรือปรับความดัน)

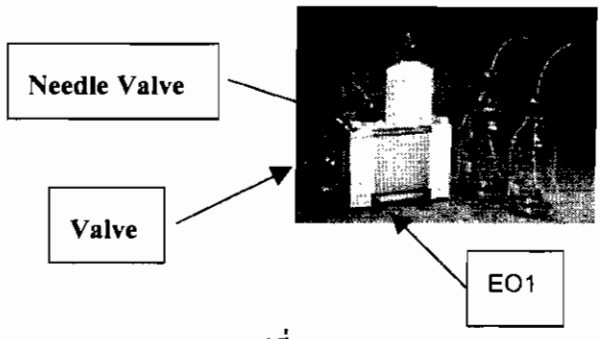
3. **ที่เครื่อง IC DX 500**

3.1) ที่ EO1 เปิด Needle Valve ซึ่งมี 2 ด้าน ด้านขวาสำหรับ line A และ line B และด้านซ้ายสำหรับ line C และ line D

- ด้านขวา เป็นของตัวชะ สำหรับ Anion (line B)
- ด้านซ้าย เป็นของตัวชะ สำหรับ Cation (line D)

ให้หมุน needle valve ทวนเข็มนาฬิกาประมาณ 3-4 รอบ

(line ที่ใช้สำหรับตัวชะเปลี่ยนแปลงได้ แต่การใช้วิธีกำหนดให้แน่นอน จะทำให้สะดวกมากกว่า ไม่ต้องล้าง line หลายๆ ครั้ง)

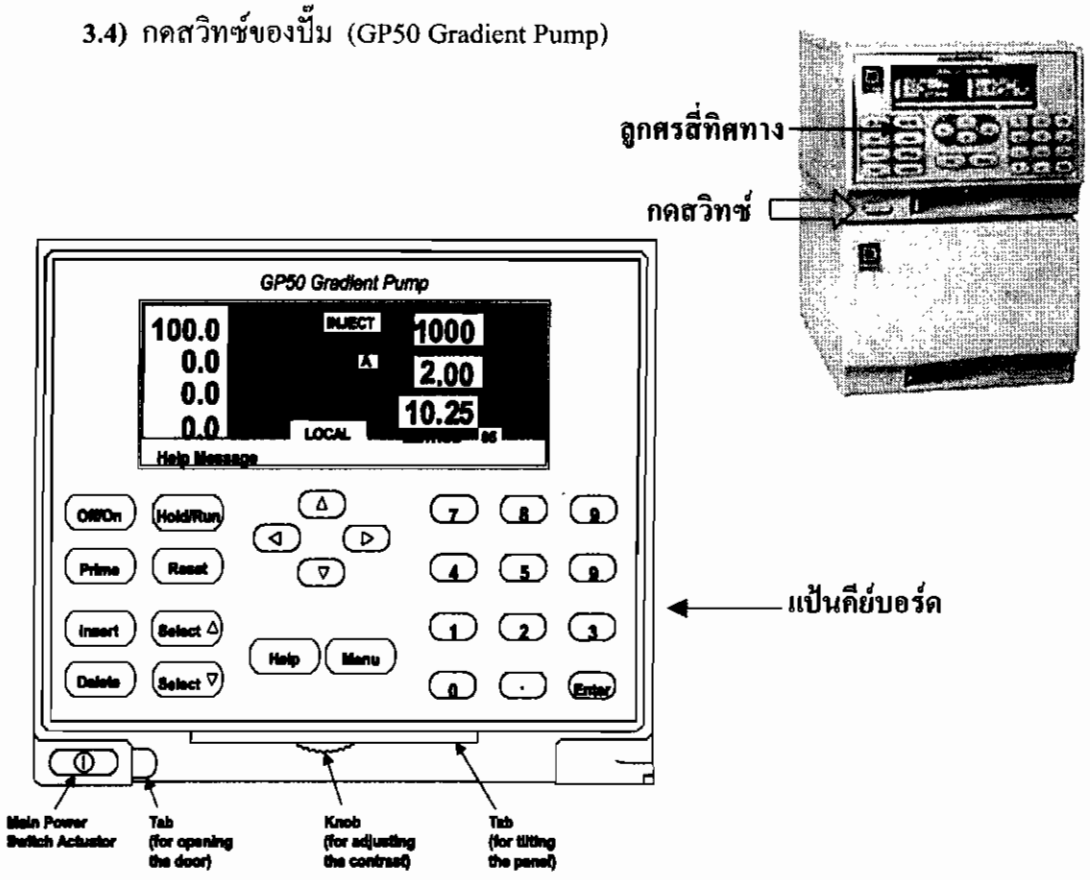


รูปที่ 5.2 EO 1

3.2) ที่วาล์วด้านหน้าของเครื่อง EO1 ทำการเปิด โดยดึงปุ่มออกมาแล้วหมุนตามเข็มนาฬิกาจนได้ตัวเลขประมาณ 5 psi ถ้าหมุนทวนเข็มนาฬิกาค่าตัวเลขจะลดลง

3.3) เปิดฝาขวดตัวชะ เพื่อเช็คดูว่ามีแก๊สเข้ามาหรือไม่ เมื่อได้ยินเสียงจากแรงดันของแก๊สแล้ว จึงปิดฝาขวดตัวชะ

3.4) กดสวิทซ์ของปั๊ม (GP50 Gradient Pump)



3.5 กดสวิทซ์ของตัวตรวจวัดที่ต้องการใช้ ในที่นี้คือ CD20 Conductivity Detector

4. ที่เครื่องคอมพิวเตอร์

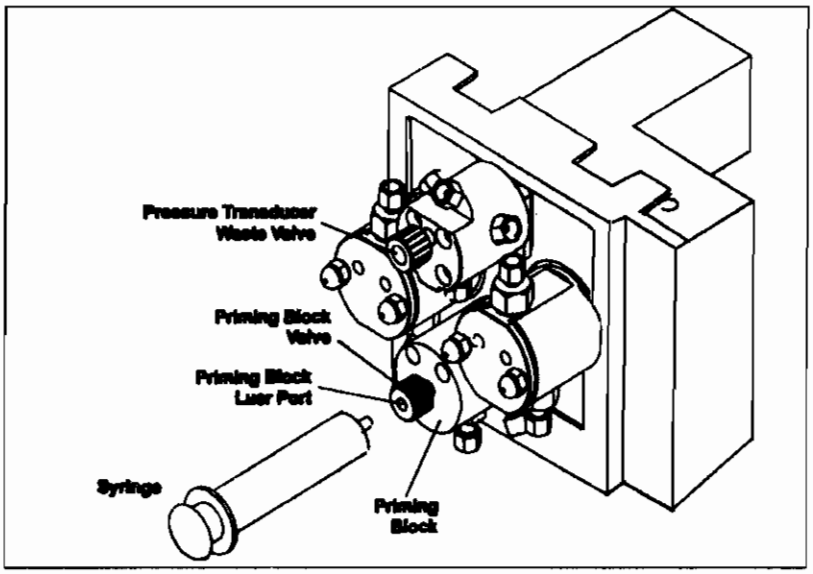
- เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ (CPU, monitor, printer)

2.1.2 การไล่ฟองอากาศตามท่อส่งตัวทำละลาย

5. ที่หน้าจอของปั๊มเลื่อนลูกศรสี่ทิศทาง ◀ ▲ ▶ ▼ ที่แป้นคีย์บอร์ด ให้ cursor ชี้ที่ line B แล้ว พิมพ์ค่าเป็น 100% กด enter (line อื่นจะแสดง 0%)

☞☞ <u>**หมายเหตุ**</u> ถ้าต่อขวดตัวชะไว้กับ line อื่นๆ ต้องเลือก line ให้ตรงกับที่ต่อไว้ ☜☜

6. เปิดฝาเครื่องปั๊ม **(อยู่ข้างล่างของเครื่อง GP50 Gradient Pump)** สังเกตว่าที่เครื่องปั๊มมีหัวสีดำ 4 หัว ที่หัวชุดล่าง **(Priming Block)** ให้หมุนปุ่มคลายเกลียวทวนเข็มนาฬิกา ½ - 1 รอบ แล้วเสียบ syringe ขนาด 10 ml เข้าที่รูของปุ่มเกลียวที่หมุน กดปุ่ม on ที่แป้นคีย์บอร์ดของปั๊ม ขณะนี้ตัวชะจะไหลออกมาเข้า syringe เมื่อเกือบเต็มให้กดปุ่ม off ดึง syringe ออกเทตัวชะทิ้ง แล้วทำซ้ำ 2-3 รอบ เพื่อไล่ตัวชะเดิมที่ค้างในระบบและกำจัดฟองอากาศที่เกิดจากการเปลี่ยนขวดตัวชะใหม่



7. ปิดปุ่ม **Priming Block** ให้แน่น โดยหมุนกลับตามเข็มนาฬิกา อย่าแน่นมากจนคลายไม่ออกในคราวหลัง

8. ที่ปุ่ม **Preesure Transducer Waste Valve** ให้หมุนปุ่มคลายเกลียว<u>ทวนเข็มนาฬิกา</u> 1 รอบ

9. กดปุ่ม **PRIME** ที่คีย์บอร์ดของปั๊ม 1 ครั้ง เพื่อทำการไล่ฟองอากาศในท่อที่ออกจากขวดตัวชะ จากนั้นตรวจสอบดูจนแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นทำการกดปุ่ม **PRIME** อีก 1 ครั้งเพื่อปิด แล้วหมุนปุ่ม **Preesure Transducer Waste Valve** <u>ตามเข็มนาฬิกา</u> จนตึงมือ (การกดปุ่ม **PRIME on/off** สามารถสั่งงานได้ที่เครื่องคอมพิวเตอร์ ถ้าเครื่องอยู่ในระบบ **<u>Remote</u>**)

หมายเหตุ

***** ถ้าหากคลายปุ่มไม่เพียงพอจะมีเสียงดังเตือนเมื่อกดปุ่ม PRIME ให้ทำการกด off ที่คีย์บอร์ด จากนั้นหมุนปุ่ม Preesure Transducer Waste Valve ทวนเข็มนาฬิกาเพิ่มอีก 1-2 รอบ แล้วกดปุ่ม PRIME ที่คีย์บอร์ด อีก 1 ครั้ง *****

10. จากนั้นทำการปิดโดยให้หมุนปุ่ม **Preesure Transducer Waste Valve** ตามเข็มนาฬิกาจนตึงมือ อย่าหมุนแน่นมากเกินไป แต่ถ้าหากหมุนไม่แน่นพอจะมีหยดน้ำไหลออกมา ตรวจสอบดูอีกครั้งว่าค่าความดันที่ EO1 ยังคงอยู่ที่ 5 psi หรือไม่ ถ้าไม่ได้ให้ปรับใหม่

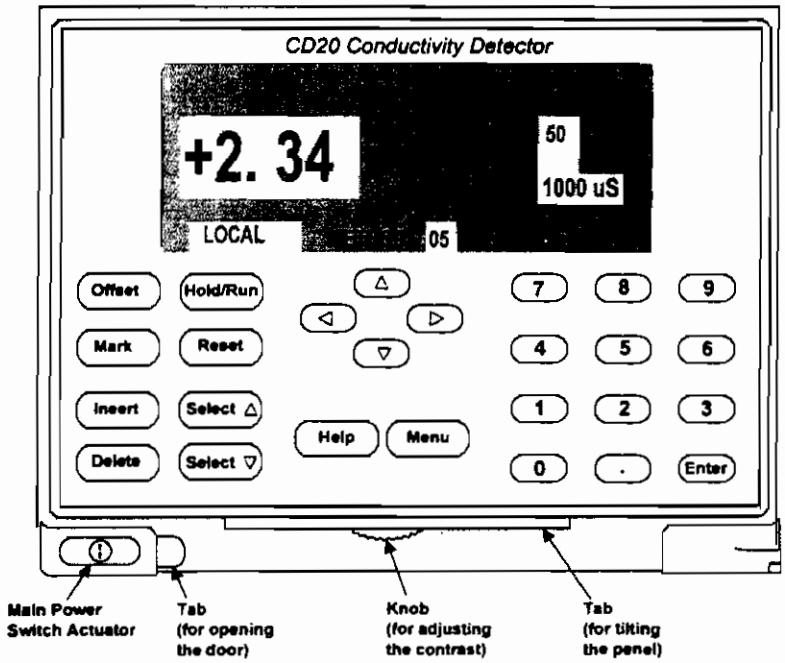
11. เมื่อทำการเช็คเรียบร้อยแล้ว ให้ปิดฝาเครื่องปั๊ม พร้อมที่จะเริ่มทำการวิเคราะห์ต่อไป

ข้อสังเกต

***** ค่า psi จะคงที่ประมาณ 1800-1900 psi เมื่อมี flow rate 1 ml/min ค่าที่ต่างออกไปจากนี้ แสดงว่ามีฟองอากาศอยู่ในท่อของ ตัวชะ ต้องปิดปั๊มและ ทำการ PRIME ใหม่อีกครั้ง *****

12. <u>ที่ตัวตรวจวัด (CD 20 Conductivity Detector)</u>

ที่จอภาพของเครื่อง CD20 Conductivity Detector ใช้ลูกศรสี่ทิศทางเลื่อน cursor ไปที่ SRS กดปุ่ม Select เพื่อตั้งค่ากระแส สำหรับ **Anion** ใช้ค่า 50 mA และ **Cation** ใช้ค่า 100 mA การเลือกค่าทำได้โดยกดปุ่ม Select ไปเรื่อยๆ จนได้ค่าตามต้องการแล้วกด Enter



ข้อสังเกต

***** ที่หน้าจอของ CD20 ที่ Total Conductivity ควรมีค่า 12- 16 µS ค่าที่ผิดไปจากนี้แสดงว่า ตัวชะ ที่ใช้นั้นไม่ถูกต้อง *****

13. ที่เครื่องคอมพิวเตอร์

13.1) เริ่มที่ Start เลือก Setup ไปที่ Program เลือก Diodex PeakNet และ click ที่ MainMenu 1 ครั้ง

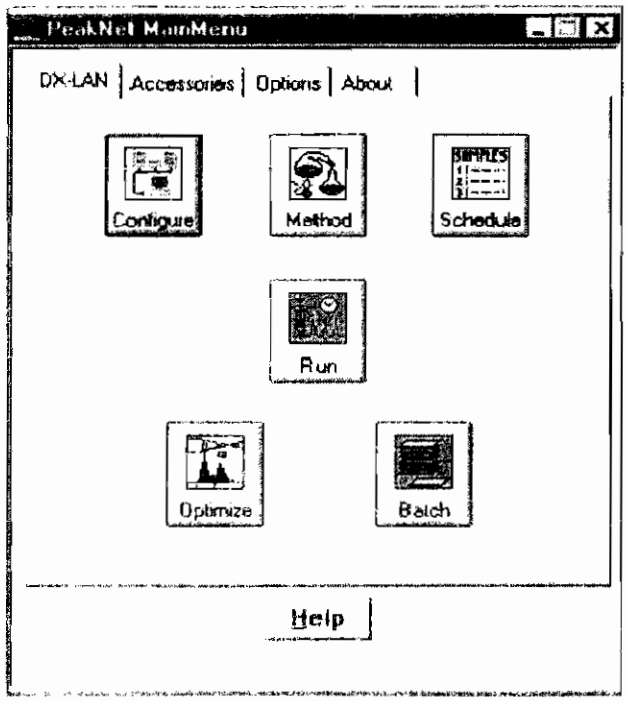
13.2) ที่หน้าจอจะปรากฏ PeakNet MainMenu

(ควรสร้างทางลัดที่หน้าจอเครื่องคอมพิวเตอร์เครื่องของท่านๆ PeakNet MainMenu ให้เลย ในกรณีที่เครื่องไม่มี PeakNet MainMenu จึงทำข้อ 13.1 - 13.2)

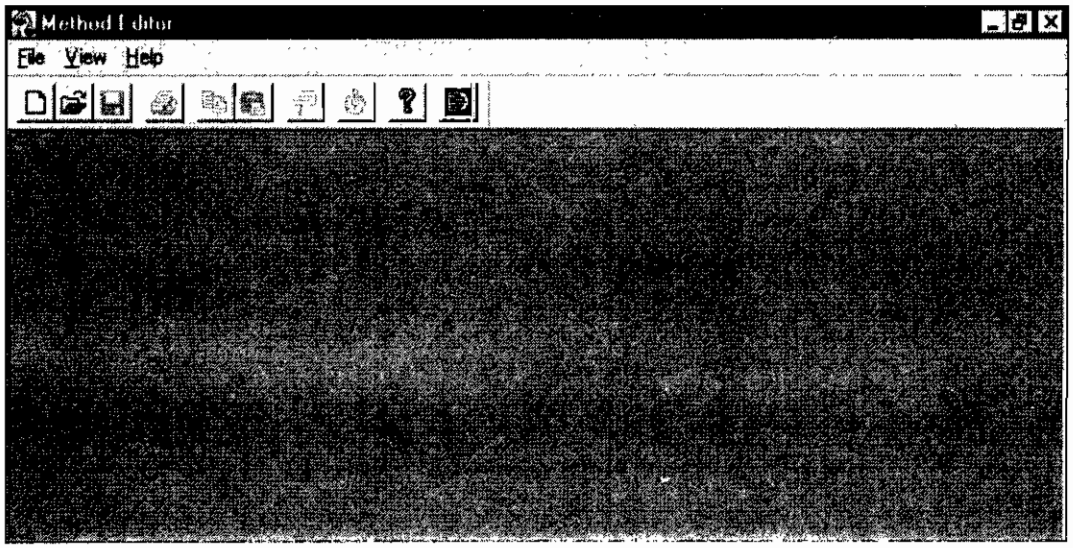
2.1.3 การสร้าง New Method เมื่อต้องการเริ่มวิเคราะห์แอมโมเนียและแคตไอออน

※ ที่หน้าจอ PeakNet MainMenu จะมี Icons 6 รูปคือ คือ

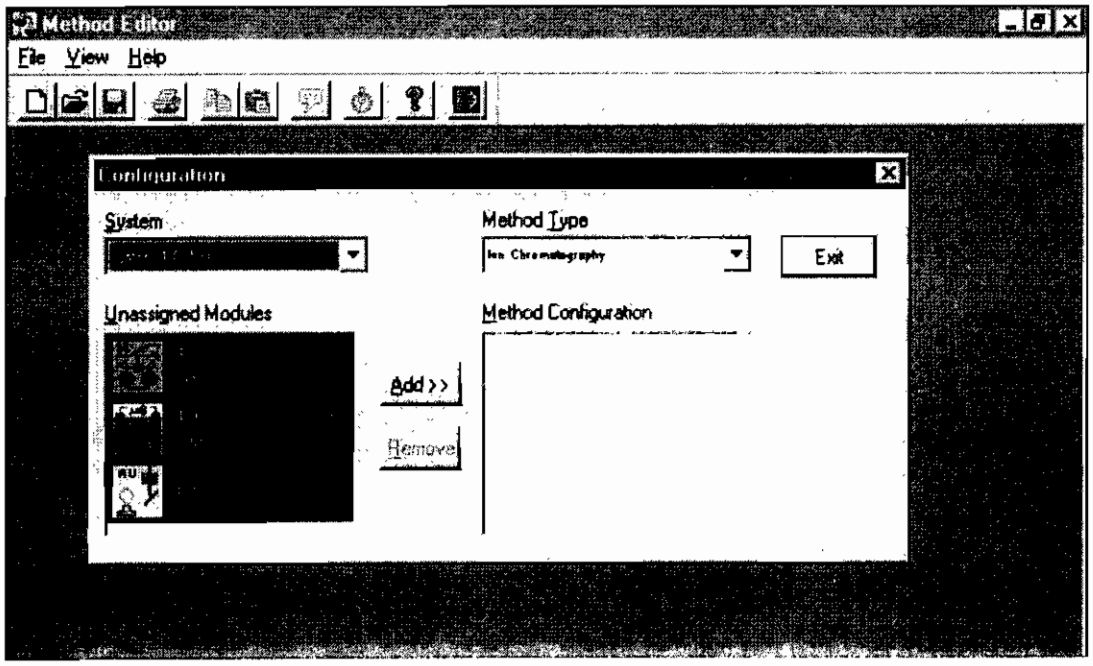
Configure, Method, Schedule, Run, Optimize และ Batch ดังรูป



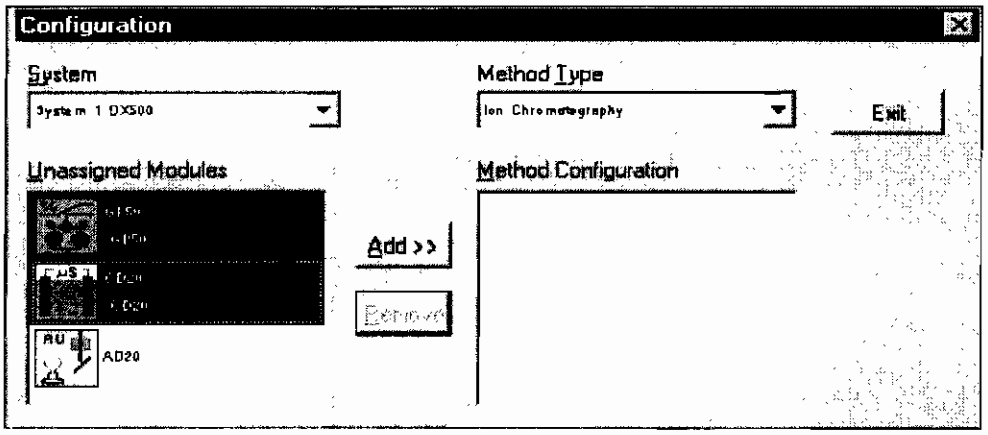
1. เลือก click ที่ Icon ***Method*** จะได้หน้าจอเป็น **Method Editor**



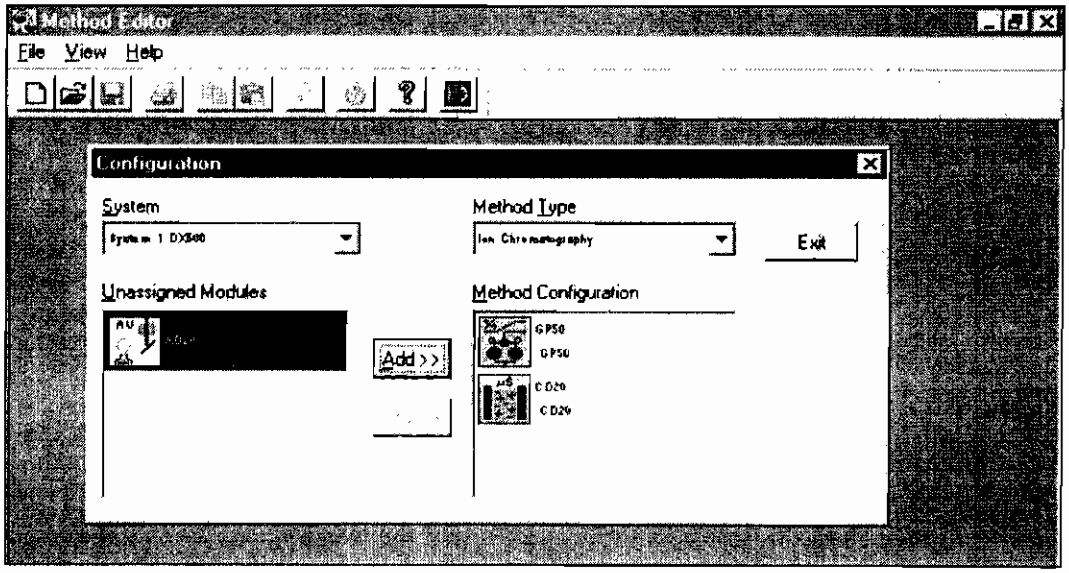
2. click ที่เมนู ***File*** เลือก **New** หน้าจอจะปรากฏ **Configuration** ที่ **Unassigned Modules** มีสีน้ำเงินเข้ม ให้ click เมาส์ที่ Icon ของปั๊ม (GP50) ตัวตรวจวัด CD20 และ ตัวตรวจวัด AD20 ให้สีน้ำเงินเข้มหายไป



3. จากนั้นใช้เมาส์ click เลือก Icon ***GP 50*** และ ***CD 20*** (ตัวตรวจวัดที่ใช้วิเคราะห์) จะได้สีน้ำเงินเข้ม ซึ่งแสดงการเลือก Icon ที่ต้องการ config

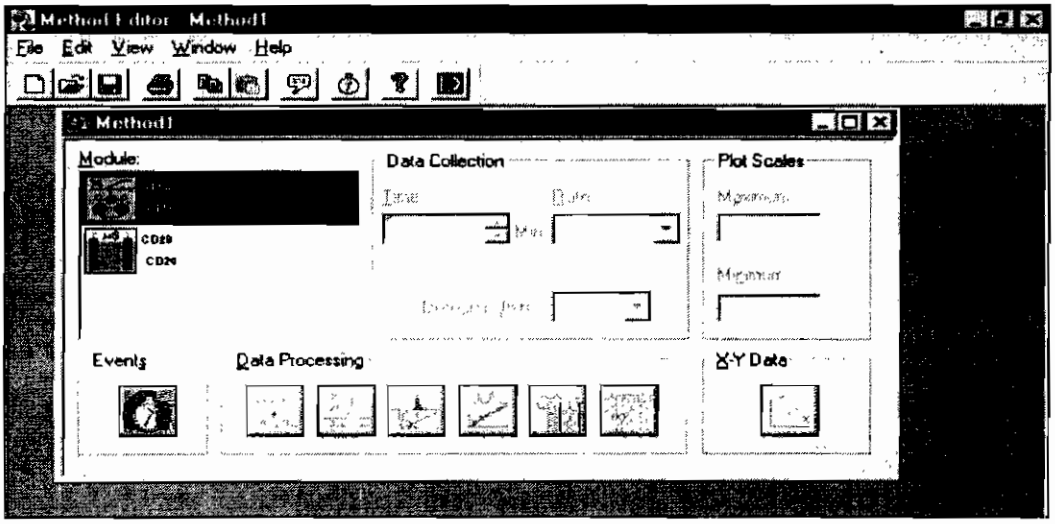


4. จากนั้นใช้เมาส์ click ที่ Add >> จะปรากฏ หน้าจอ Method Configuration มี Icon ***GP 50*** และ Icon ***CD20***

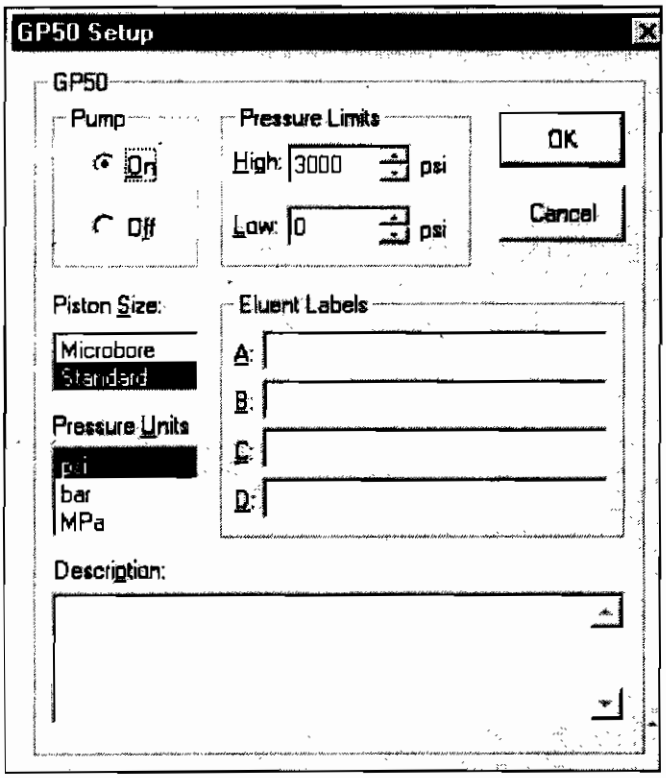


5. ที่ **Method Type** ใช้เมาส์ click ที่ drop drown list เลือก **Ion Chromatography** แล้วใช้เมาส์ **กด Exit**

6. จอปรากฏ **Method1** ทำการเลือกปั๊มก่อน โดยใช้เมาส์ click ที่ Icon ***GP50*** ให้ active



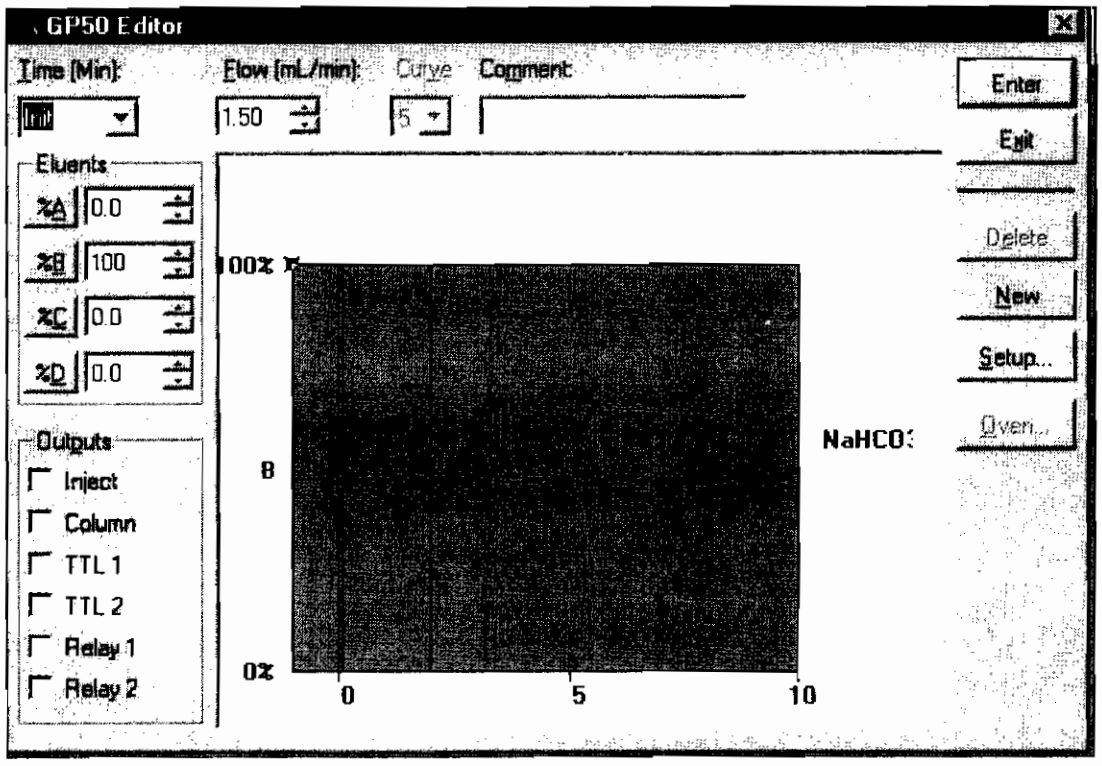
7. แล้ว click ที่ **Event** ให้ active จะได้ หน้าจอเป็น GP50 Setup



8. ที่ GP50 Setup ให้ตั้งค่าต่างๆ ดังนี้

- ที่ Pump เลือก On
- ที่ Pressure Limits High เลือก 3000 psi (สูงสุดไม่เกิน 5000 psi) ,
  Low เลือก 0 psi
- ที่ Piston Size เลือก standard
- ที่ Pressure Unit เลือก psi
- ที่ Elent Labels ใช้เมาส์ click ที่ B หรือ line อื่นๆ ตามที่ใช้แล้วพิมพ์ชื่อตัวชะ ที่จะใช้ในการทดลอง ในที่นี่ AS12A ใช้ : 2.7 mM Na_2CO_3 + 0.3 mM Na HCO_3 สำหรับวิเคราะห์ Anion และ CS12A ใช้ : 22 mN H_2SO_4 สำหรับวิเคราะห์ Cation
- ที่ Description ให้พิมพ์รายละเอียดเกี่ยวกับการวิเคราะห์ตามต้องการ **กด OK**

9. ที่จอจะปรากฏ GP50 Editor เพื่อจะกำหนดเวลาในการที่ปั๊มจะทำหน้าที่ต่างๆ ดังนี้



9.1) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก init ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.5
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก B (Anion) ที่ B ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง **กด Enter**
ในจอแสดงค่า จะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง
(ในกรณีวิเคราะห์ cation ให้เลือก line D ตามที่ใช้)

9.2) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก 0.00 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.5
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก B (Anion) ที่ Bให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง **กด Enter**
ในจอแสดงค่าจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง

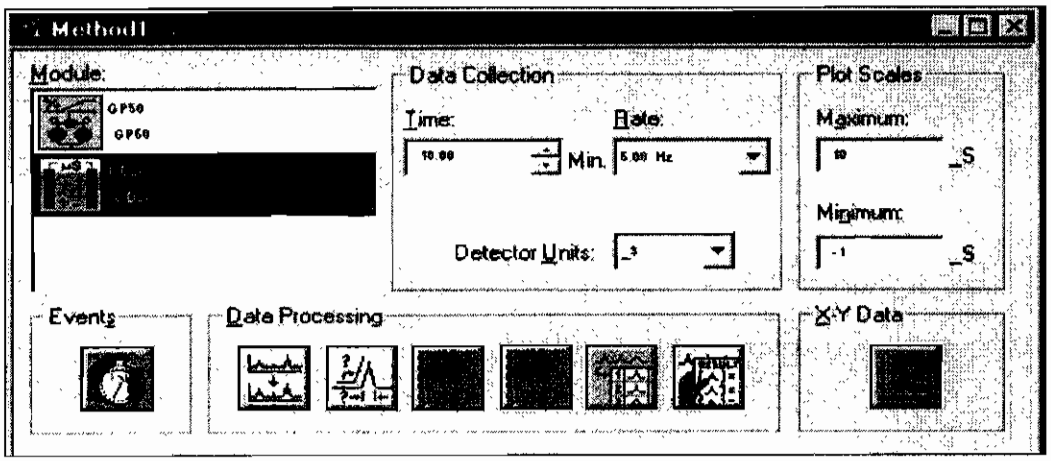
9.3) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก 0.1 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.5
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก B (Anion) ที่ B ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง
ใช้เมาส์ชี้ที่ Curve เลือก 5 (mixing profile ของ ตัวชะ)
ที่ช่อง Outputs ให้ใส่เครื่องหมายถูกหน้า Inject **กด Enter**
ในจอภาพจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง
(เมื่อใช้คำสั่ง run จะใช้เวลา 0.1 นาที เครื่องจึงจะเลื่อนจาก Load Position มาที่ Inject Position)

9.4) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) พิมพ์ 2.0 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.5
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก B (Anion) ที่ B ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง
ใช้เมาส์ชี้ที่ Curve เลือก 5 (mixing profile ของ ตัวชะ)
ที่ช่อง Outputs แล้วเอาเครื่องหมายถูก หน้า Inject ออก **กด Enter**
ในจอภาพจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง

***** **กด EXIT** เครื่องคอมพิวเตอร์จะถามว่า SAVE หรือไม่ ให้กด **YES** *****

10. หน้าจอขึ้น **Method1**

เลือกตัวตรวจวัดโดยใช้เมาส์ click ที่ CD20 จะปรากฏหน้าจอดังรูป



ที่ Data Collection

10.1) ◈ ที่ Time พิมพ์ค่า 15 (เวลาที่ใช้ในการ run สารตัวอย่าง) สำหรับ Anion

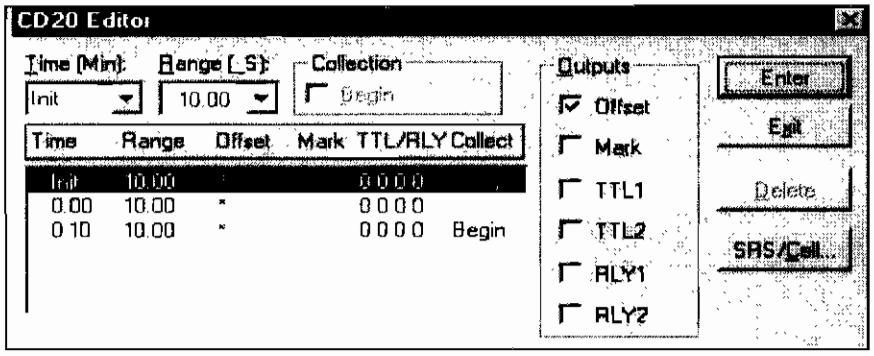
◈ ใช้เมาส์ชี้ที่ Range เลือก 5.00 Hz

◈ ใช้เมาส์ชี้ที่ Detector Unit เลือก µs ในที่นี้จะเป็น (s)

◈ ที่ Plot Scale : Maximum เลือก 10 µs และ

: Minimum เลือก –2 µs

◈ ใช้เมาส์ click ที่ Icon ***Event*** จอปรากฏ CD20 Editor



◈ ใช้เมาส์ชี้ที่ Output click ที่หน้า Offset เพื่อปรับค่า Conductivity ให้เป็นศูนย์

10.2) ⮚ ที่ Time เลือก init

⮚ ที่ Range เลือก 10 **กด Enter**

(สังเกตว่ามีเครื่องหมาย * อยู่ที่บรรทัดนั้น)

10.3) ⮚ ที่ Time เลือก 0

⮚ ที่ Range เลือก 10

⮚ ที่ Collection เอาเครื่องหมายหน้า Begin ออก แล้วใส่เครื่องหมายที่หน้า Offset

กด Enter (สังเกตว่ามีเครื่องหมาย * อยู่ที่บรรทัดนั้น)

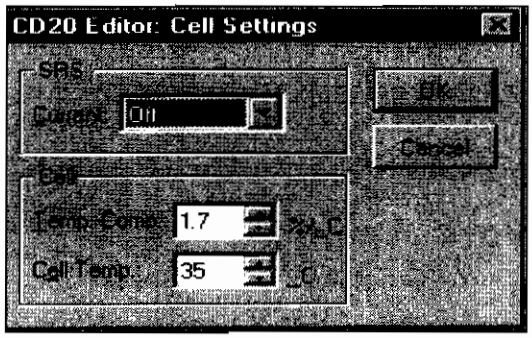
10.4) ⮚ ที่ Time พิมพ์ 0.10 (ต้องเลือกให้ตรงกับค่าที่ตั้งไว้ที่ปั๊ม)

⮚ ที่ Range เลือก 10

⮚ ที่ Collection เลือก Begin ที่ Output เลือก Offset **กด Enter**

10.5) ที่ด้านขวาของจอ ให้ใช้เมาส์ click ที่ **SRS/ Cell** ที่จอปรากฏ

CD20 editor:Cell Setting



⮚ ที่ current ถ้าเป็น **Anion** เลือก 50 mA ส่วน **Cation** เลือก 100 mA

⮚ ค่าอื่นๆ ที่แสดงไว้ ไม่ต้องเปลี่ยนแปลง **กด OK**

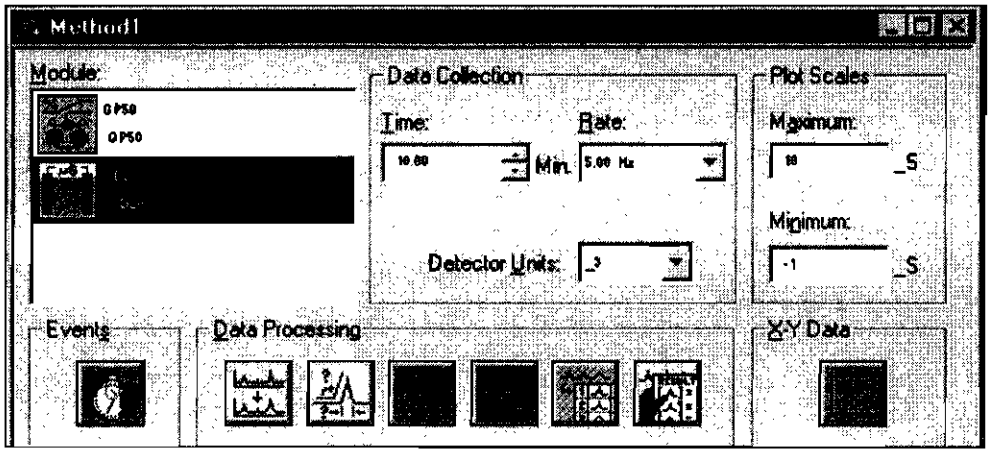
***** **เลือก EXIT** เครื่องคอมพิวเตอร์ถามว่า SAVE หรือไม่ ตอบ **YES** *****

※ จอจะกลับมาปรากฏหน้า Method Editor (Method1)

※ ที่จอด้านล่างจะปรากฏ Icons 6 ชนิด ที่ Data Processing ได้แก่

Smooting Parameter, Integration Parameter, Data Event,

Calibration Parameter, Component table, Report Option



ที่ Data Processing ใช้เมาส์ click ที่ Icons

(จากข้อ 10 - 12 ไม่ต้องทำก็ได้ ให้ข้ามไปทำที่ข้อ 13 ได้เลย)

11. เลือกรูปที่ 1 (Smoothing Parameters)

จอจะขึ้น Smoothing Parameters ถ้าไม่มีการแก้ไข **กด OK**

12. เลือกรูปที่ 2 (Integration Parameters)

จอจะขึ้น Integration Parameter ที่ Peak detection Algorithm เลือก Standard

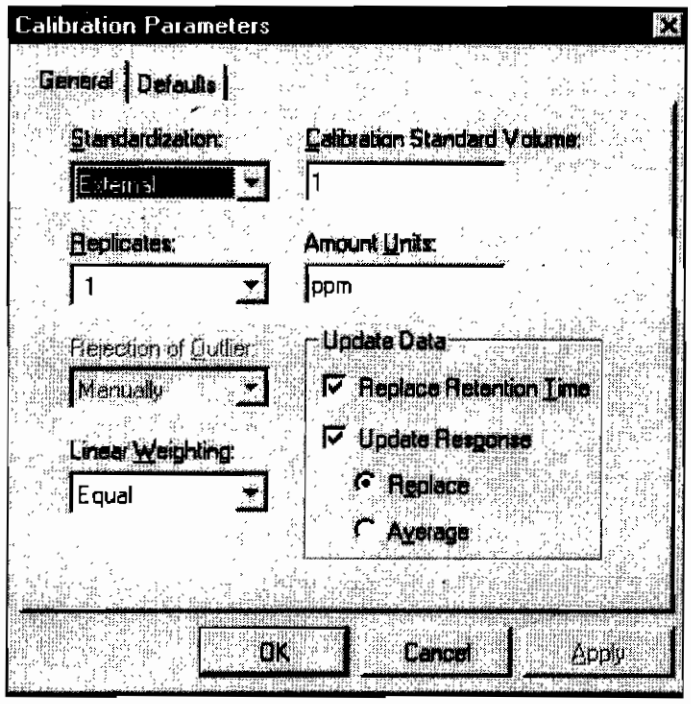
ส่วนค่าอื่นๆที่ปรากฏที่จอไม่ต้องทำการเปลี่ยนแปลง **กด OK**

13. เลือกรูปที่ 3 (Data Events)

จอจะขึ้น Data Events ถ้าไม่มีการแก้ไข **เลือก EXIT**

14. เลือกรูปที่ 4 (Calibration Parameters)

จอจะปรากฏ Calibration Parameters



เลือก General

☺ ที่ Standardization เลือก External

☺ ที่ Replicates เลือก 1

※ ในกรณีที่ต้องการฉีดสารละลายมาตรฐานมากกว่า 1 ครั้ง ที่ Update Data ให้ click ที่ Average

☺ ที่ Replicates ให้ใส่ตัวเลขแสดงจำนวนครั้งที่ต้องการ **กด OK**

☺ ที่ Calibration Standard Volume เลือก 1

☺ ที่ Amount Units พิมพ์ ppm

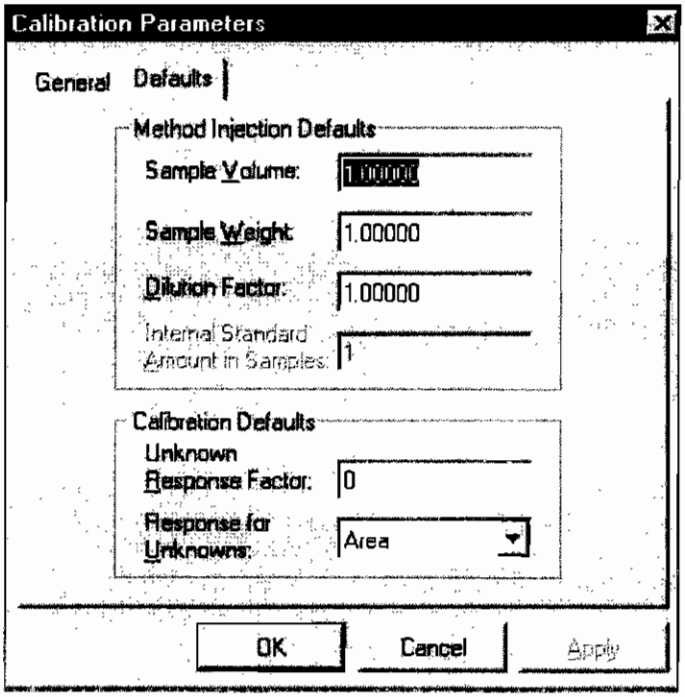
☺ ที่ Update Data ขีดเครื่องหมายถูก ทั้ง 2 ตำแหน่ง

(Replace Retention time และ Update Response)

และ click ที่ Replace

☺ ที่ Linear Weighting เลือก Equal

เลือก Defaults



☺ ที่ Method Injection Defaults ใส่ค่าเป็น 1 ทุกบรรทัด

☺ ที่ Calibration Defaults

Response Factor = 0

Response for Unknown = Area **กด OK**

※ จอจะปรากฏ Method Editor (Method1)

15. ❖ ที่ Data Processing เลือกรูปที่ 5 (Component tables)

❖ ที่ Component table มีเฉพาะที่ว่าง ปล่อยไว้ก่อนให้กรอกข้อมูล หลังจาก run สารแล้ว **กด OK**

✳ จอจะปรากฏ Method Editor (Method1)

16. ✹ ที่ Data Processing เลือกรูปที่ 6 (Report Options)

✹ ที่ Report Option ถ้าหากว่าไม่ต้องการให้เครื่องพิมพ์หลัง run เสร็จ ให้เอาเครื่องหมายถูกออกหมดทุกช่อง **กด OK**

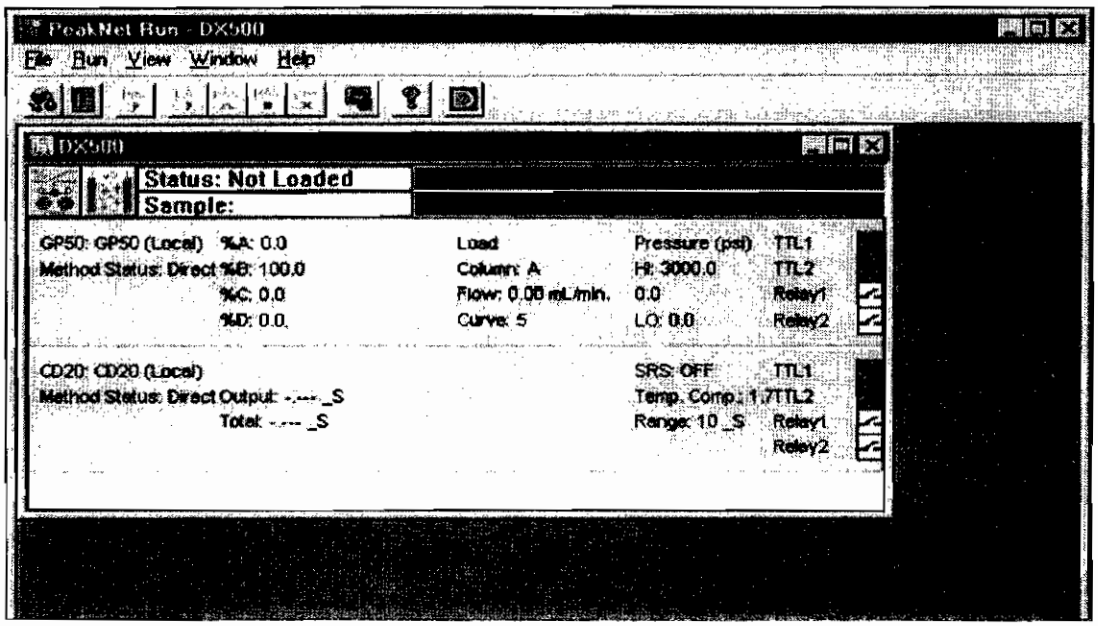
17. ไปที่ file เลือก save as ใส่ชื่อ method ตามต้องการ (ควรมีระบบการใส่ชื่อ method เพื่อกันการหลงลืม เช่น ถ้าเป็น method ของ anion ให้ใช้ A นำหน้าแล้วตามด้วย วัน เดือน ปี) กด save

18. ไปที่ file เลือก exit จะกลับไปสู่หน้าจอ PeakNet MainMenu

2.1.4 เริ่มทำการฉีดสารละลาย

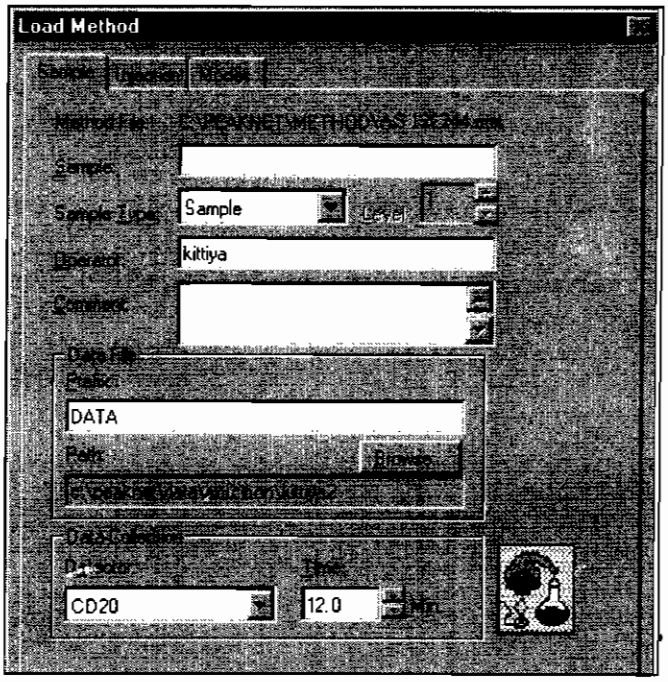
ที่ PeakNet MainMenu

1. ให้เลือก Icon ***Run*** จะปรากฏหน้าจอ PeakNet Run DX 500

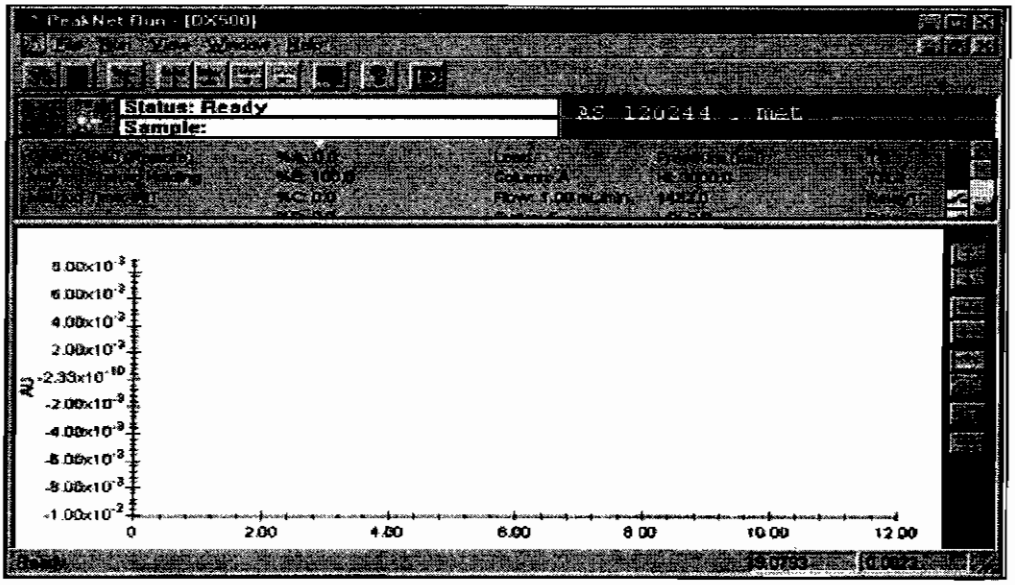


ที่เมนู ***File*** เลือก **Load Method** และเลือก Method ที่สร้างไว้ (?????)

- เลือก **Open** จะปรากฏหน้า **Load Method**



- กด **Enter** ที่คีย์บอร์ดของเครื่องคอมพิวเตอร์
- จอจะปรากฏกราฟ ตอนนี้อุปกรณ์ทุกอย่างจะถูกสั่งงานโดยคอมพิวเตอร์



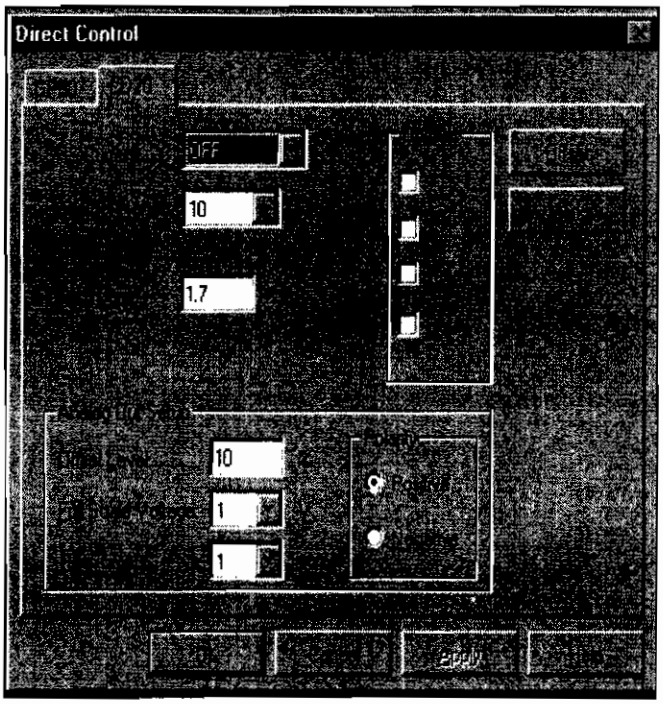
*** ให้ข้ามไปทำต่อข้อ 3

2. ในกรณีที่ยังไม่ load method แต่ต้องการดู base line ก่อนให้ทำดังนี้

- click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Direct Control** จอปรากฏ Direct Control
- ให้ click ที่ GP50 จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับ GP50 พิมพ์ค่า flow rate กด pump on
- จากนั้น click ที่ CD20 จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวตรวจวัด ที่ SRS Current เลือก 50

สำหรับ Anion และเลือก 100 สำหรับ Cation กด Offset ค่าบนตัวตรวจวัด (CD20) เป็นศูนย์

กด OK



3. ใช้เมาส์ click เมนู ***Run*** เลือก **Baseline** ถ้า Baseline ไม่นิ่งก็ให้รอสักระยะหนึ่ง (10 – 30 นาที)

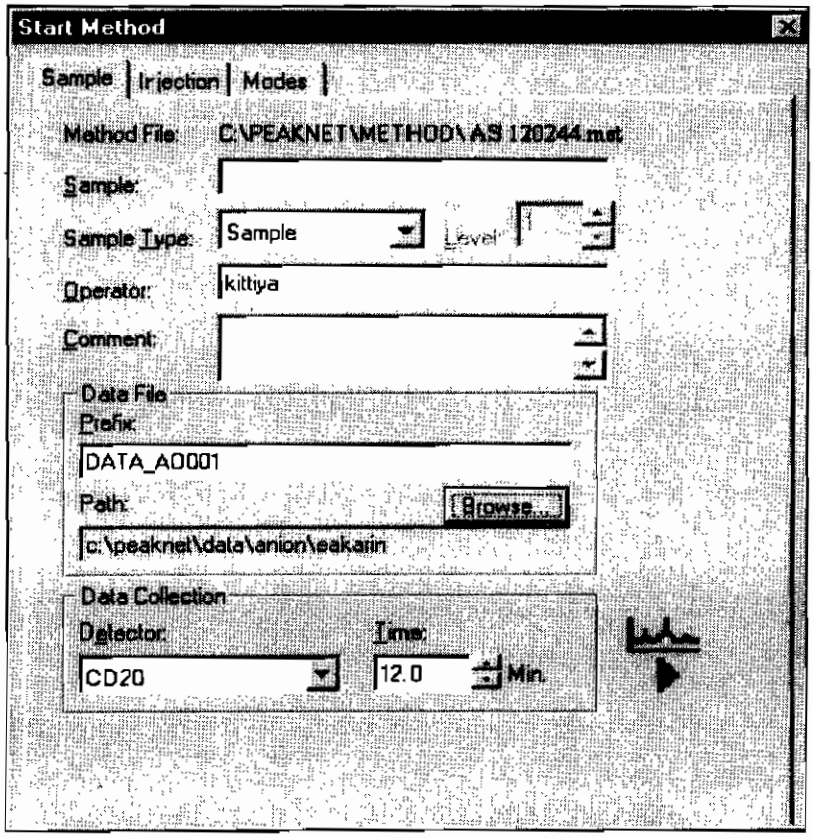
หมายเหตุ

***** การตรวจดูความเรียบของเส้น baseline โดยเลือก Icon Scale (ตัวล่างสุดขวามือ) ที่ scale แก้ค่า minimum เป็น –0.2 และ Maximum เป็น 0.2 โดยสังเกตจากสเกลตอนแรก**

กด OK

4. นำสายยางที่ออกจาก inject port จุ่มในสารละลายที่ต้องการ run ใช้ syringe ดูดสารละลายจากสายยางทางเข้า loop ประมาณ 2 ml (ใช้ระบบดูดสารละลายย้อนกลับในการเติมสารตัวอย่างเข้าใน sample loop)

5. ☛ click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Start** จะปรากฏหน้า **Start Method**



☛ ที่ **Sample** พิมพ์ชื่อ **Sample**

☛ ที่ **Operator** พิมพ์ **operation name**

(โดยปกติจะ run standard ที่มีความเข้มข้นสูงสุดในชุดนั้นก่อน เพื่อตรวจสอบชื่อและตำแหน่งของพีกต่างๆ)

☛ ที่ **Sample Type** เลือก **Sample**

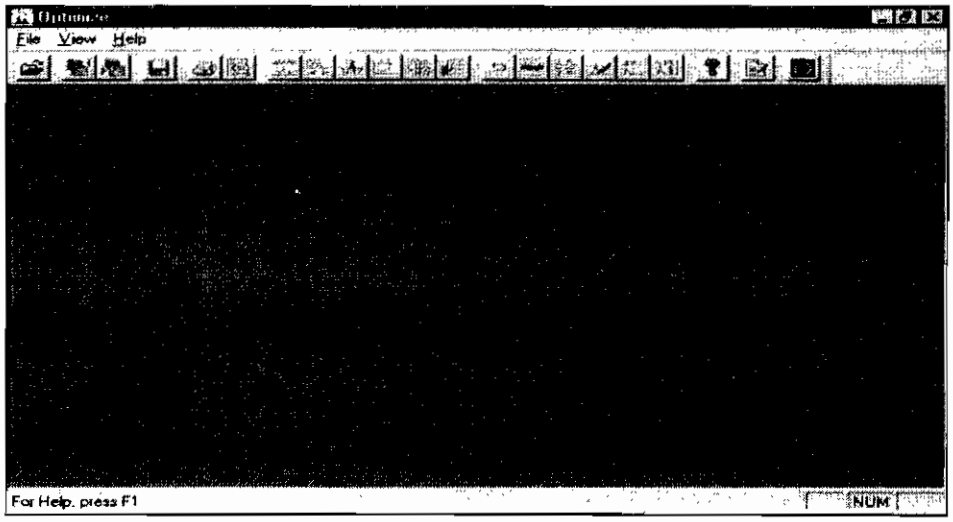
6. ที่ **Browse** เลือก directory และ subdirectory หรือ create ใหม่ สำหรับเป็นที่เก็บข้อมูลที่เราต้องการไม่ให้ปะปนกับผู้อื่น **กด Enter**

7. เมื่อ run สารตัวแรกเสร็จ click ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit** แล้ว ทำการ Integrate และ ใส่ชื่อพีกก่อน (name peak)

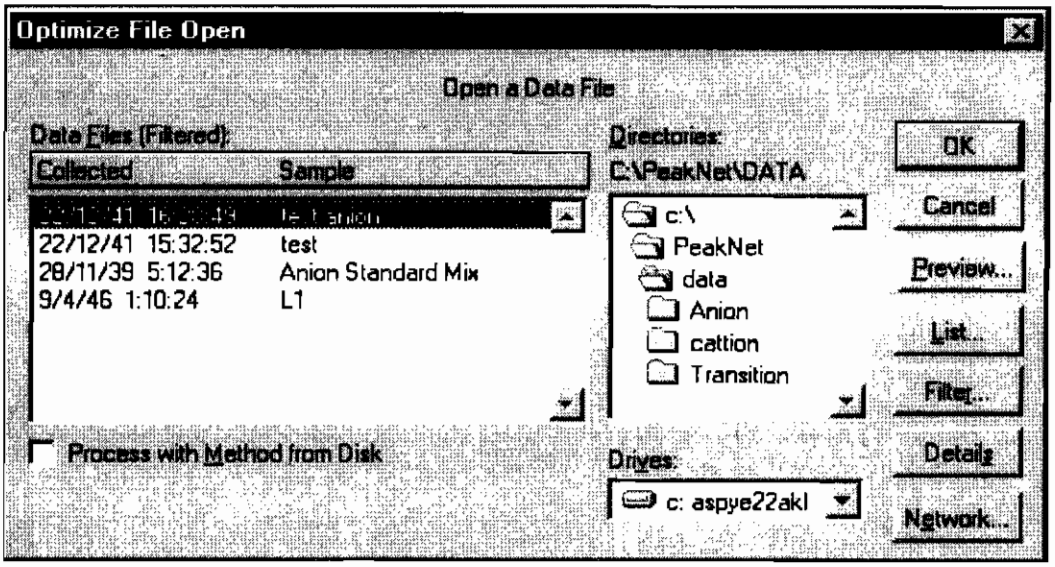
2.1.5 การ Integrate และ Label ชื่อพีก

1. ที่หน้า **PeakNet Main Menu** เลือก Icon ***Optimize***

จะได้หน้าจอดังรูป



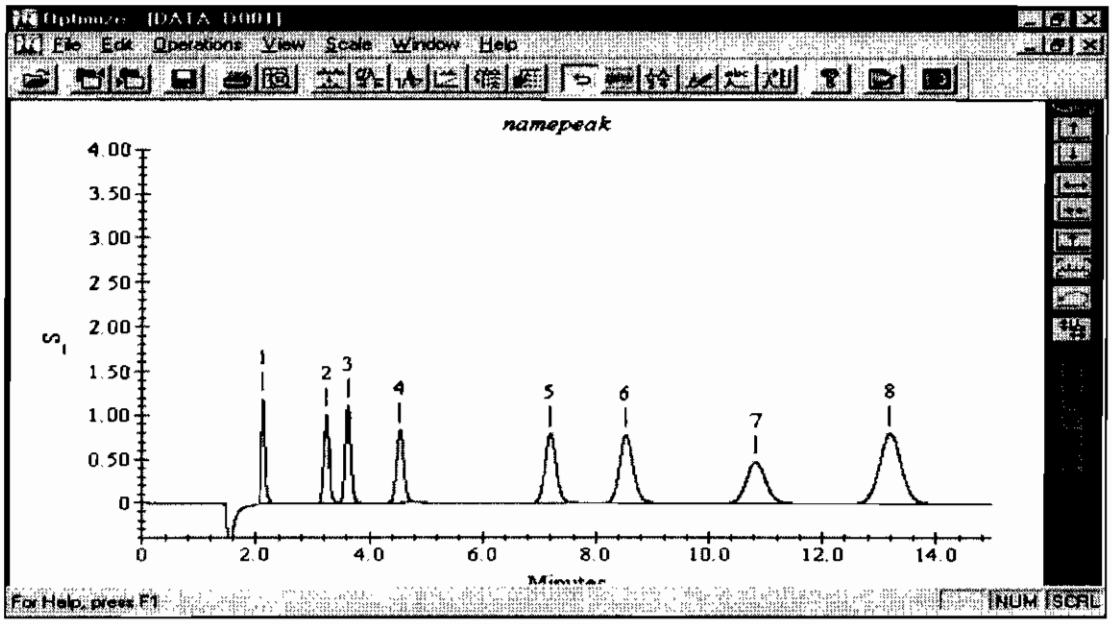
ทำการเลือกเมนู ***File*** โดยเลือก **Open Data File** จะได้หน้าจอ **Optimize File Open**



ที่ **Directories** เลือก **Anion** หรือ **Cation** ตามต้องการ โดย double click

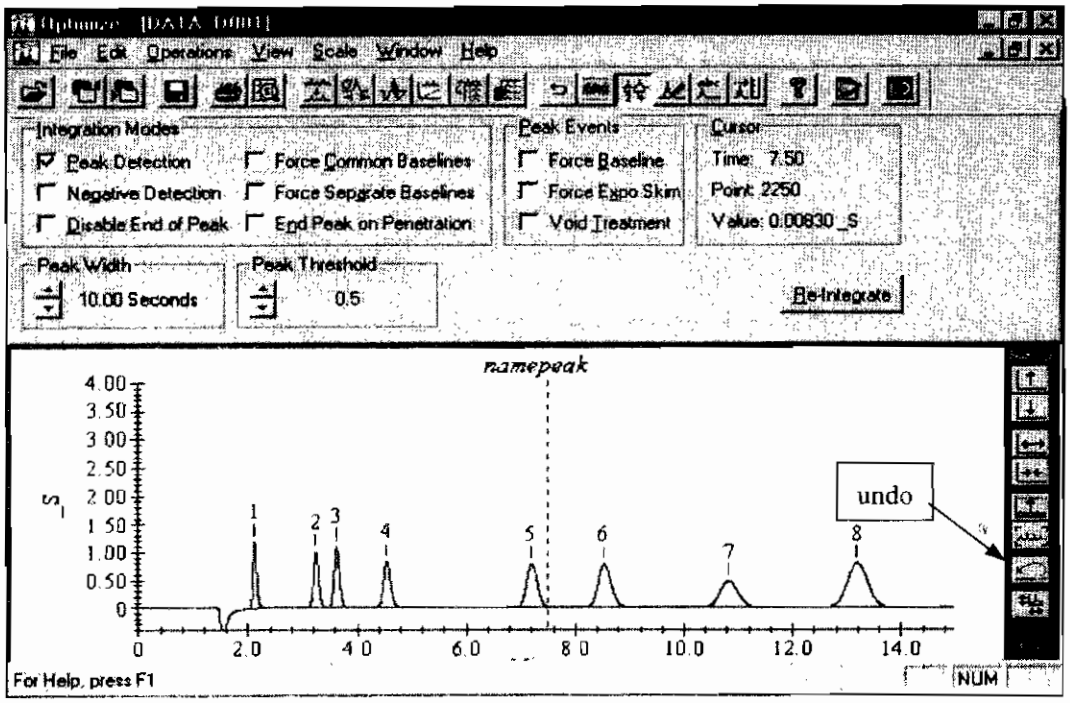
เลือก folder ที่เก็บข้อมูล แล้วกด double click

ที่จอจะแสดง Data Files โดยทำการเลือก file ตามต้องการ (ชุดที่เพิ่ง run เสร็จ) กด OK จะกลับคืนสู่หน้าต่าง Optimize (มีชื่อ File และ chromatogram ที่ต้องการอยู่)



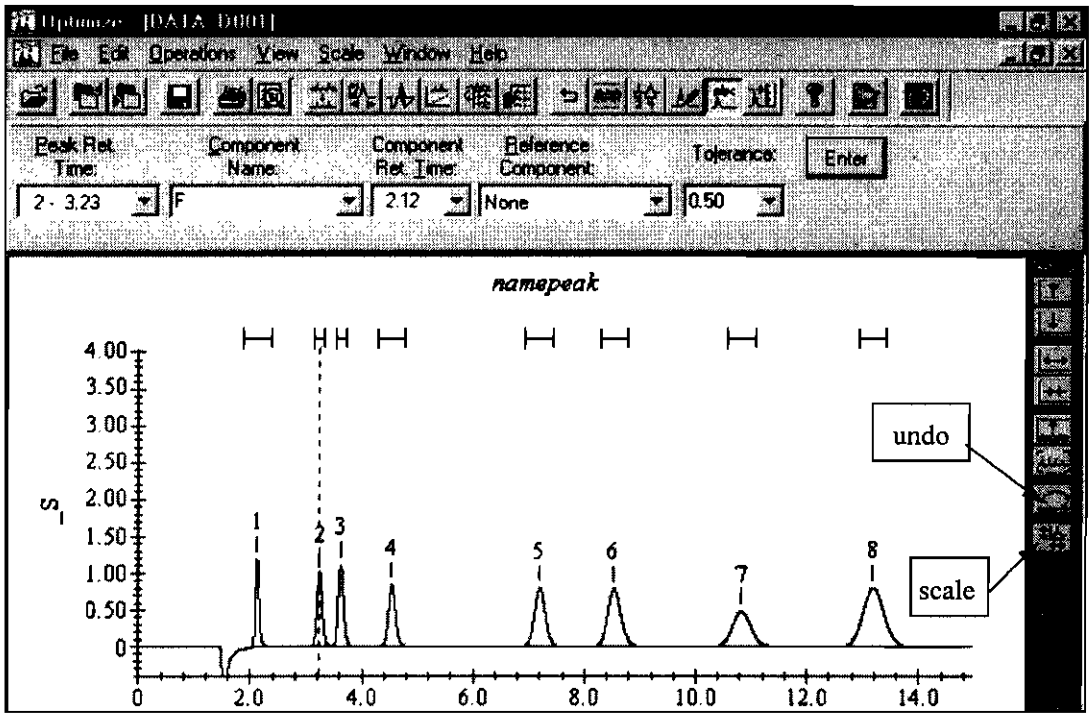
2. ที่เมนู ***Operations*** เลือก **Adjust Integration** เลื่อนเมาส์ไปที่เส้นประ จะปรากฏลูกศร 2 หัว ลากเมาส์เลื่อนไปที่ Void Peak

   ที่ Peak Event เลือก Void Treatment แล้ว click เมาส์ที่ Re-Integrate ทำการขยายสเกลโดยใช้เมาส์ป้ายที่ Baseline แล้วลากดู ถ้ายังไม่ดีขึ้น สามารถทำได้โดยใช้เมาส์เลื่อนไปที่เส้นประจะปรากฏลูกศร 2 หัว จากนั้นลากเมาส์เลื่อนไปที่หน้าพีกที่ต้องการ แล้วทำการลดค่า Peak Threshold ลงจากค่าเดิม click เมาส์ที่ Re-Integrate ตรวจดูผลจนได้ตามต้องการ



3. click ที่เมนู ***Operations*** เลือก **Return to Normal Display** ถ้าหากสเกลของ Chromatogram ไม่เหมาะสม ให้ click เมาส์ที่ Icon ขวามือที่เป็น Icon *UNDO* จะได้โครมาโทแกรมตามต้องการ หรือทำการปรับเปลี่ยนค่าบน Scales จนได้โครมาโทแกรมตามต้องการ

4. ที่เมนู ***Operations*** เลือก **Name Peak** จะได้จอภาพดังนี้



5. สำหรับพีกที่ 1

   ➢ ที่ Peak Ret Time

   ➢ ที่ drop drown list เลือก no. และ time ของพีกที่ 1 จากนั้น

   ➢ กด Tab ไปที่ Component Name ให้พิมพ์ชื่อของสารตัวที่ 1

   ➢ กด Tab 3 ครั้ง ในแต่ละช่อง จะปรากฏค่าโดยอัตโนมัติ ให้เปลี่ยนค่า tolerance เป็น 0.2 หรือตามความเหมาะสม **กด Enter**

6. สำหรับพีกที่ 2

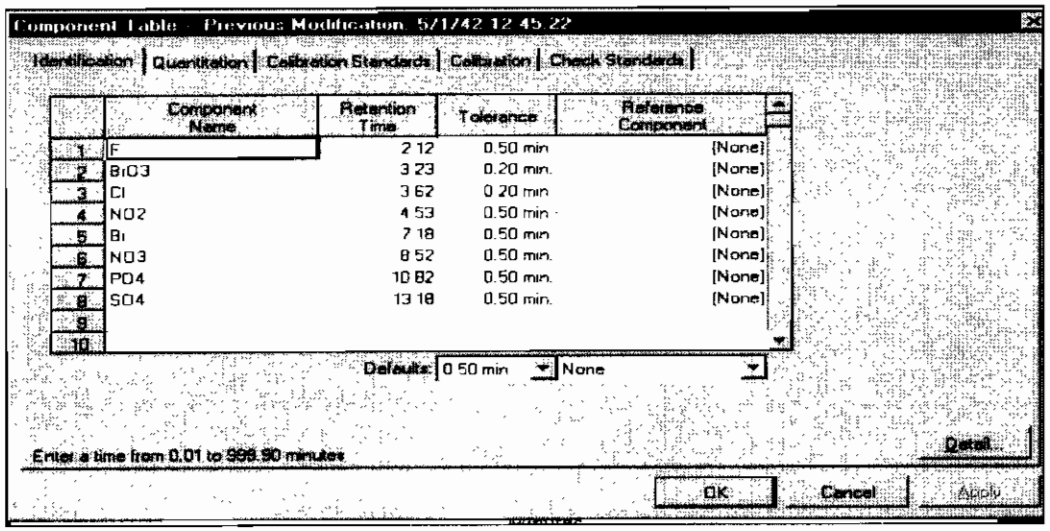
   ➢ ที่ Peak Ret Time

   ➢ ที่ drop drown list เลือก no. และ time ของพีกที่ 2 จากนั้น

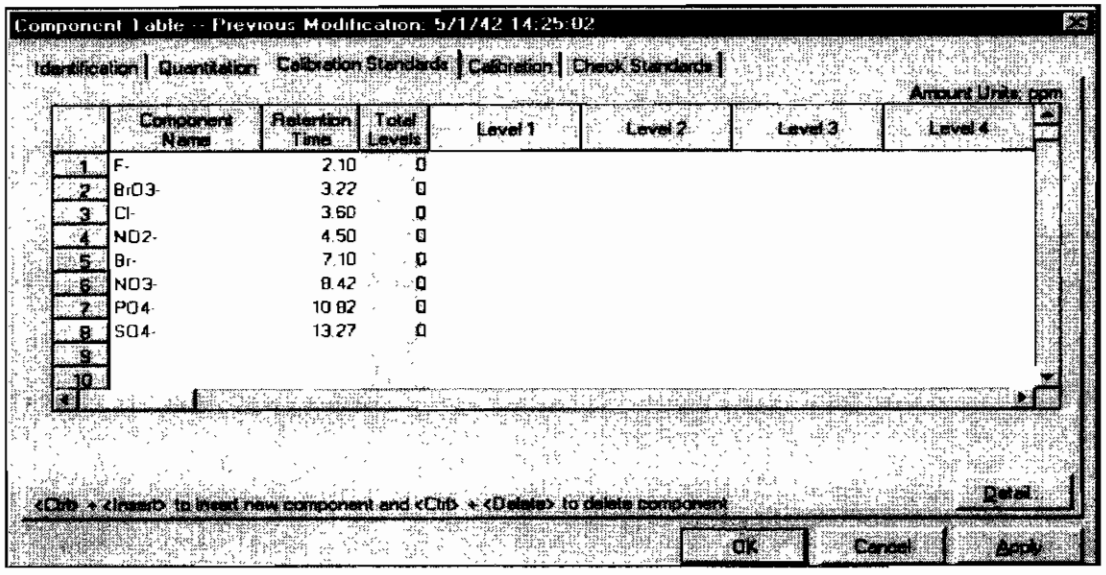
   ➢ กด Tab ไปที่ Component Name ให้พิมพ์ชื่อของสารตัวที่ 2

   ➢ กด Tab 3 ครั้ง ในแต่ละช่อง จะปรากฏค่าโดยอัตโนมัติ ให้เปลี่ยนค่า tolerance เป็น 0.2 หรือตามความเหมาะสม **กด Enter**

7. ทำเช่นนี้จนครบทุกพีก
8. ที่เมนู ***Operations*** เลือก **Return to Normal Display**
9. ให้ click เมาส์ที่ Icon *Scale* เพื่อปรับสเกลให้ได้ตามต้องการ
10. ▲ ไปที่เมนู ***Edit*** เลือก **Component Table** ได้หน้าจอ



▲ เลือก **Calibration Standard** แล้วใส่ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน ให้ครบทุก Level **กด OK**



11. 😐 ที่เมนู ***File*** เลือก **Save Data File**

    😐 ที่ File Name พิมพ์ชื่อ file ที่ต้องการบันทึก หรือเลือกชื่อที่ต้องการ หรือใช้ชื่อเดิม

    กด **OK** แล้วกด YES

12. ☹ ที่เมนู ***File*** เลือก **Save Method File**

    ☹ ที่ File Name พิมพ์ชื่อ file ที่ต้องการบันทึก หรือเลือกชื่อที่ต้องการ หรือใช้ชื่อเดิม

    กด **OK** แล้วกด YES

13. ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit**

2.1.6 ทำการ Run สารมาตรฐานและตัวอย่างต่อๆกัน

1. 🔔 ที่ PeakNet MainMenu เลือก Icon ***Run*** จอจะขึ้น Peaknet Run - [DX500]

    🔔 ที่เมนู ***File*** เลือก **Load Method** เลือก Method ที่ต้องการ คือ method ที่ได้ name peak และใส่ component table แล้ว กด Enter

2. ดูดสารมาตรฐาน Level 1 ด้วย syringe เข้า sample loop

3. click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Start** จะปรากฏหน้า **Start Method**

4. ▼ ที่ **Sample** ใช้เมาส์กดที่ช่อง Sample พิมพ์ Standard 1

    ▼ ที่ **Sample Type** เลือก Calibration Standard

    ▼ ที่ **Level** เลือกค่า 1 กด Enter

5. ปล่อยทิ้งไว้จนได้รับโครมาโทแกรมของไอออนครบทุกตัว

6. click ที่เมนู ***Run*** เลือก **End** หรือปล่อยให้เครื่อง **End** โดยอัตโนมัติ ตาม run time ที่ตั้งไว้ใน method

7. ดูดสารมาตรฐาน Level 2 ด้วย syringe เข้า sample loop

8. click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Start** ที่ Sample พิมพ์ Standard 2 ที่ level พิมพ์ 2 กด Enter

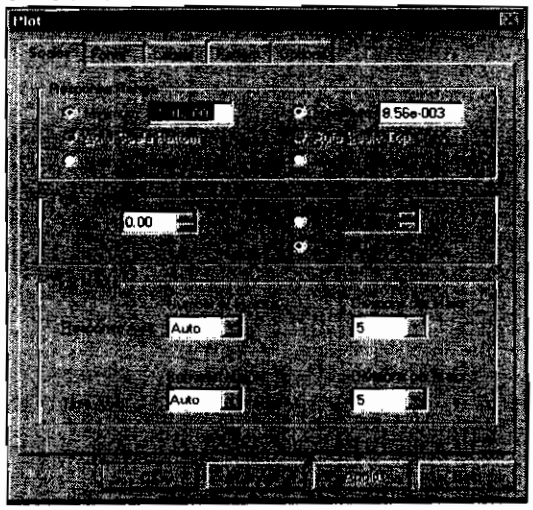
9. เครื่องมือจะเริ่ม run ตัวที่สองต่อไป ทำซ้ำกับสารมาตรฐานจนครบหมดทุกตัว และเปิดดูข้อมูลว่า calibration curve ที่ได้ถูกต้องดีแล้วหรือไม่ (ดูหัวข้อ 2.1.7)

10. นำสารตัวอย่างมา run โดย
    - ◎ ที่เมนู ***Run*** เลือก **Start** ขึ้นหน้า Start Method ใส่ชื่อที่ Sample Name และ
    - ◎ ที่ **Sample type** เลือก **Sample**

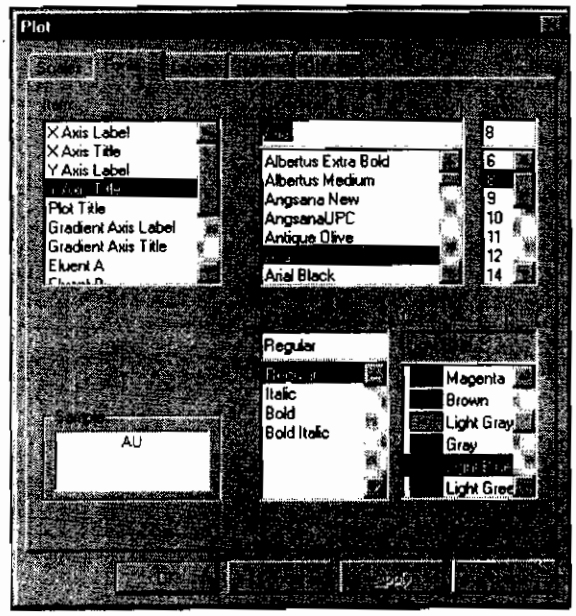
11. เมื่อ run เสร็จ กด CLOSE (X) ที่มุมด้านขวาของหน้าจอ หรือ click ที่เมนู file แล้วเลือก EXIT

หมายเหตุ

1. ในระหว่างการ run สามารถทำการเช็คชื่อ Method ที่กำลัง run ว่าถูกต้องหรือไม่ ได้โดยสังเกตที่ Status bar เหนือ chromatogram
2. ในระหว่างการ run ถ้าต้องการเปลี่ยนสีของแกน (X,Y) บนโครมาโทแกรมขณะ Run ทำโดย
   - ✹ click ที่ Icon ***Scale*** จะปรากฏหน้า Plot



✹ click เลือก Fonts



✹ ที่ Item click เลือกแกนที่ต้องการ และที่ color เลือกสีที่ต้องการ

3. เมื่อ Run สารครบแล้วอาจจะทำการปิดปั๊ม GP50 และตัวตรวจวัด CD20 ได้ในระหว่างการ Processing Data เพื่อเป็นการประหยัดสารละลาย

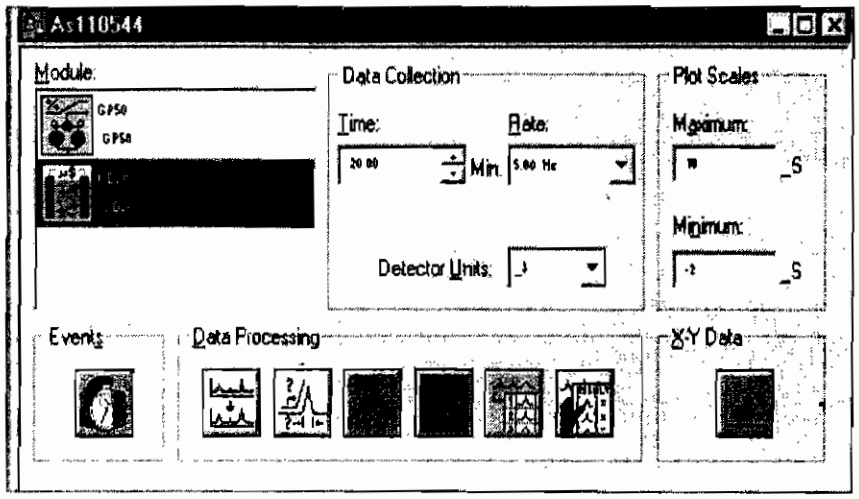
2.1.7 การดูผลของ Standrad Curveหลังจาก Run สารมาตรฐานเสร็จแล้ว

ที่หน้า PeakNet mainMenu

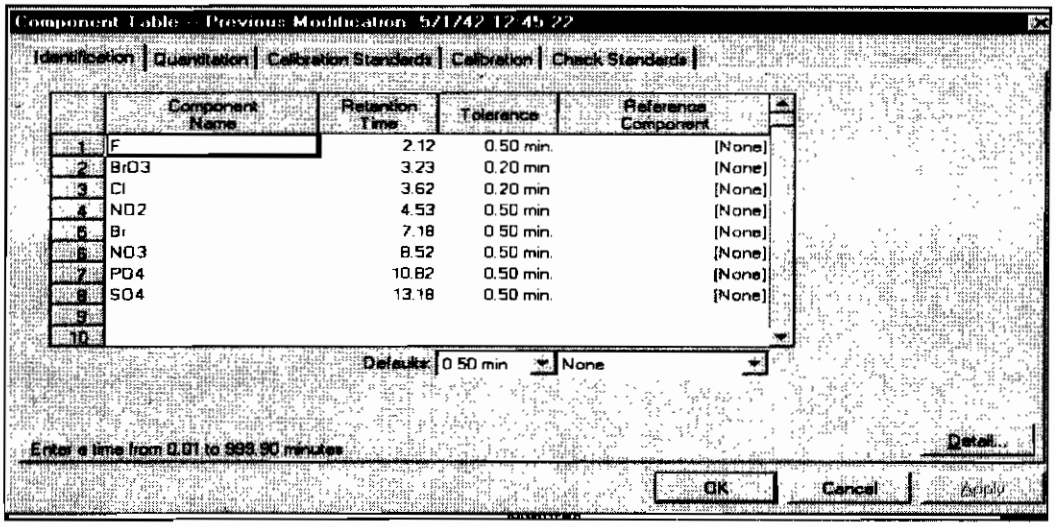
1. เลือก Icon ***Method***

จะปรากฏจอ Method Editor

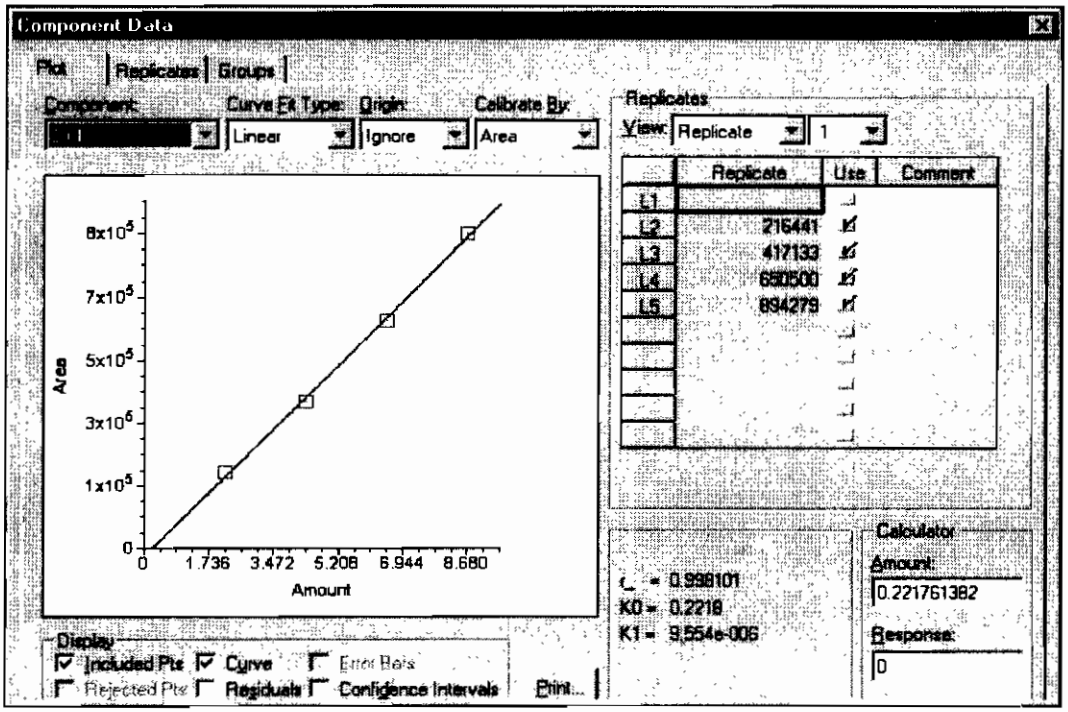
2. ที่เมนู ***File*** เลือก **Open Method File** เลือก Method ที่สร้างไว้ เช่น (Anion): AS110504 เลือก Open จะได้หน้า Method ที่เลือก



3. ✤ ที่ Module เลือก CD20 ที่ Data Processing เลือกช่อง 5 หรือ Component Table เลือก Calibration Standard



✤ จากนั้น click ที่ Detail แล้วเลือก PLOT และสั่ง Print (กลางใต้สุดของจอ)



4. เครื่องจะถามว่าต้องการพิมพ์ทั้งหมด หรือหน้าปัจจุบัน ให้เลือกแล้วกด OK รอจนพิมพ์เสร็จ
5. Close (X) 2 ครั้ง จะกลับคืน PeakNet MainMenu

2.1.8 ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับการสร้าง Calibration Curve

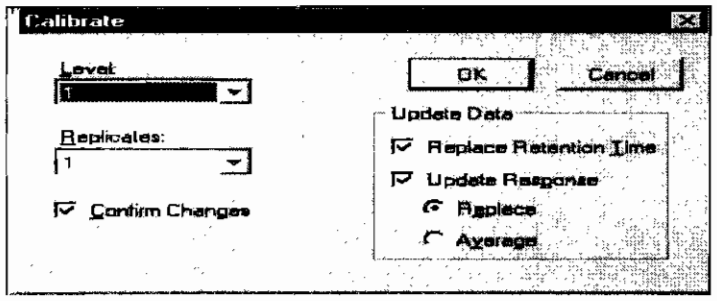
1. **<u>วิธีการตัดข้อมูลบางค่าที่ใช้สร้างกราฟออก</u>** กรณีที่ค่านั้นเบี่ยงเบนมากเกินไป

- ต้องทำภายหลังจากสร้างกราฟมาตรฐานเรียบร้อยแล้ว
- click ที่ Icon ***Optimize***
- ทำการเปิด file ของกราฟมาตรฐานที่ level สูงสุด เพื่อทำการแก้ไข
- ที่เมนู **Edit** เลือก **Component Table** จากนั้นลบความเข้มข้นของข้อมูลที่ไม่ต้องการออก แล้วไป click ที่ Details เลือก Plot จะได้ Calibration Curve ที่สร้างขึ้นมาใหม่จากจุดที่เหลืออยู่

2. **<u>วิธีการสร้าง Calibation Curve จากข้อมูลเก่า เนื่องจากใส่ Level ผิด</u>**

ให้ทำดังนี้

2.1)
- click ที่ Icon ***Optimize***
- ทำการเปิด file ของกราฟมาตรฐานที่ใส่ level ผิด เพื่อทำการแก้ไข
- click ที่เมนู ***Operations*** เลือก **Calibrate** แล้วปรับ level กับ Replicate ให้ถูกต้อง **กด OK**



2.2)
- ที่เมนู ***File*** เลือก **Save Data File**
- ที่ File Name ใส่ชื่อใหม่ หรือเลือกชื่อเดิม แล้วกด YES

2.3) 🚌 ที่เมนู ***File*** เลือก **Save Method File**

🚌 ที่ File Name ใส่ชื่อใหม่ หรือเลือกชื่อเดิม แล้วกด YES

3. <u>กรณีมีพีก แต่เครื่องไม่ทำการคำนวณ</u>

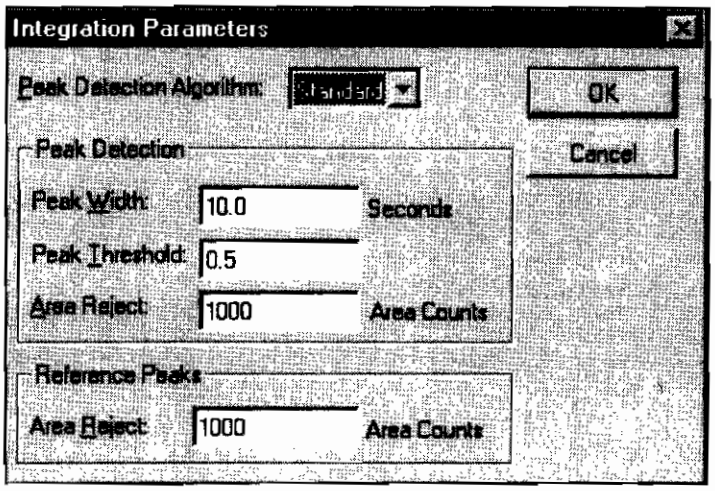
เมื่อเราทำการ Integrate Peak แล้วเครื่องไม่แสดงชื่อ แสดงว่าตั้งค่า area rejection ไว้มากเกินไป ให้ไปทำการแก้ไขโดย

3.1) ✡ click ที่ Icon ***Optimize***

✡ ทำการเปิด file ที่ต้องการแก้ไข

✡ ที่เมนู ***Edit*** เลือก **Integration** จะได้ **Integration Parameters**

✡ ที่ Peak Detection เปลี่ยนค่า Peak width, Peak Threshold และ Area Reject ให้มีค่าต่ำลง **กด OK**



3.2) ★ ที่เมนู ***File*** เลือก **Save Data File**

★ ที่ File Name ใส่ชื่อใหม่ หรือเลือกชื่อเดิม แล้วกด YES

3.3) ☆ ที่เมนู *File* เลือก **Save Method File**

☆ ที่ File Name ใส่ชื่อใหม่ หรือเลือกชื่อเดิม แล้วกด YES

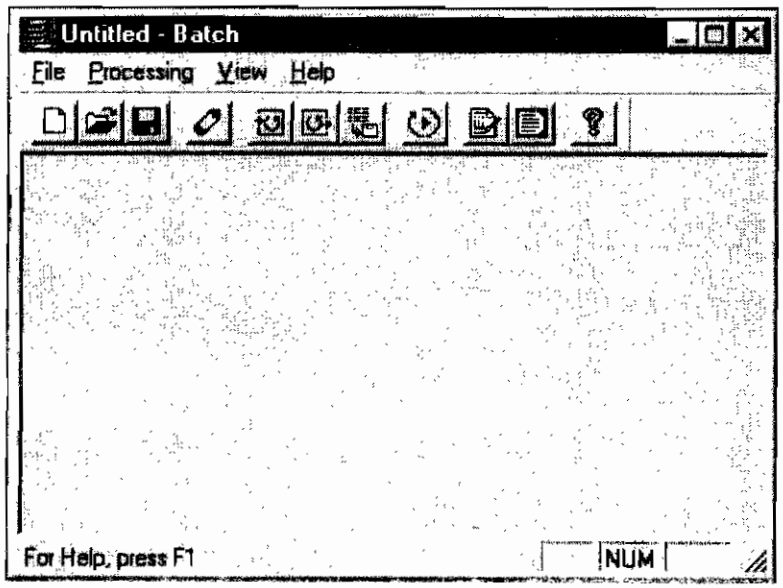
3.4) จากนั้นทำการเปิด File อื่นๆ เพื่อแก้ไขค่าให้เครื่องอ่านนึกที่ต้องการ ให้ครบทุก file โดยเปิด file ด้วย method ที่แก้ไขแล้ว จากนั้น Save Data File และ Save Method File

2.1.9 การทำงานต่างๆ ที่ Icon *Batch*

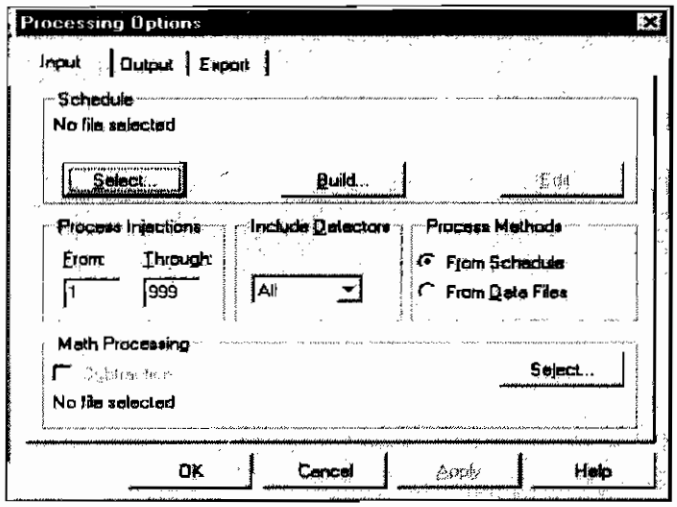
1. **<u>ในกรณีที่แต่ละ file ใช้ Method ในการ run แตกต่างกัน เอามาประมวลรวมกันไม่ได้ ให้ทำการเปลี่ยน Method ก่อนดังนี้</u>**

1.1) ☆ **ที่ PeakNet MainMenu** ให้คลิกที่ Icon ***Batch***

จะได้หน้าต่างดังรูป

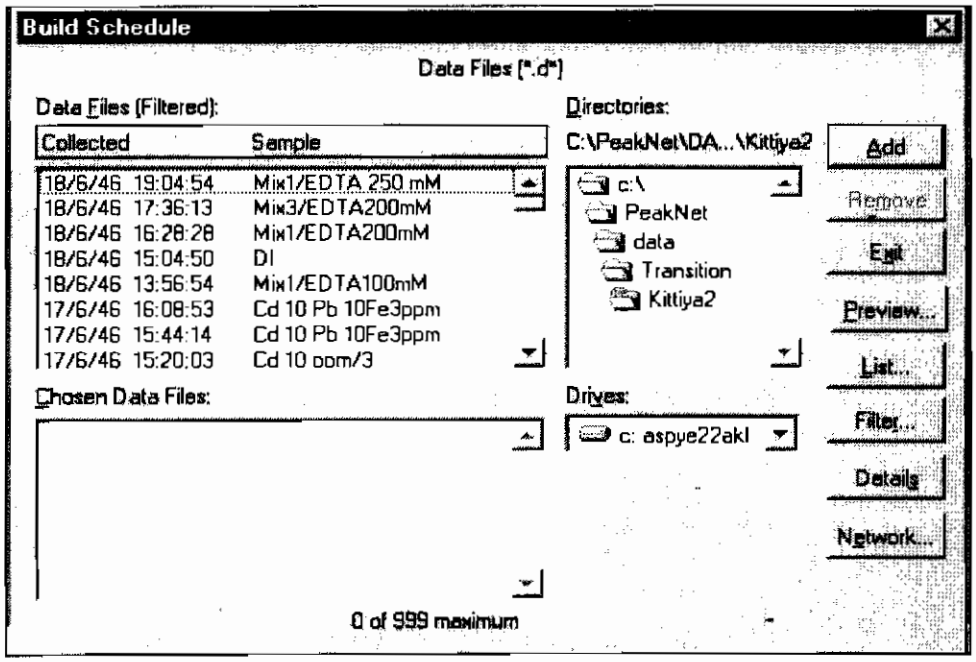


☆ click ที่เมนู ***Processing*** เลือก **Input**



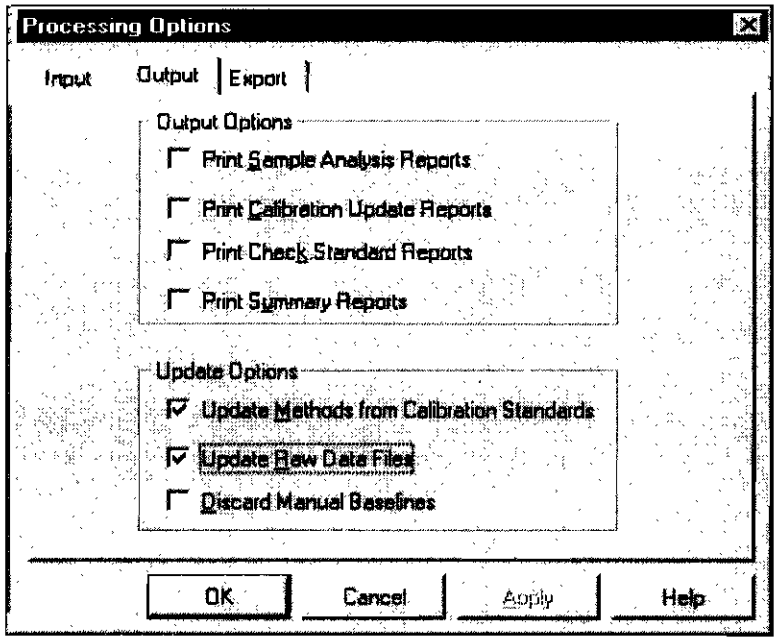
☆ เลือก **Build**

☆ จากนั้น double click เลือก File ที่ต้องการนำมาแก้ไขให้อ่านด้วย Method เดียวกัน กด Exit

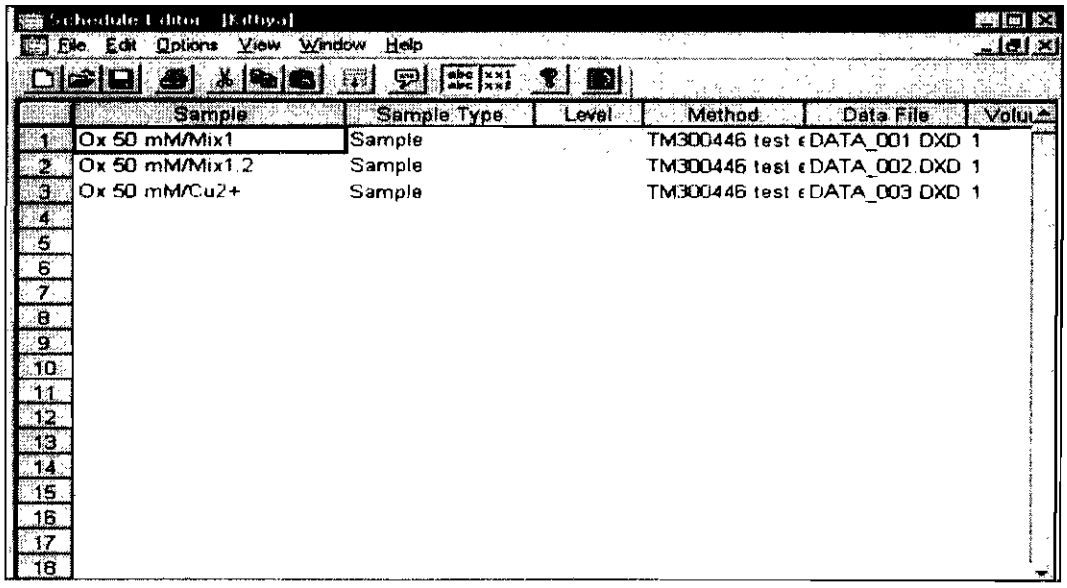


☆ แล้วตั้งชื่อ file กด Save

1.2) ไปที่ **Output** ที่ช่อง Update Operations ให้ click (✓) ที่ **Update Method From Calibration Standards** และ **Update Raw data Files** **กด OK**



1.3) ★ ที่ **Processing** เลือก **Input** เลือก **Edit** จะขึ้น Schedule Editor ให้ขยายจอภาพ



✯ ที่ช่อง Method ขยายสเกลให้กว้างขึ้น

✯ ให้ double click ที่ Method อันแรก

✯ ให้เลือก Method ที่ต้องการนำไปใช้ กด Open

1.4) ✂ click ที่เมนู **Edit** เลือก **copy**

✂ จากนั้นทำการ highlight บรรทัดที่เหลือ

✂ click ที่เมนู **Edit** เลือก **paste** จะได้ Method เดียวกันทุกบรรทัด

1.5) ไปที่เมนู ***File*** เลือก **Save**

1.6) ที่เมนู ***File*** กด **Exit** จะไปอยู่ที่หน้า Processing Options **กด OK**

1.7) click ที่เมนู ***Processing*** เลือก **Start** จะได้ทุก file ที่ถูกอ่านด้วย method เดียวกัน

2. <u>เมื่อต้องการนำผลที่ได้จากการ run chromatogram ซ้ำๆ กัน หลายๆ ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ย และ % RSD</u> ให้ทำดังนี้

2.1) click ที่ Icon ***Batch***

click ที่เมนู ***Processing*** เลือก **Input**

ตามด้วยเลือก Build และเลือก directory ที่ต้องการ จากนั้น double click file ที่ต้องการทั้งหมด แล้วกด exit

2.2) จะปรากฏ Save as ให้ตั้งชื่อ file ที่ต้องการ save จากนั้นให้กด save

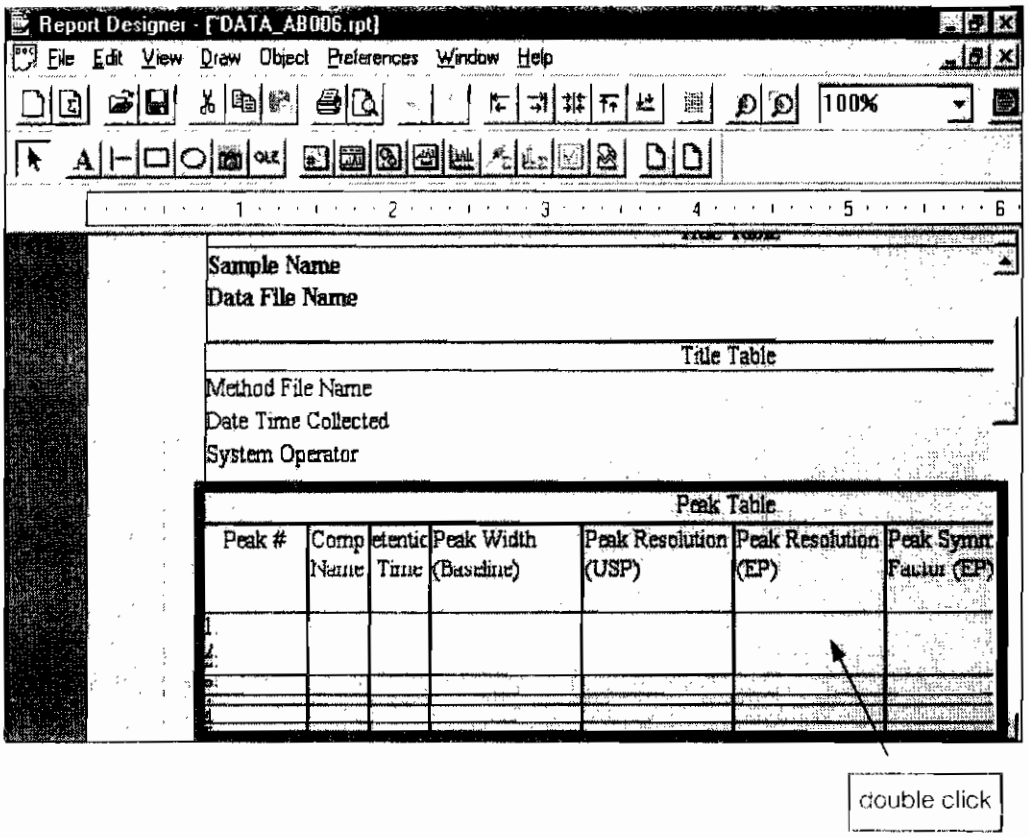
2.3) click ที่ Out put โดยที่ Output Options ให้ click (✓) ที่ Print summary reports แล้วกด OK

2.4) จากนั้นไปที่เมนู ***Processing*** แล้วกด **start**

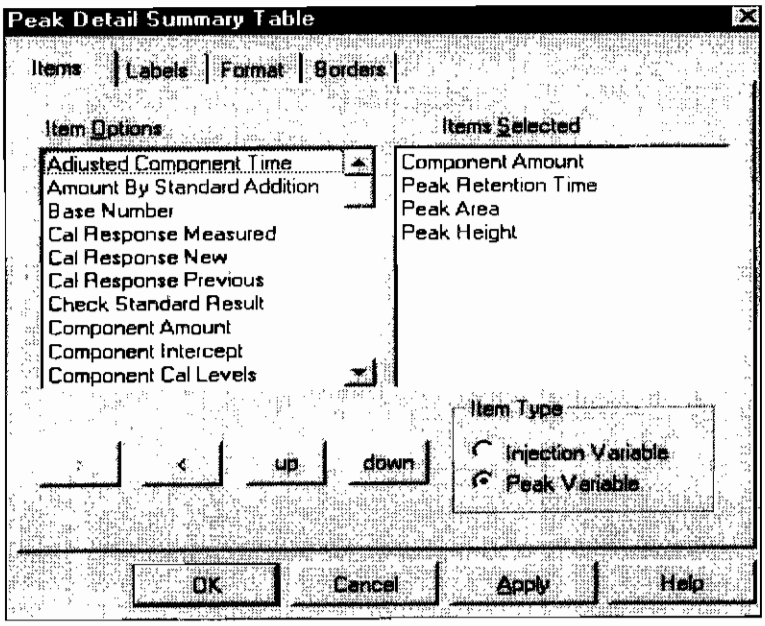
3. การเปลี่ยนข้อมูลแบบที่นิยมในการคำนวณ ให้ทำดังนี้

3.1) click ที่ Icon *Batch*

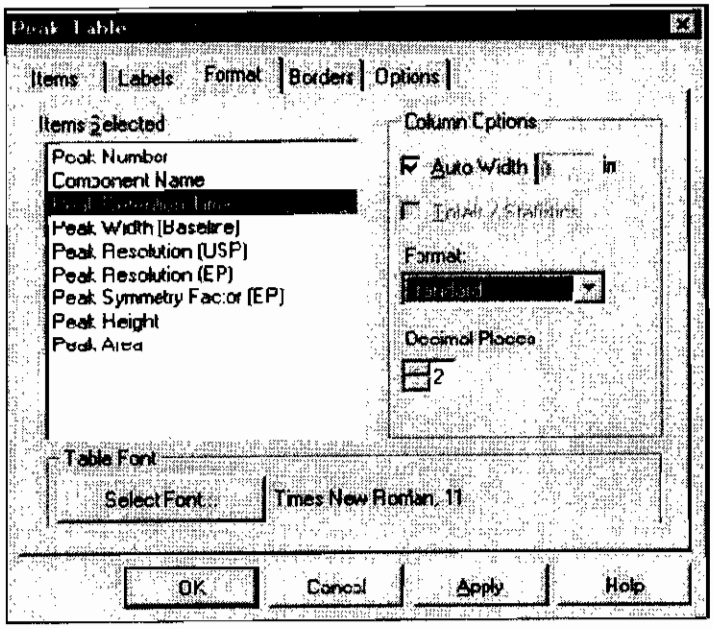
click ที่เมนู *View* เลือก **Report Format** จะได้หน้าต่าง **Report Designer**



จากนั้น double click ในช่อง Peak Table (ช่องใดก็ได้ที่อยู่ในกรอบดำ) จะปรากฏหน้าต่าง Peak Table



☙ ให้เลือก Format



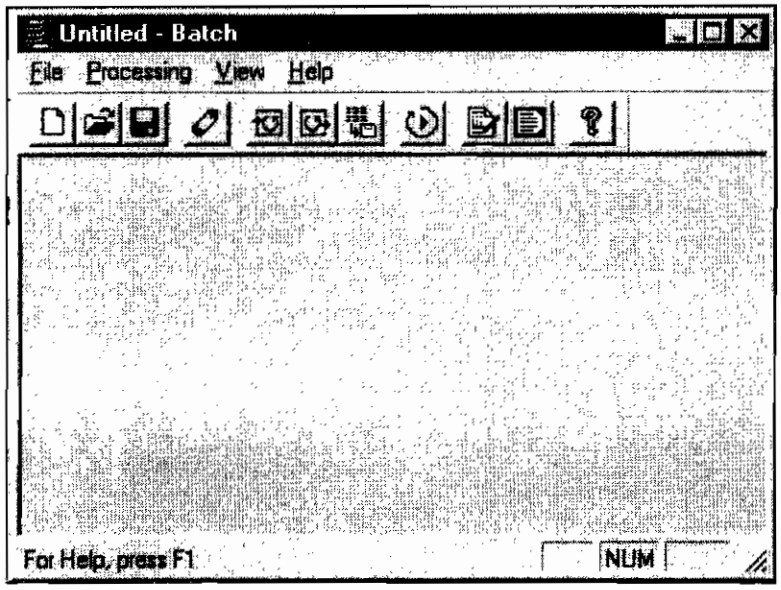
☙ click เลือก Item ที่ต้องการ แล้วกดที่ drop drown list ในช่อง Decimal Places เพื่อทำการเพิ่ม หรือลด จำนวนทศนิยม กด OK

3.2) ที่เมนู ***File*** ให้เลือก **Exit** แล้วกด Yes

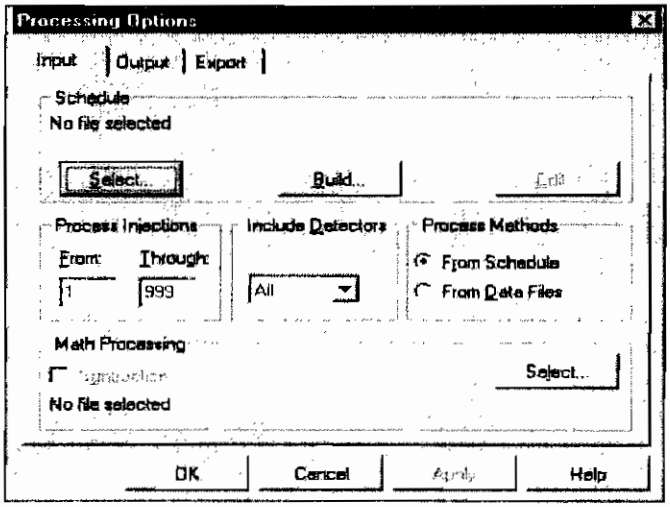
4. การ Substract พีก ให้ทำดังนี้

4.1) ☆ ที่ **PeakNet MainMenu** ให้คลิกที่ Icon ***Batch***

จะได้หน้าต่างดังรูป

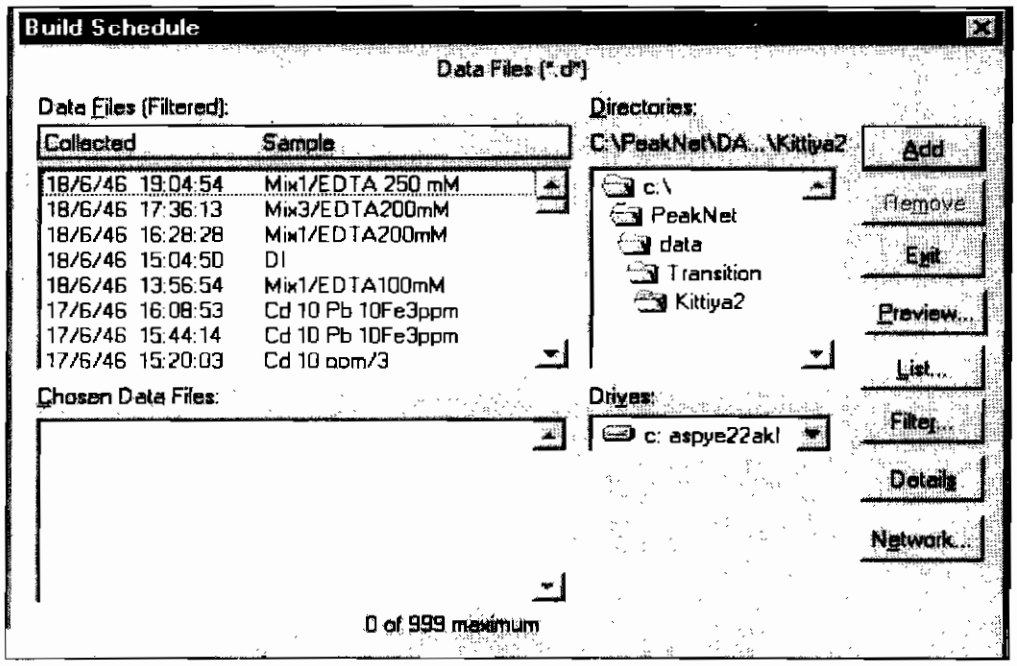


☆ click ที่ ***Processing*** เลือก **Input**



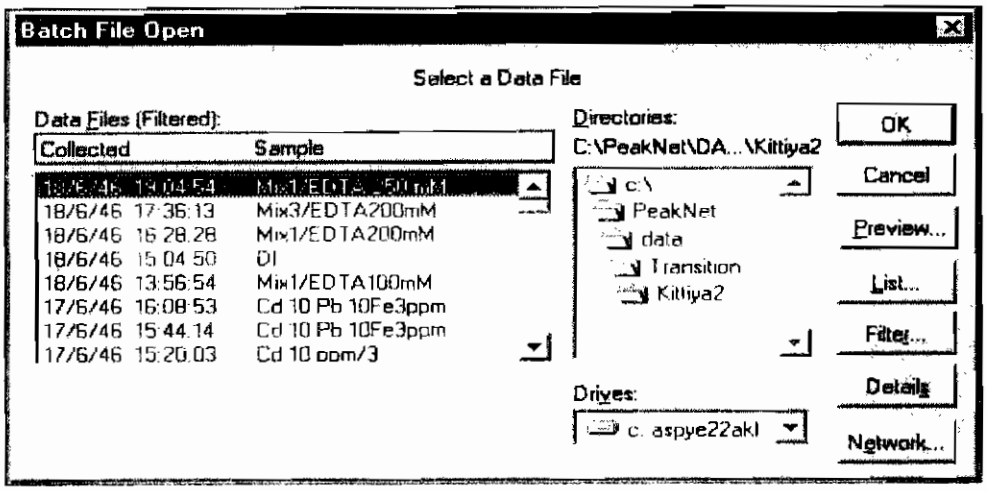
☆ เลือก **Build**

☆ จะปรากฏหน้าจอ Build Schedule จากนั้นทำการ double click เลือก File ที่ต้องการนำมาทำการ Substract กด Exit



☆ แล้วตั้งชื่อ file กด Save

4.2) ที่หน้าต่าง **Processing Option** ให้เลือก **Select** ในกรอบ **Math Processing** จากนั้นทำการ double click เลือก File ที่ต้องการนำมาหักลบจาก file ที่เลือกครั้งแรก



4.3) สังเกตว่าในกรอบ **Math Processing** จะมีเครื่องหมาย ✓ หน้า **Substraction** ให้กด OK

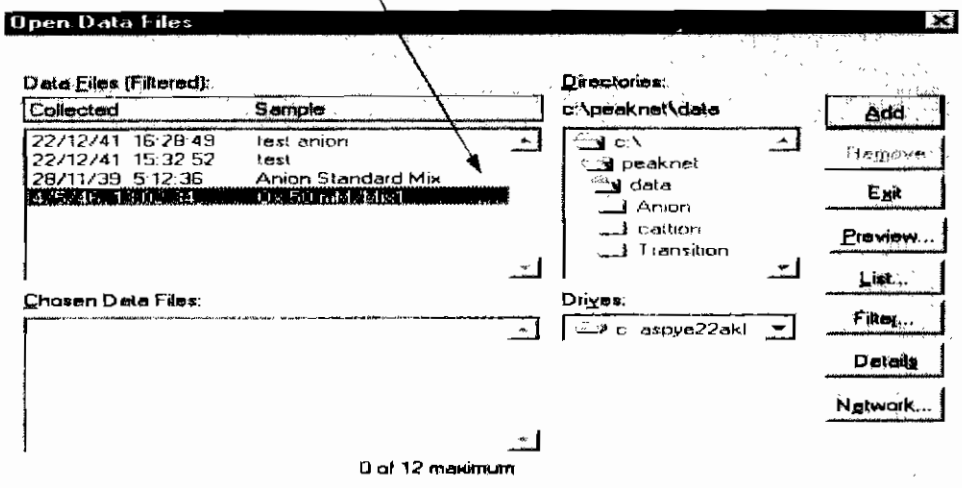
4.4) click ที่เมนู ***Processing*** เลือก **Start**

4.5) การเปิดดูข้อมูลที่ได้ทำการ Substract

ก) click ที่ Icon ***Optimize***

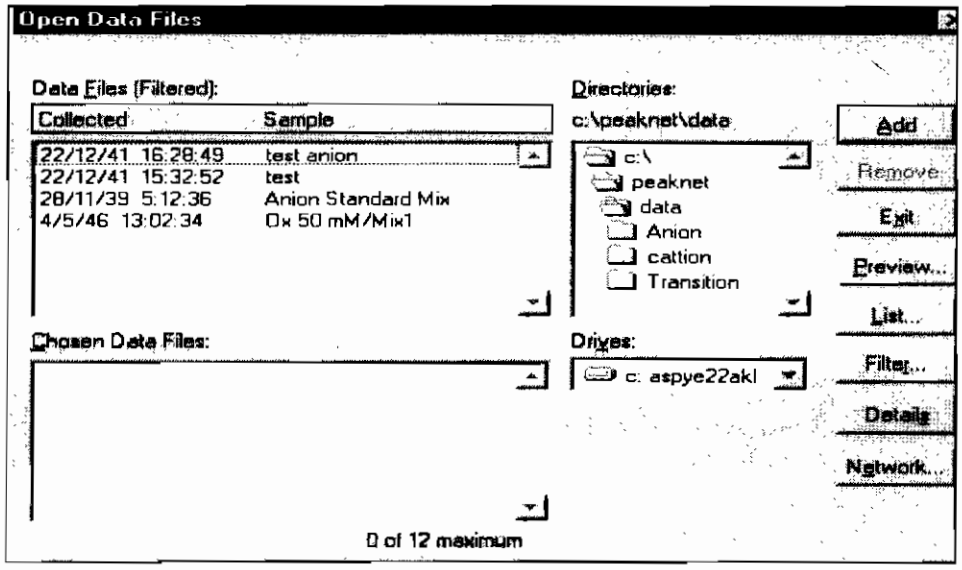
ข) click ที่เมนู ***File*** เลือก **Open Data Files**

ค) double click file ด้านล่างสุด (ที่ทำการ Substract แล้ว) ในช่อง Data Files ด้านซ้ายมือตาม

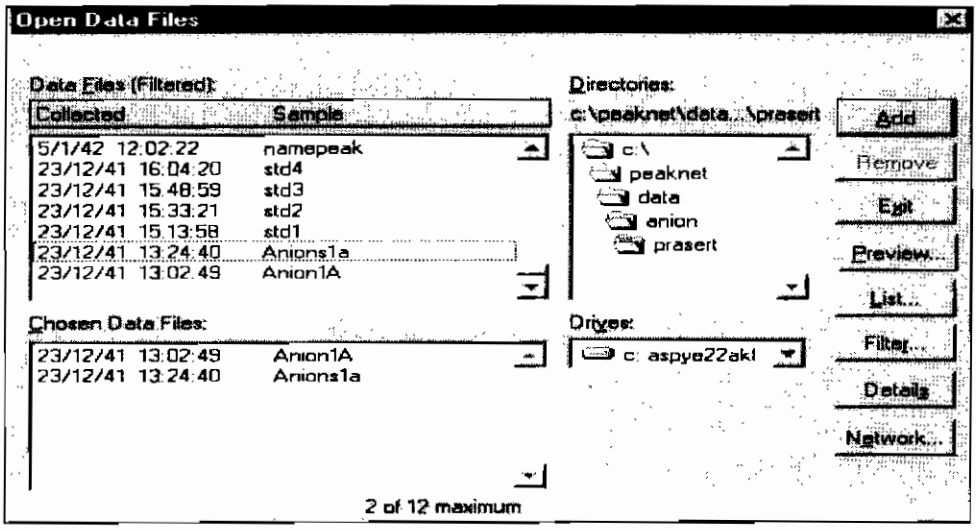


2.1.10 การซ้อนทับพีก (Overlay plot)

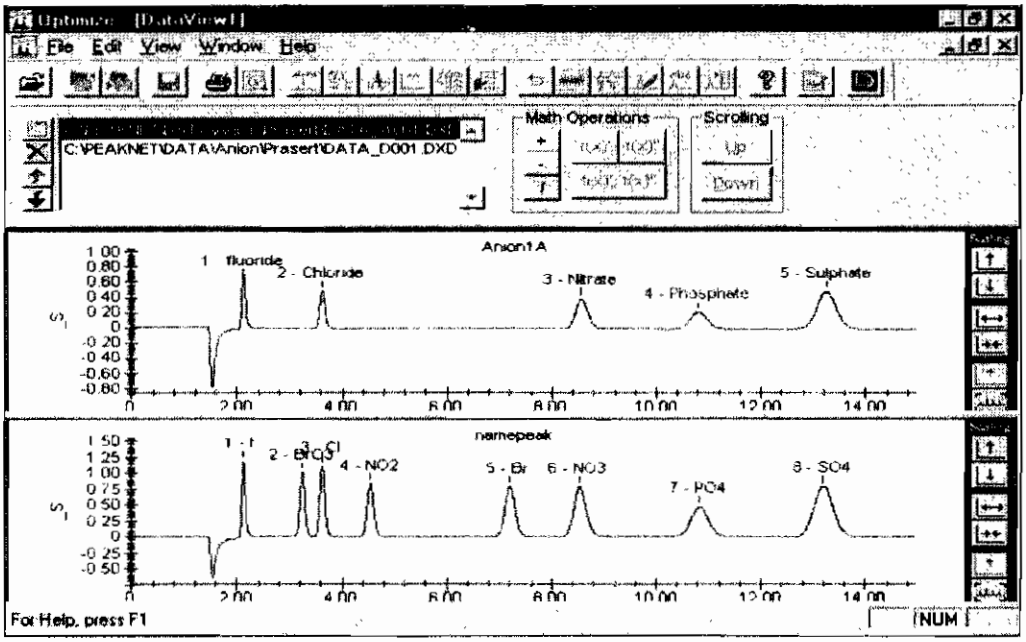
1. ที่ **PeakNet MainMenu** เลือก Icon ***Optimize***
2. เลือกเมนู ***File*** เลือก **Open Data View** แล้ว double click directories ที่ต้องการ



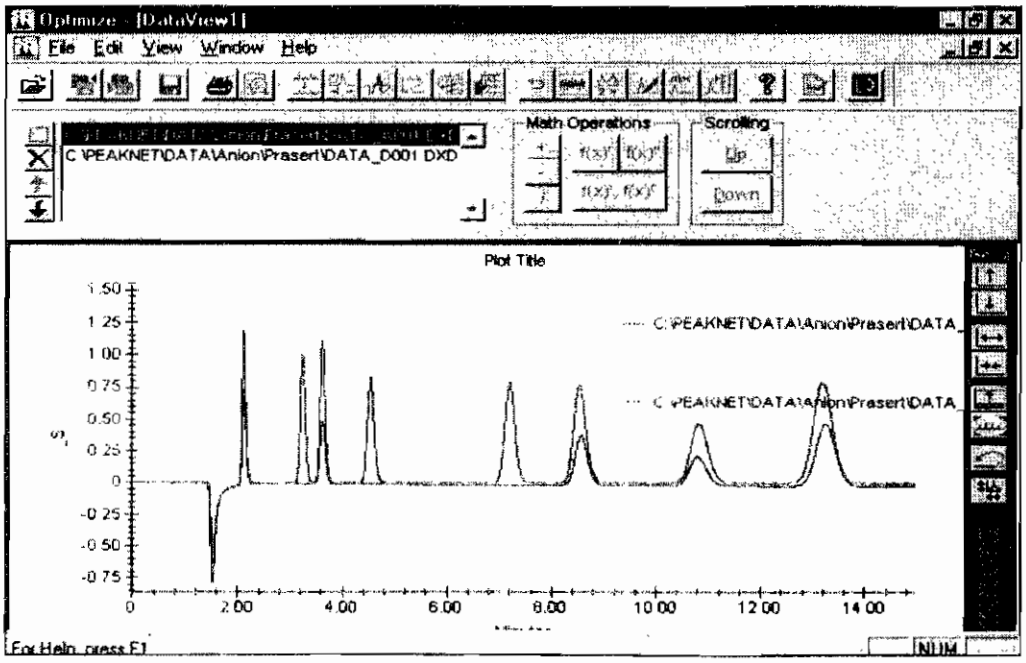
3. ที่ Data Files เลือก File ที่ต้องการ เช่น เลือก File ที่ 1 แล้วกด Add แล้ว Fileที่ 2 กด Add และ File ที่ 3,.... กด Add เลือก Exit



4. จะปรากฏหน้าจอดังรูป



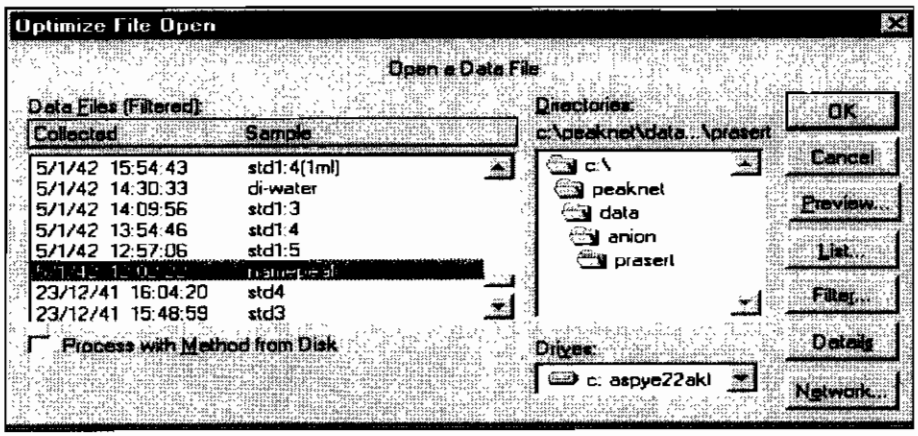
5. ที่เมนู *View* เลือก **Overlay Plot** ถ้าต้องการขยายสเกลใช้ระบบป้ายเพื่อขยาย



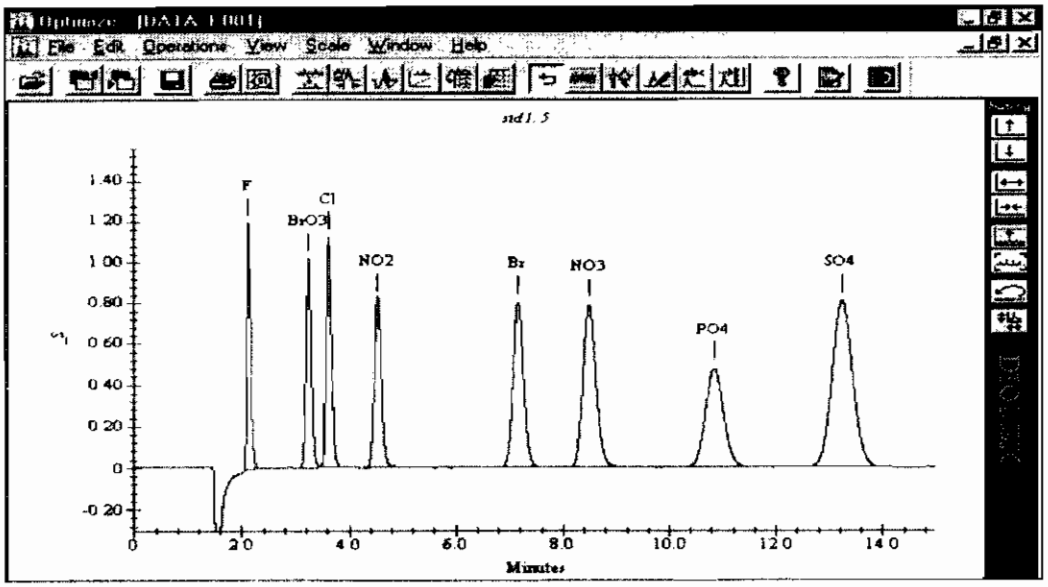
2.1.11 เมื่อต้องการพิมพ์ Report ของสารตัวอย่าง

1. **เปิด file ที่ต้องการพิมพ์ Report**

   - click ที่ Icon ***Optimize***
   - click ที่เมนู ***File*** เลือก **Open Data File**
   - ที่ Directories เลือก Anion หรือ Cation ตามต้องการ โดย double click เลือก Details
   - กด double click เลือก Data File ที่ต้องการนำมาพิมพ์



✣ ที่จอจะแสดง Data File ที่ได้เลือก จะปรากฏชื่อ File ที่ต้องการและโครมาโทแกรม



2. ที่เมนู ***File*** เลือก **Open Method File** เลือก Method ที่ต้องการ **กด OK**
3. ที่เมนู ***File*** เลือก **Print**

2.1.12 การปิดเครื่อง

1. ที่หน้า **PeakNet MainMenu** เลือก Icon ***Run*** เลือก **Direct Control**
2. เลือก CD20 เลือก SRS current ใช้เมาส์ชี้ที่ลูกศร เลือก OFF
3. เลือก GP50 กดปุ่ม OFF และเปลี่ยน flow rate เป็น 0 ml/min **กด OK**
4. ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit**
5. ปิด PeakNet MainMenu
6. ไปที่ Start เลือก SHUT DOWN กด YES เครื่อง CPU จะดับเอง ทำการปิดจอภาพ

7. ที่ปั๊ม GP50 กดสวิทซ์ปิดเครื่อง
8. ที่ CD20 กดสวิทซ์ปิดเครื่อง
9. ที่ถังแก๊สไนโตรเจน ปิดวาล์ว 1 โดยหมุนตามเข็มนาฬิกา
10. ทำการไล่แก๊สไนโตรเจนที่ค้างตามท่อโดยเปิดฝาขวดตัวชะ สังเกตว่าค่าความดันที่ถังแก๊สจะลดลงเป็นศูนย์
11. ปิด needle Valve (EO1) โดยหมุนตามเข็มนาฬิกา แล้วปิดฝาขวดตัวชะ

2.1.13 ในกรณีที่ต้องการปิดจากเครื่อง DIONEX 500 โดยตรงสามารถทำได้โดย

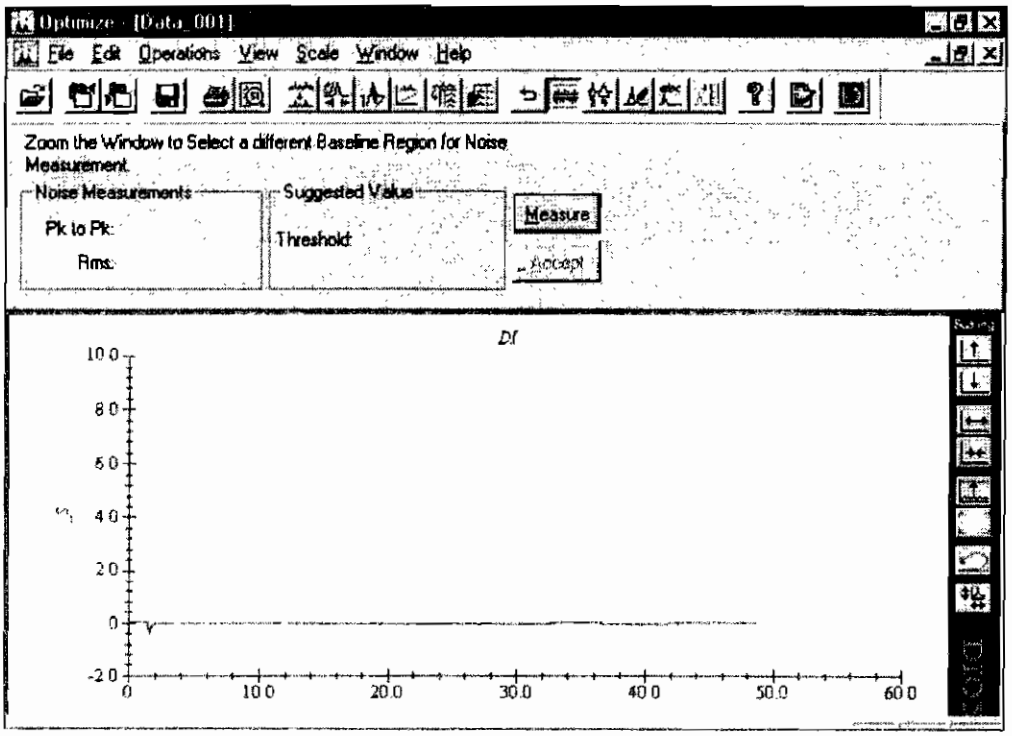
1. ที่หน้าปัดของเครื่อง GP50 Gradient Pump ใช้ลูกศร 4 ทิศทางเลื่อนมาที่ REMOTE
2. กดปุ่ม select เลือก LOCAL จะสามารถกดปุ่ม ON-OFF ที่หน้าปัดเครื่องได้ ให้กด **OFF**
3. ที่หน้าปัดของเครื่อง CD20 Conductivity Detector ใช้ลูกศร 4 ทิศทางเลื่อนมาที่ REMOTE
4. กดปุ่ม select เลือก LOCAL จะสามารถกดปุ่ม ON-OFF ที่หน้าปัดเครื่องได้ ให้กด **OFF**

2.1.14 การวัดค่า Noise

ที่หน้า PeakNet MainMenu

click ที่ Icon Optimize ที่เมนู File เลือก open แล้วทำการเปิด file ที่ต้องการ เมื่อเปิด file ที่ต้องการได้แล้ว จออยู่หน้า optimize ให้ดำเนินการดังนี้

1. ไปที่เมนู ***Operations*** เลือก **Auto Threshold**

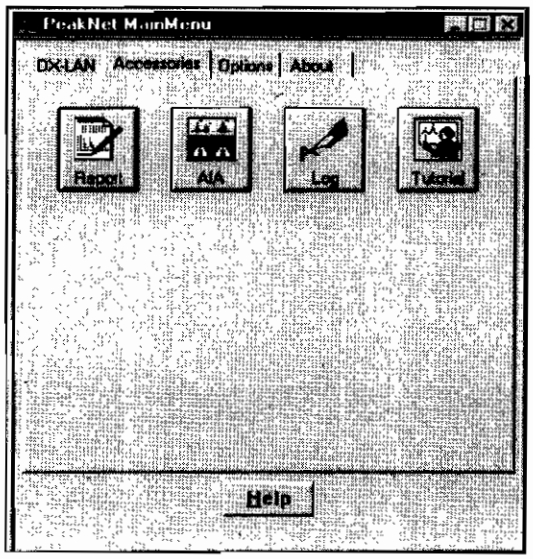


2. เลือก baseline ที่นิ่งที่สุด ประมาณ 1 นาที โดยใช้เมาส์ click ให้เป็นกรอบเส้นประ
3. กด measure ดูที่ noise measurement ค่า Pk to Pk ไม่ควรเกิน 0.005 µS
4. เมื่อดูเสร็จแล้วกด accept
5. click ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit**

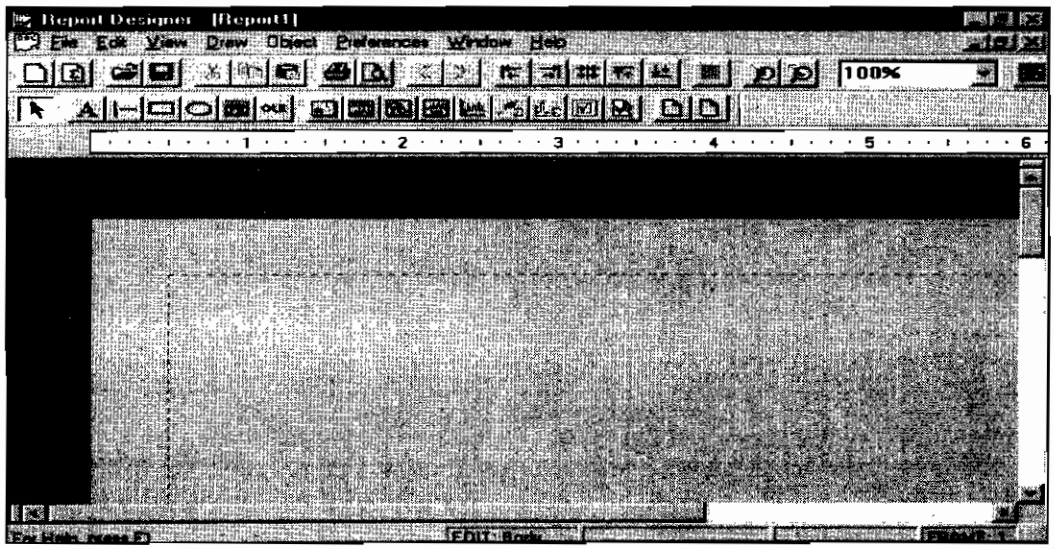
2.1.15 การสร้าง Form Report ตามต้องการ

ที่ PeakNet MainMenu

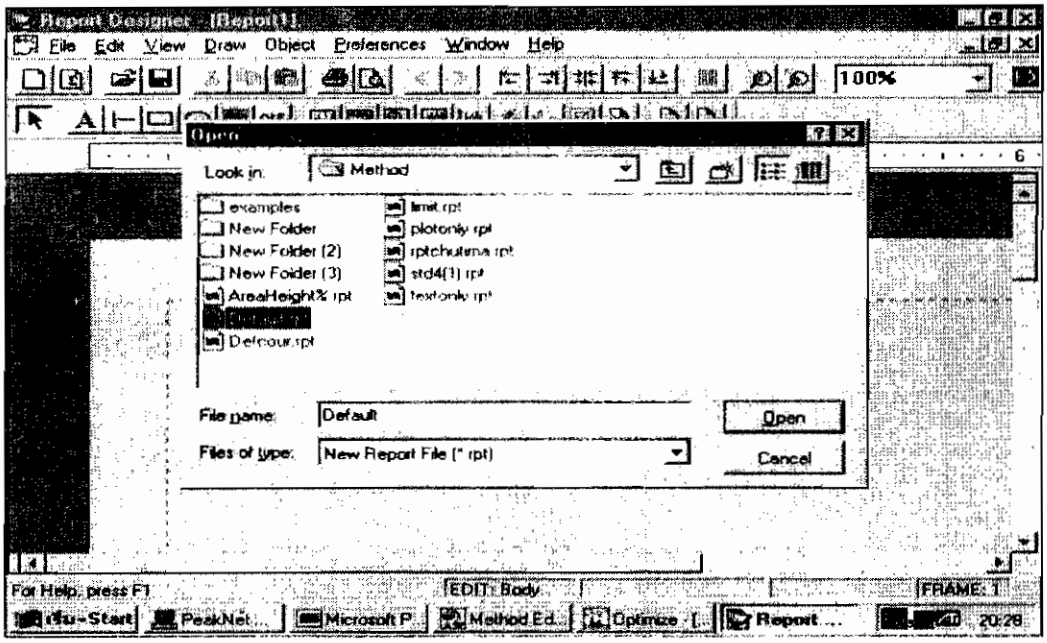
1. click ที่หน้า *Accessories*



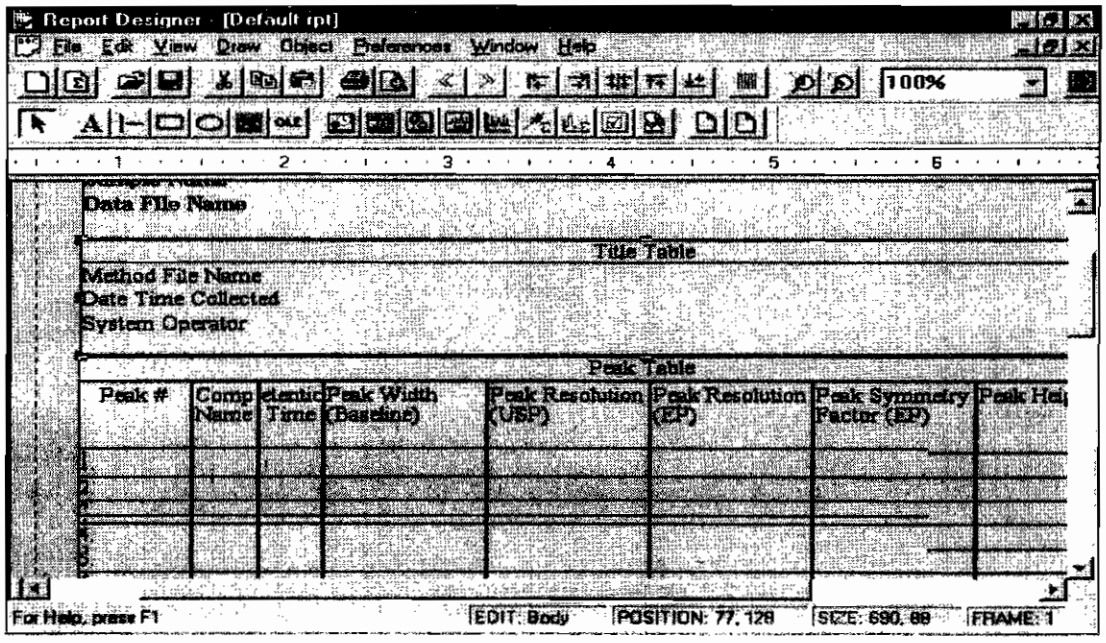
2. click ที่ *Report* จอขึ้นหน้า **Report Designer**



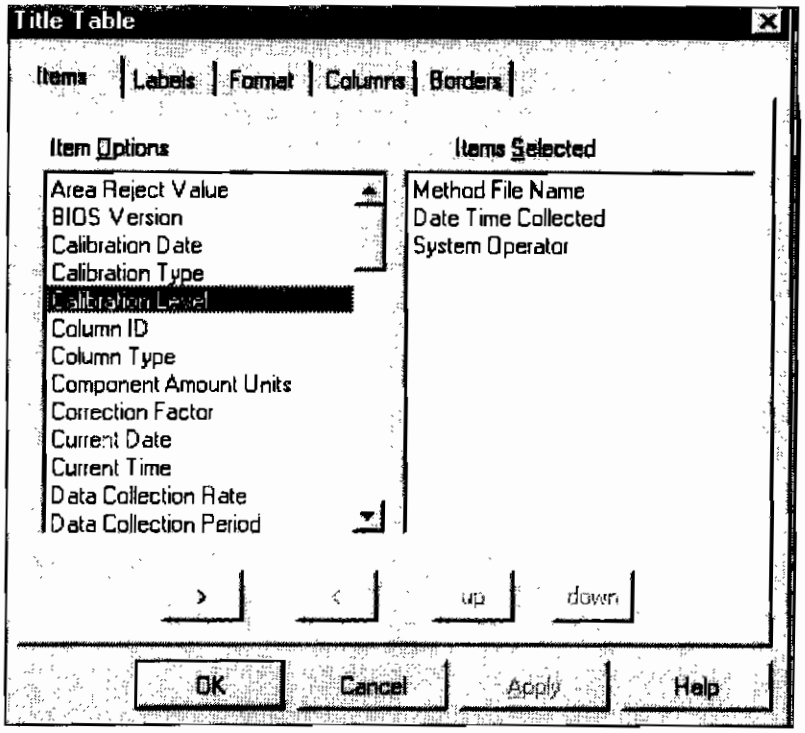
3. ที่เมนู *File* เลือก **Open** เลือก default กด open



4. ให้ click ในช่องที่ต้องการเพิ่ม หรือแก้ไข (เช่น Title Table, Peak Table) ถ้าต้องการแก้ที่ Title Table ให้ double click ที่ ช่อง Title Table

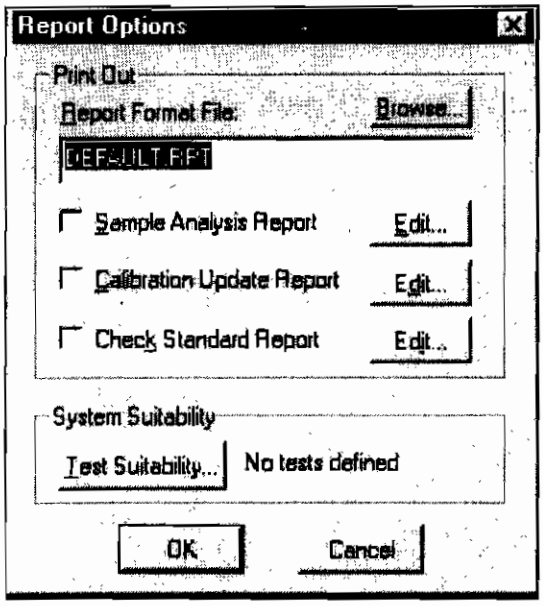


5. หรือไปที่เมนู ***Object*** เลือก **Properties** จะได้ Title Table (ที่ click เลือกไว้) ทำการเลือก Item ที่ต้องการรายงาน



6. Double click ที่ Item Options ตัวที่เลือกให้เข้าไปอยู่ใน Item Selected กด OK
7. ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit** เครื่องจะถามว่า Save หรือไม่ ให้กด Yes
8. ทำการตั้งชื่อ file ที่ต้องการ จากนั้นกด Save
9. เมื่อสร้าง Form Report ใหม่ได้แล้ว ให้ไปที่ Optimize

10. เลือก File ให้ Open file ที่ต้องการ



11. ที่ Edit เลือก Report ที่ Browse เลือก Form Report ที่ต้องการ หรือที่ทำเอาไว้ในข้อ 5

12. เลือก Open จะถามว่าจะเปลี่ยน Form ใหม่หรือไม่ เมื่อต้องการเปลี่ยนให้กด YES

2.1.16 ความรู้เกี่ยวกับ Injection Valves

✳ **ที่วาล์วมี 6 ช่อง** ดังรูป

ช่องที่ 2 ต่อมาจากปั๊ม

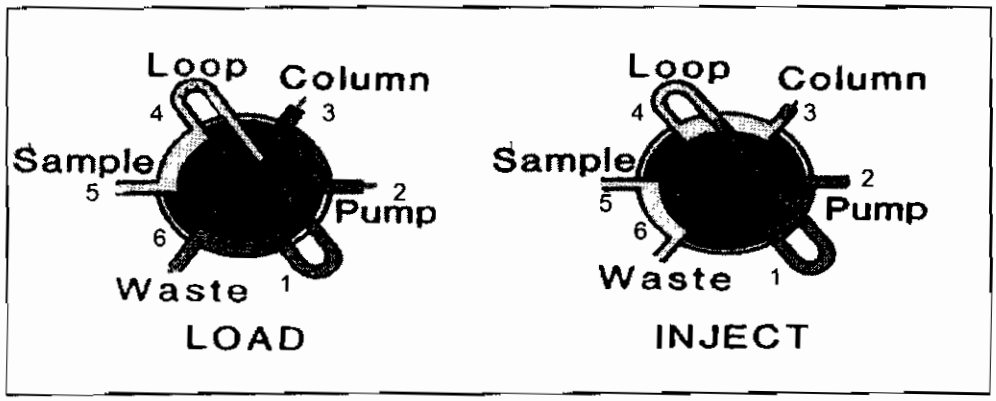
ช่องที่ 3 ไปสู่ guard column

ช่องที่ 4 และ 1 เข้าสู่ sample loop

ช่องที่ 5 และ 6 เป็น line in –out ของ sample

※ ท่อสีแดง (โผล่ออกมาด้านนอก) เป็นเส้นที่จุ่มอยู่ในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งต่ออยู่กับช่อง 6

※ เส้นสีฟ้า line ที่ 5 ต่อกับ syringe สำหรับดูดสารละลายตัวอย่าง



※ **วาล์วมี 2 สภาวะคือ LOAD และ INJECT**

สภาวะ **LOAD** : ตัวชะจากปั๊มเข้าช่อง 2 ไปช่อง 3 เพื่อเข้า guard column จากนั้นเข้าสู่ analytical column ส่วน sample ยังคงค้างอยู่ใน loop

เมื่อเข้าสู่สภาวะ **INJECT** : ตัวชะจากปั๊มจะพา sample ใน loop เข้าคอลัมน์แล้วเข้าสู่ SUPPRESSOR ตรงตำแหน่ง eluent in แล้วออกตรงตำแหน่ง eluent out เข้าสู่ตัวตรวจวัด (ช่องตัวชะ หัวสีดำ) แล้วออกย้อนกลับมาเข้า Reagen in เข้าสู่ SUPPRESSOR อีกครั้ง เป็นวิธีการของ Auto – recycle mode จากนั้นออกไป Reagen out (หัวสีเทา) สุดท้ายออกไป WASTE

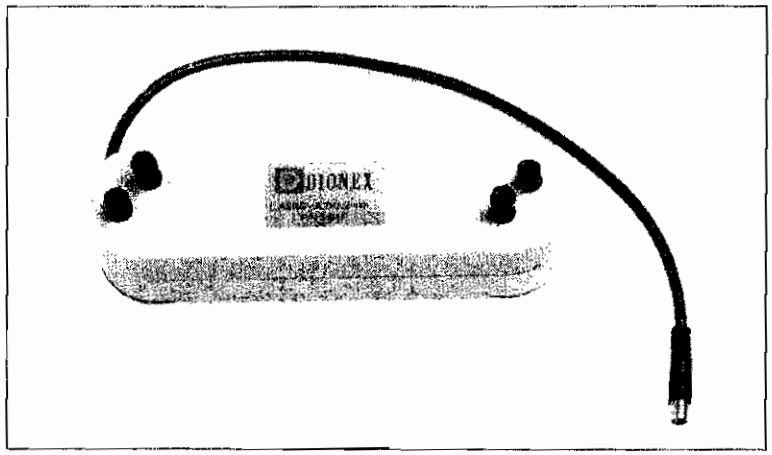
2.1.17 การ REGERNERATE SUPPRESSOR

ขั้นที่ 1

ถอดชุด Suppressor ออกจากระบบ สำหรับ anion (ASRS) ให้ ใช้ H_2SO_4 0.2 N ผ่านทาง eluent out ใช้ syringe ขนาด 1 cc ต่อเชื่อมกับช่อง eluent out โดยใช้ adaptor ค่อยๆ ออกแรงฉีดจนหมด 1cc ทำซ้ำ 10 ครั้ง (10cc) สารที่ล้างจะไหลออกทาง eluent in ถ้าสารละลายไม่ออกแสดงว่า SUPRESSOR เสีย

ขั้นที่ 2

ใช้ H_2SO_4 0.2 N ผ่านทาง Reagen out ใช้ syringe ขนาด 1 cc ต่อเชื่อมกับช่อง Reagen out โดยใช้ adaptor แล้วค่อยๆ ออกแรงฉีด จนหมด 1cc ทำซ้ำ 10 ครั้ง (10cc) สารที่ล้างจะไหลออกทาง Reagen in ถ้าสารละลายไม่ออกแสดงว่า SUPRESSOR เสีย



รูปที่ 5.3 Suppressor

ข้อควรระวัง

*** เมื่อเสร็จทั้ง 2 ขั้นตอน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ทำซ้ำ ขั้นที่ 1 และ 2 ด้วยน้ำ DI (Deionize water) 15 ครั้งๆละ 1cc ควรทำการ regenerate SUPPRESSOR เมื่อพบปัญหา Baseline ไม่นิ่ง

กรณี cation (CSRS) ให้ใช้สารละลาย 0.2 N NaOH เป็นตัว regenerate แล้วทำเช่นเดียวกับ anion ***

ข้อสังเกต ขณะ SUPPRESSOR ทำงาน

*** ที่ Reagen out จะต้องมีฟองอากาศไหลออก ถ้าไม่มีแสดงว่า ***

1. ไม่มีกระแสไฟฟ้าเข้า SUPPRESSOR
2. SUPPREESOR เสีย

2.2 **วิธีการใช้เครื่องสำหรับการวิเคราะห์โลหะทรานสิชัน หรือโลหะหนัก**
มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 วิธีเปิดเครื่อง IC

ทำเช่นเดียวกับแคตไอออนและแอนไอออน ในหัวข้อ 2.1.1 แต่ให้เปิดคีเทคเตอร์ที่ AD 20 แทน CD20 และวาง eluent ลงใน line C จากนั้นล้าง line และไล่ฟองอากาศออกจากปั๊มเช่นเดียวกับที่กล่าวมาในแอนไอออน และแคตไอออน

2.1.2 การเตรียมเครื่องมือในกรณีวิเคราะห์ Transition Metals

1. ที่เครื่อง GP50 Gradient Pump

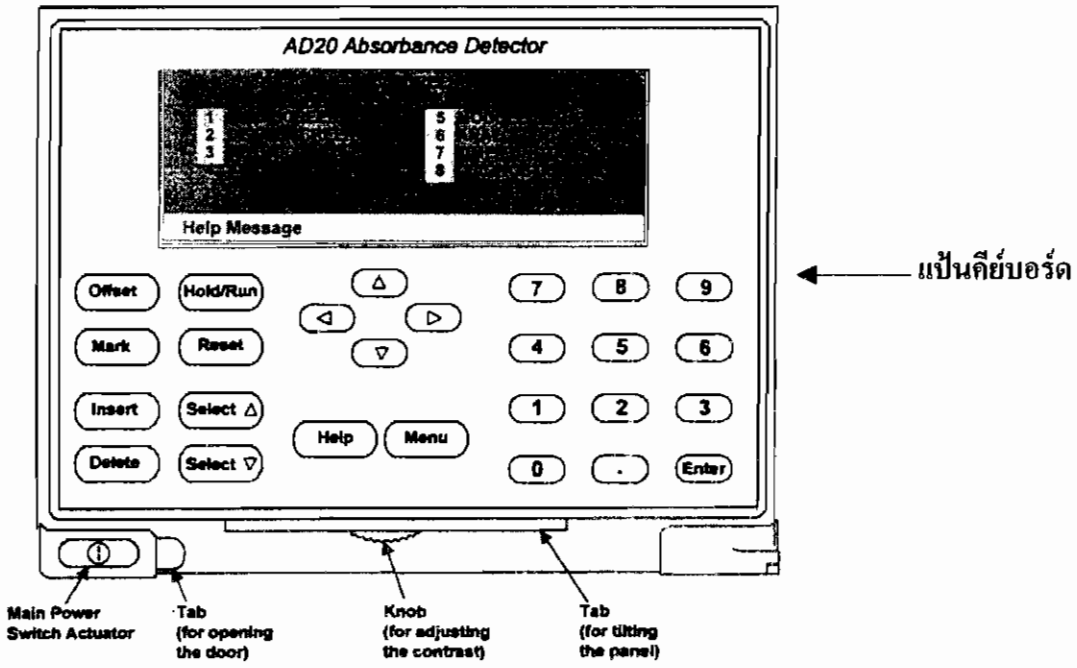
ตัวชะสำหรับทรานซิชัน ท่อที่ออกมาจากขวดตัวชะ ที่ EO1 จะเป็นท่อ line C ที่จอภาพของเครื่อง GP50 Gradient Pump จะต้องแสดงเฉพาะ % C เท่านั้น (100%) ถ้าหากว่าไม่เป็น 100 % ให้เลื่อน cursor โดยใช้ลูกศรสี่ทิศทางเลื่อน ◄▲▼► ไปอยู่ที่ C แล้วพิมพ์ 100 กด Enter ส่วนค่าอื่นๆ จะปรับเป็นศูนย์โดยอัตโนมัติ

ข้อสังเกต

*** ค่า psi จะคงที่ประมาณ 1800-1900 psi และค่อนข้างจะนิ่ง ค่าที่ต่างออกไปจากนี้หรือมีการแก่วงมาก แสดงว่ามีฟองอากาศอยู่ในท่อของ eluent ต้องปิดปั๊มและ ทำการ PRIME ใหม่อีกครั้ง ***

2. <u>ที่ตัวตรวจวัด (AD 20 Absorbance Detector)</u>

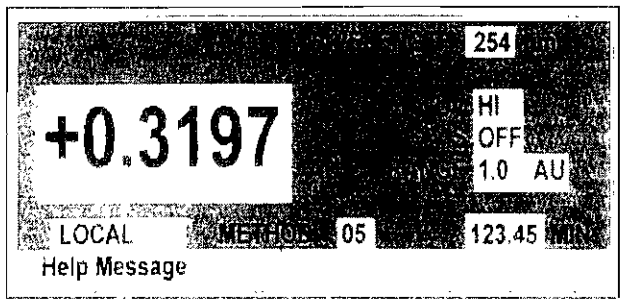
2.1 ที่จอภาพของเครื่อง AD20 Absorbanc e Detector เลือก Local กด Enter



2.2 เลื่อน cursor โดยใช้ลูกศรแสดงทิศเลื่อนไปที่ Wavelength พิมพ์ค่า **530 nm** กด Enter

ที่ **UV** ใช้ปุ่ม Select เลือก **OFF** และ

ที่ **VIS** ใช้ปุ่ม Select เลือก **LOW**



3. ที่เครื่องคอมพิวเตอร์

3.1) เริ่มที่ Start เลื่อน cursor ไปที่ Program เลือก Dionex PeakNet และ click ที่ MainMenu 1 ครั้ง

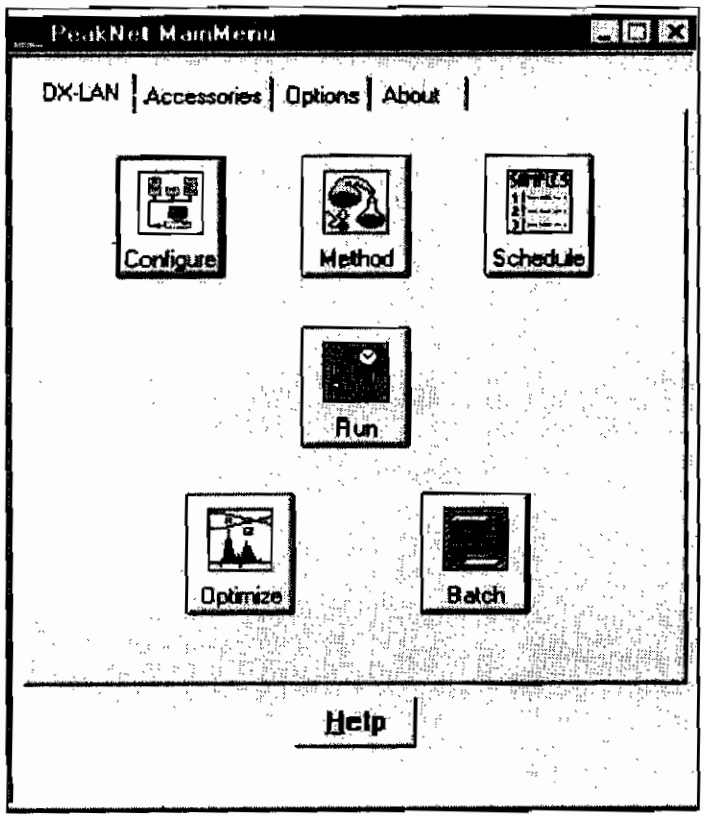
3.2) ที่หน้าจอจะปรากฏ PeakNet MainMenu

(ตามปกติเมื่อเปิดเครื่องคอมพิวเตอร์เครื่องจะปรากฏ PeakNet MainMenu ให้เลย ในกรณีที่เครื่องไม่แสดง PeakNet MainMenu จึงทำข้อ **13.1 – 13.2**)

2.2.3 การสร้าง New Method เมื่อต้องการเริ่มวิเคราะห์โลหะทรานซิชัน

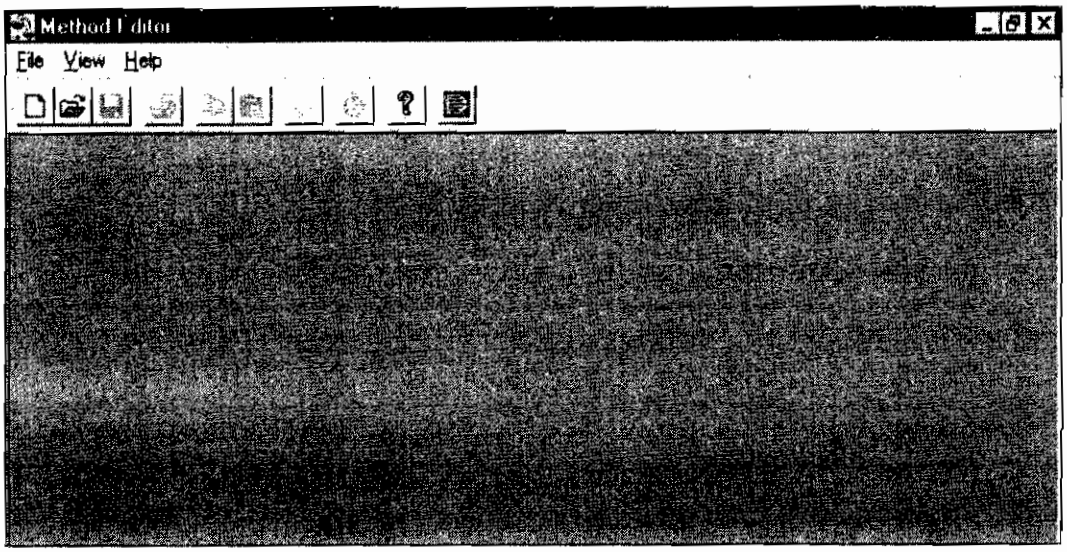
※ **ที่หน้าจอ PeakNet MainMenu** จะมี Icons 6 ชนิด คือ

Configure, Method, Schedule, Run, Optimize และ Batch

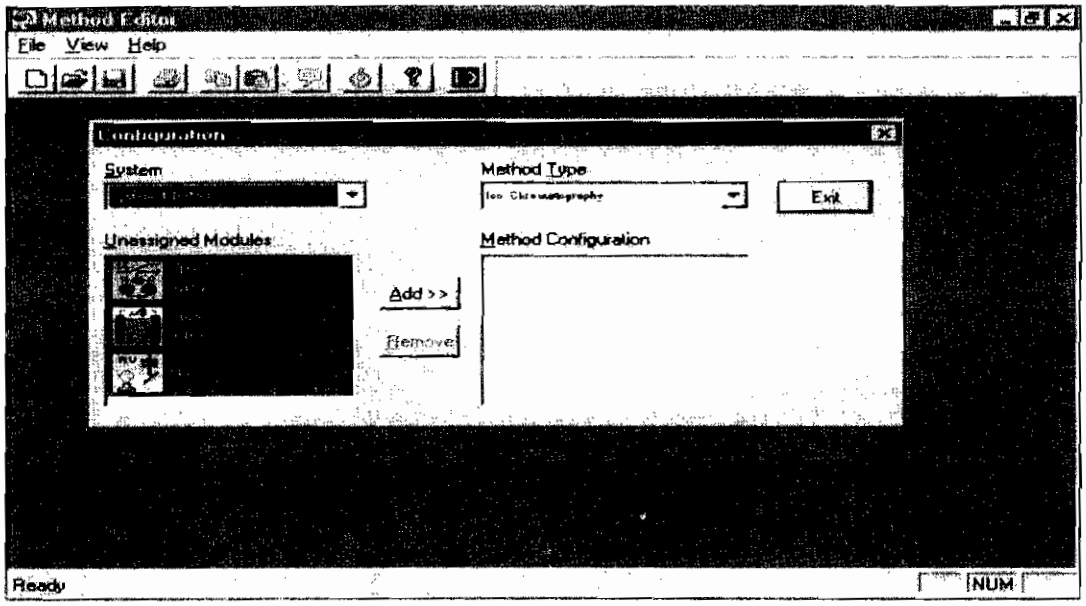


1. เลือก click ที่ Icon ***Method***

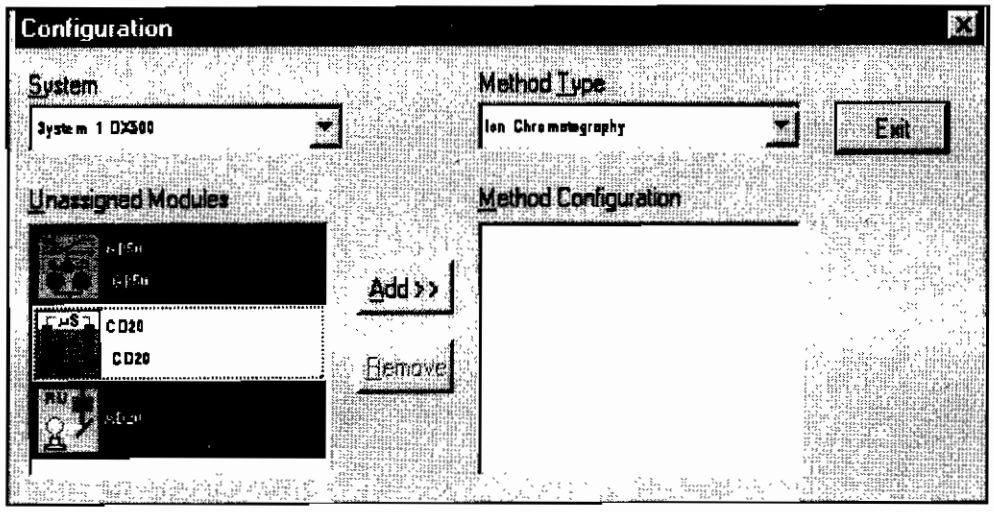
จะได้หน้าจอเป็น **Method Editor**



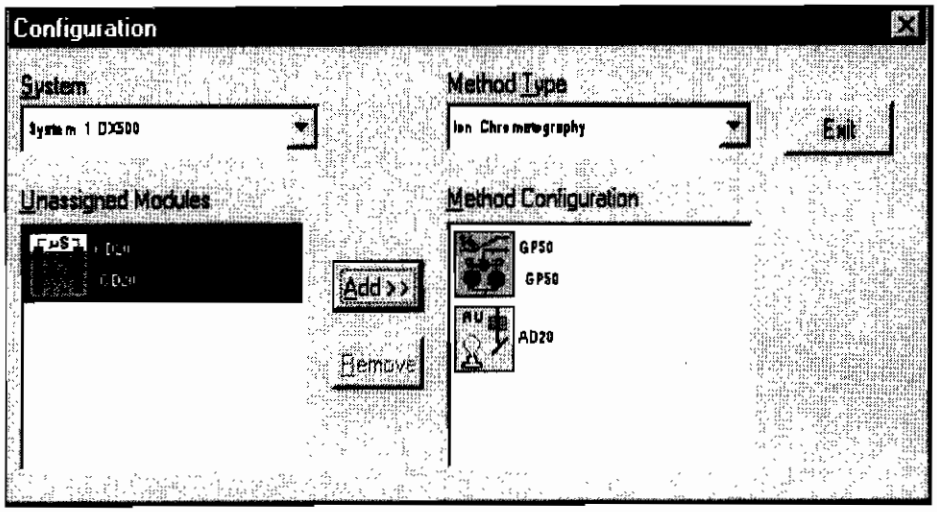
2. click ที่เมนู ***File*** เลือก **New** หน้าจอจะปรากฏ **Configuration** ที่ **Unassigned Modules** มีสีน้ำเงินเข้ม ให้ click เมาส์ที่ Icon ของปั๊ม (GP50) ตัวตรวจวัด CD20 และ ตัวตรวจวัด AD20 ให้สีน้ำเงินเข้มหายไป



3. จากนั้นใช้เมาส์ click เลือก Icon ***GP 50*** และ **AD *20*** (ตัวตรวจวัดที่ใช้วิเคราะห์) จะได้สีน้ำเงินเข้ม ซึ่งแสดงการเลือก Icon ที่ต้องการ config

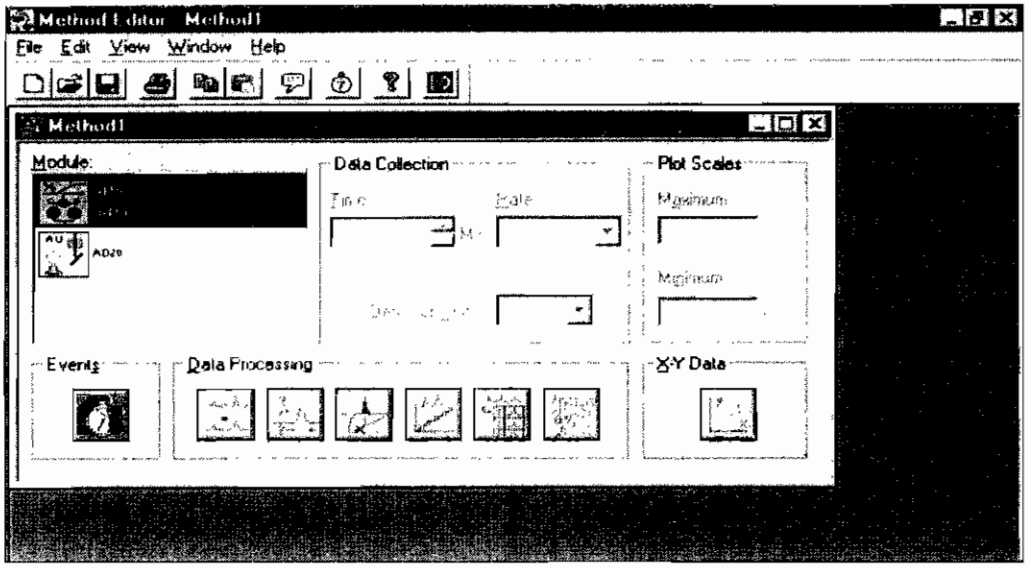


4. ใช้เมาส์ click ที่ Add >> จะปรากฏ หน้าจอ Method Configuration มี Icon ***GP 50*** และ Icon ***AD20***

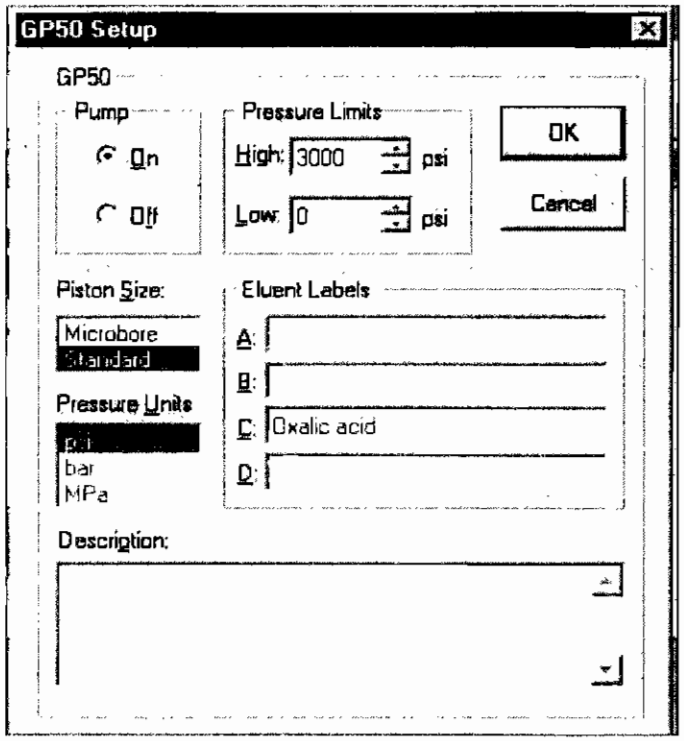


5. ที่ **Method Type** ใช้เมาส์ click ที่ drop drown list เลือก **Ion Chromatography** แล้วใช้เมาส์ กด **Exit**

6. จอปรากฏ **Method1** ทำการเลือกปั๊มก่อน โดยใช้เมาส์ click ที่ Icon ***GP50*** ให้ active



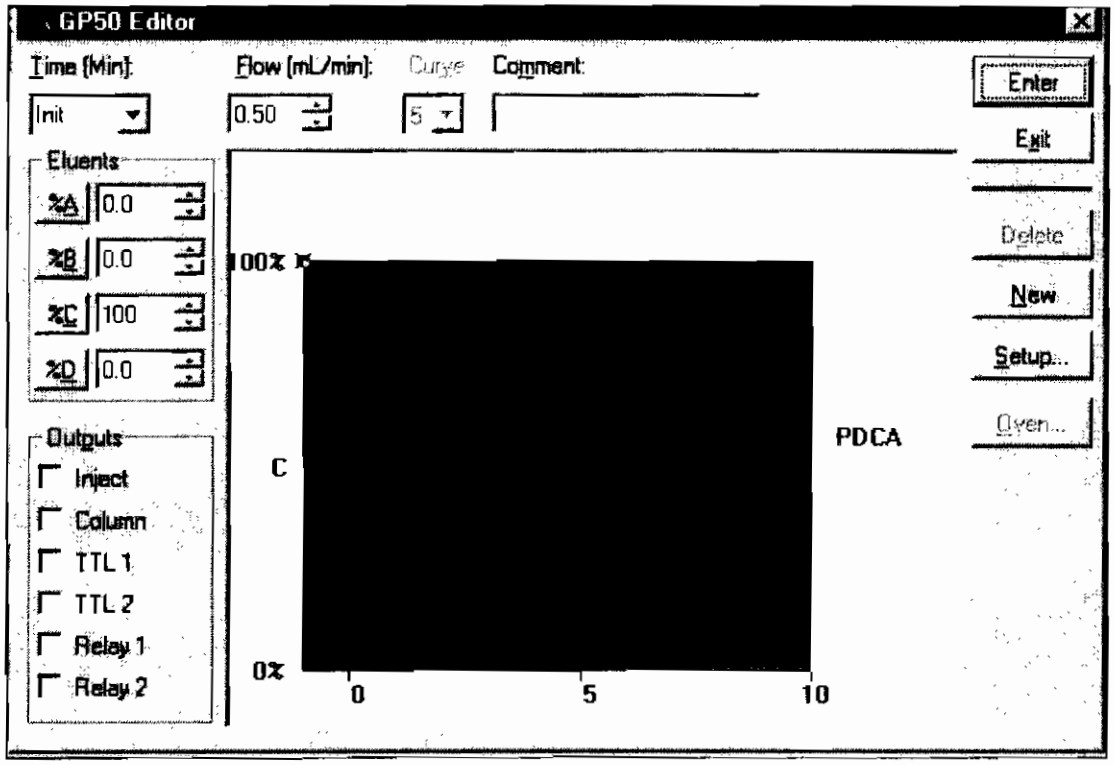
7. แล้ว click ที่ **Event** ให้ active จะได้ หน้าจอเป็น GP50 Setup



7. ที่ GP50 Setup ให้ตั้งค่าต่างๆ ดังนี้

- ที่ Pump เลือก On
- ที่ Pressure Limits High เลือก 3000 psi (สูงสุดไม่เกิน 5000 psi) ,
  Low เลือก 0 psi
- ที่ Piston Size เลือก standard
- ที่ Pressure Unit เลือก psi
- ที่ Eluent Labels ใช้เมาส์ click ที่ C แล้วพิมพ์ชื่อตัวชะที่จะใช้ในการทดลอง ในที่นี่ใช้ PDCA หรือ Oxalic acid สำหรับ Transition Metals หรือ โลหะหนัก
- ที่ Description ให้พิมพ์รายละเอียดเกี่ยวกับการวิเคราะห์ตามต้องการ **กด OK**

8. ที่จอจะปรากฏ GP50 Editor เพื่อกำหนดเวลาในการที่ปั๊มจะทำหน้าที่ต่างๆ ดังนี้



8.1) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก init ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.0
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก C (Transition) ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง **กด Enter**
ในจอแสดงค่า จะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง

8.2) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก 0.00 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.0
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก C(Transition) ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง **กด Enter**
ในจอแสดงค่าจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง

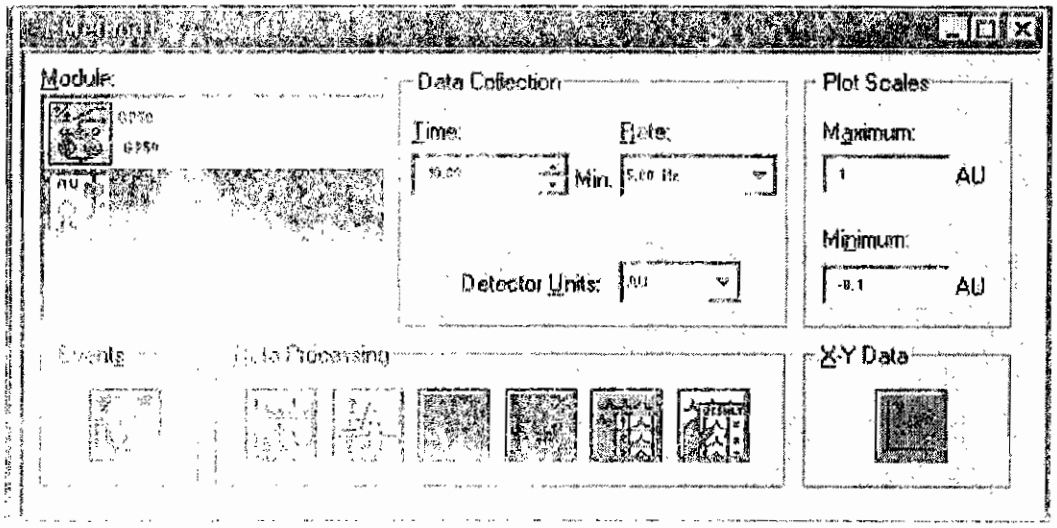
8.3) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) เลือก 0.1 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.0
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก C (Transition) ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง
ใช้เมาส์ชี้ที่ Curve เลือก 5 (mixing profile ของ ตัวชะ)
ที่ช่อง Outputs ให้ใส่เครื่องหมายถูกหน้า Inject **กด Enter**
ในจอภาพจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง
(เมื่อใช้คำสั่ง run จะใช้เวลา 0.1 นาที Injection valve จึงจะเลื่อนจาก Load Position มาที่ Inject Position)

8.4) ใช้เมาส์กด drop down list ที่ Time (Min.) พิมพ์ 2.0 ที่ Flow (mL/min) พิมพ์ค่า 1.5
ใช้เมาส์ชี้ที่ Eluent เลือก C (Transition) ให้พิมพ์ 100% ส่วนตัวอื่นๆ ปรับค่าให้มีค่า 0
ที่ Comment ให้พิมพ์เงื่อนไขที่ตั้ง
ใช้เมาส์ชี้ที่ Curve เลือก 5 (mixing profile ของ ตัวชะ)
ที่ช่อง Outputs เอาเครื่องหมายถูก หน้า Inject ออก **กด Enter**
ในจอภาพจะแสดงกราฟของ % ตัวชะ ของเวลาที่ตั้ง

***** **กด EXIT** เครื่องคอมพิวเตอร์จะถามว่า SAVE หรือไม่ ให้กด **YES** *****

2. หน้าจอขึ้น Method:

เลือกตัวอย่างที่ต้องการใช้งาน แล้ว click ที่ AD20 จะปรากฏหน้าจอดังรูป



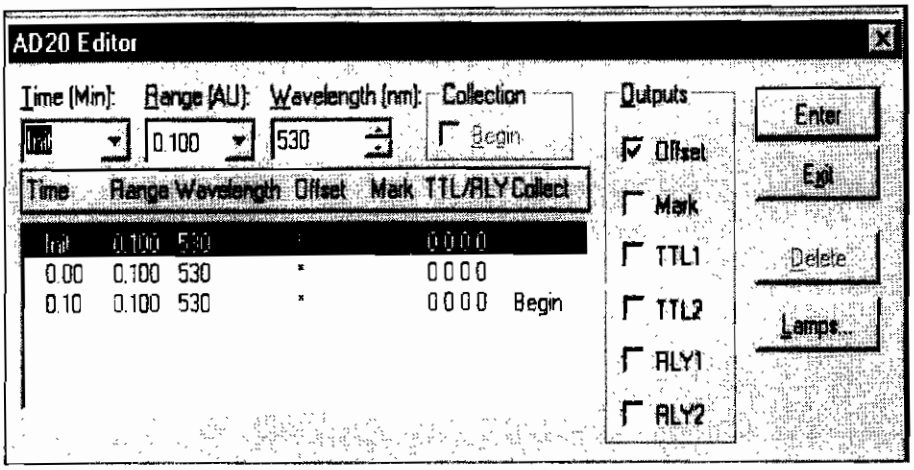
ที่ Data Collection

2.1) กำหนดจำนวนจุดข้อมูลต่ำ 20 (ขึ้นอยู่กับที่ใช้ในการ run สารตัวอย่าง) สำหรับ Transition

- เลือกสัญญาณที่ Rate เลือก 5.00 Hz
- เลือกสัญญาณที่ Detector Unit เลือก AU
- กำหนดค่า Maximum เลือก 1.0 AU และ
- Minimum เลือก -0.1 AU

2.2) ให้ทำการ click ที่ Icon Event

จะปรากฏ AD20 Editor



◈ ใช้เมาส์ชี้ที่ Outputs click ที่หน้า Offset เพื่อปรับค่า Absorbance ให้เป็นศูนย์ที่เวลาเริ่มต้น

9.2) ◈ ที่ Time เลือก init

◈ ที่ Range (AU) เลือก 0.1

◈ ที่ Wavelength (nm) พิมพ์ค่า 530 nm **กด Enter**

(สังเกตว่ามีเครื่องหมาย * อยู่ที่บรรทัดนั้น)

9.3) ◈ ที่ Time เลือก 0

◈ ที่ Range(AU) เลือก 0.1

◈ ที่ Wavelength (nm) พิมพ์ค่า 530 nm

◈ ที่ Collection เอาเครื่องหมายหน้า Begin ออก แล้วใส่เครื่องหมายที่หน้า Offset

กด Enter (สังเกตว่ามีเครื่องหมาย * อยู่ที่บรรทัดนั้น)

9.4) ◈ ที่ Time พิมพ์ 0.10 (ต้องเลือกให้ตรงกับค่าที่ตั้งไว้ที่ปั๊ม)

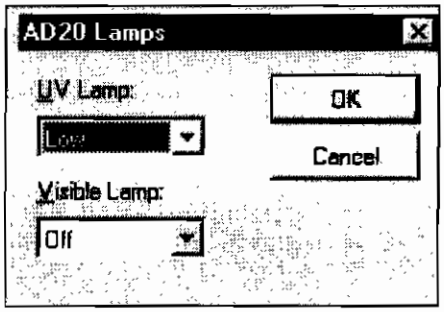
◈ ที่ Range (AU) เลือก 0.1

◈ ที่ Wavelength (nm) พิมพ์ค่า 530 nm

◈ ที่ Collection เลือก Begin ที่ Output เลือก Offset **กด Enter**

9.5) ที่ด้านขวาของจอ ให้ใช้เมาส์ click เลือก **Lamps** ที่จอจะปรากฏ

AD20 Lamps



◈ ที่ UV Lamp เลือก Off

◈ ที่ Visible Lamp เลือก Low เพราะ run ในช่วงความยาวคลื่น530 nm

กด **OK**

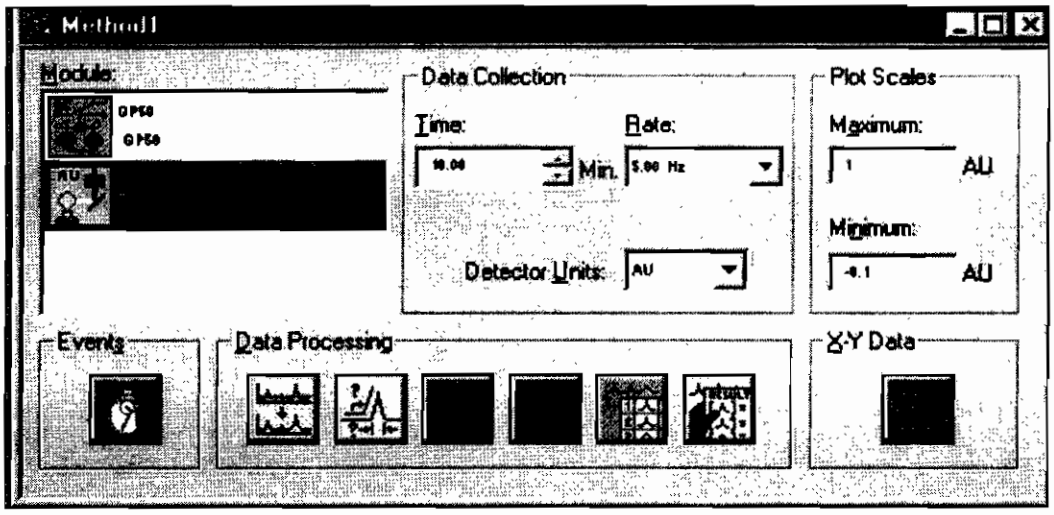
***** **เลือก EXIT** เครื่องคอมพิวเตอร์ถามว่า SAVE หรือไม่ ตอบ **YES** *****

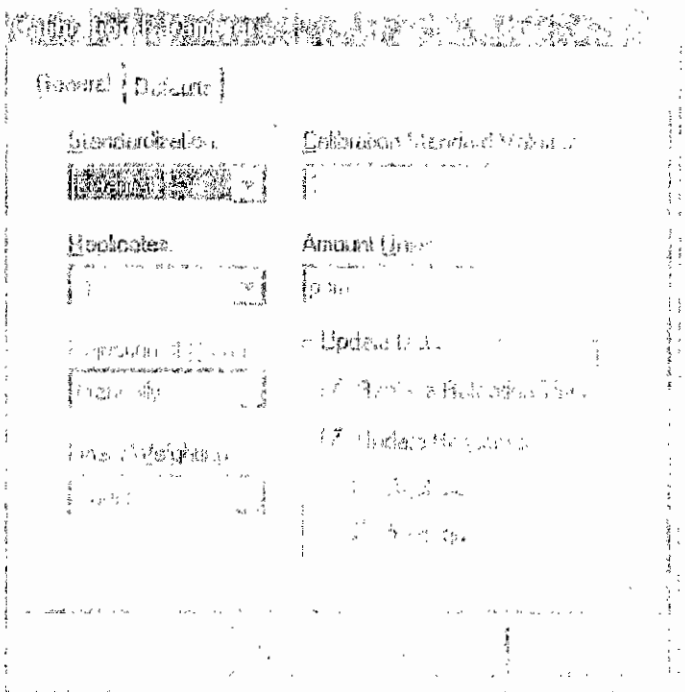
※ จอจะกลับมาปรากฏหน้า Method Editor (Method1)

※ ที่จอด้านล่างจะปรากฏ Icons 6 ชนิด ที่ Data Processing ได้แก่

Smooting Parameter, Integration Parameter, Data Event,

Calibration Parameter, Component table, Report Option




General
Duplicate
Standard Deviation
Calibration Standard Value
Duplicates
Amount Unit
Update

เลือก General

☺ ที่ Standardization เลือก External

☺ ที่ Replicates เลือก 1

※ ในกรณีที่ต้องการฉีดสารละลายมาตรฐานมากกว่า 1 ครั้ง ที่ Update Data ให้ click ที่ Average

☺ ที่ Replicates ให้ใส่ตัวเลขแสดงจำนวนครั้งที่ต้องการ **กด OK**

☺ ที่ Calibration Standard Volume เลือก 1

☺ ที่ Amount Units พิมพ์ ppm

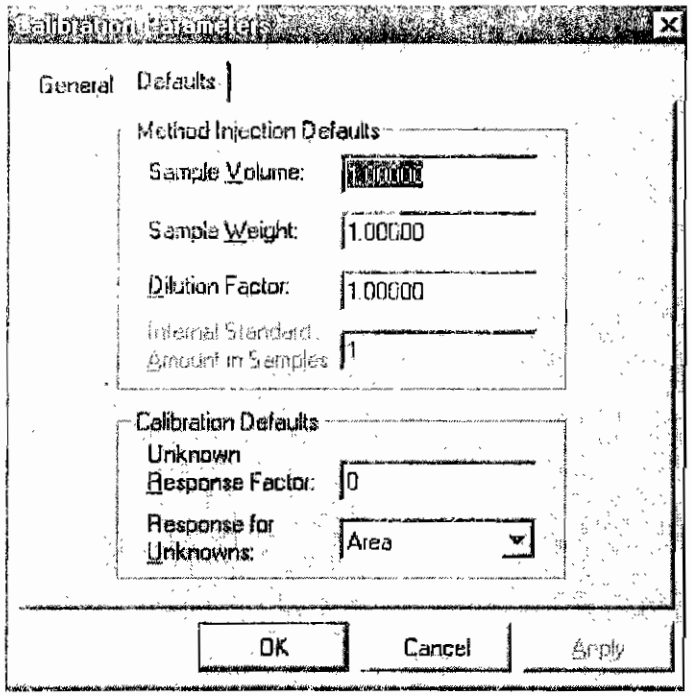
☺ ที่ Update Data ขีดเครื่องหมายถูก ทั้ง 2 ตำแหน่ง

(Replace Retention time และ Update Response)

และ click ที่ Replace

☺ ที่ Linear Weighting เลือก Equal

เลือก Defaults



☺ ที่ Method Injection Defaults ใส่ค่าเป็น 1 ทุกบรรทัด

☺ ที่ Calibration Defaults

Response Factor = 0

Response for Unknown = Area **กด OK**

※ จอจะปรากฏ Method Editor (Method1)

14. ❖ ที่ Data Processing เลือกรูปที่ 5 (Component tables)

❖ ที่ Component table มีเฉพาะที่ว่าง ปล่อยไว้ก่อนให้กรอกข้อมูลหลังจาก run สารแล้ว **กด OK**

※ จอจะปรากฏ Method Editor (Method1)

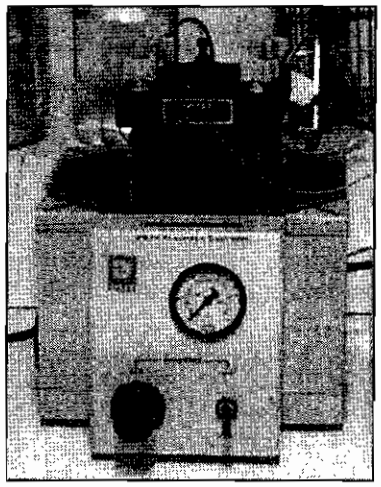
15. ที่ Data Processing เลือกรูปที่ 6 (Report Options)

ที่ Report Option ถ้าหากว่าไม่ต้องการให้เครื่องพิมพ์ผลหลัง run เสร็จ ให้เอาเครื่องหมายถูก ออกหมดทุกช่อง **กด OK**

16. ไปที่ file เลือก save as ใส่ชื่อ method ตามต้องการ (ควรมีระบบการใส่ชื่อ method เพื่อกันการหลงลืม เช่น ถ้าเป็น method ของ transition ให้ใช้ TM นำหน้าแล้วตามด้วย วัน เดือน ปี) กด save

17. ไปที่ file เลือก exit จะกลับไปสู่หน้าจอ PeakNet MainMenu

18. นำ post column reagent ที่บรรจุในขวดพลาสติกขนาด 1.0 ลิตร ใส่ลงใน PC 10 และทำการปรับความดันให้ได้ประมาณ 40 psi



รูปที่ 5.4 PC 10

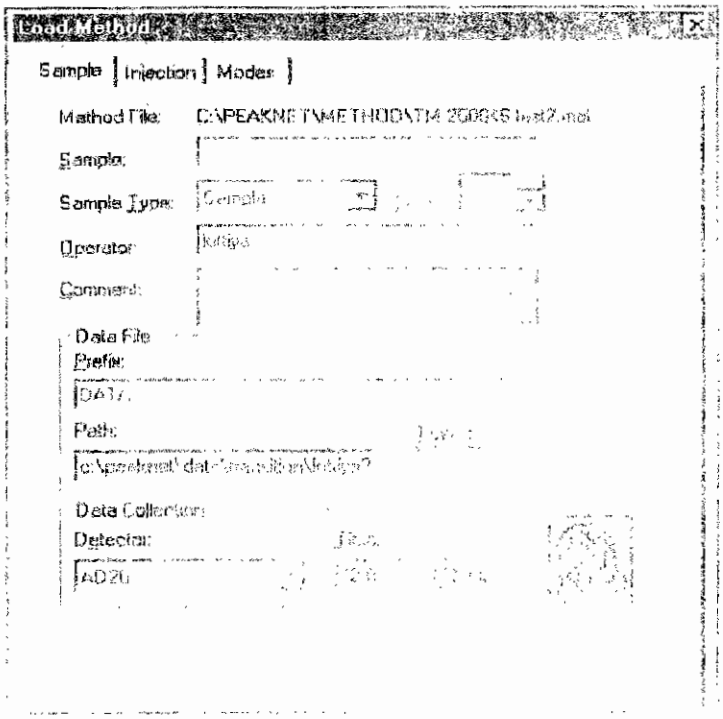
2.2.4 เริ่มทำการฉีดสารละลาย

ที่ PeakNet MainMenu

1. ↻ ให้เลือก Icon ***Run*** จะปรากฏหน้าจอ PeakNet Run DX 500

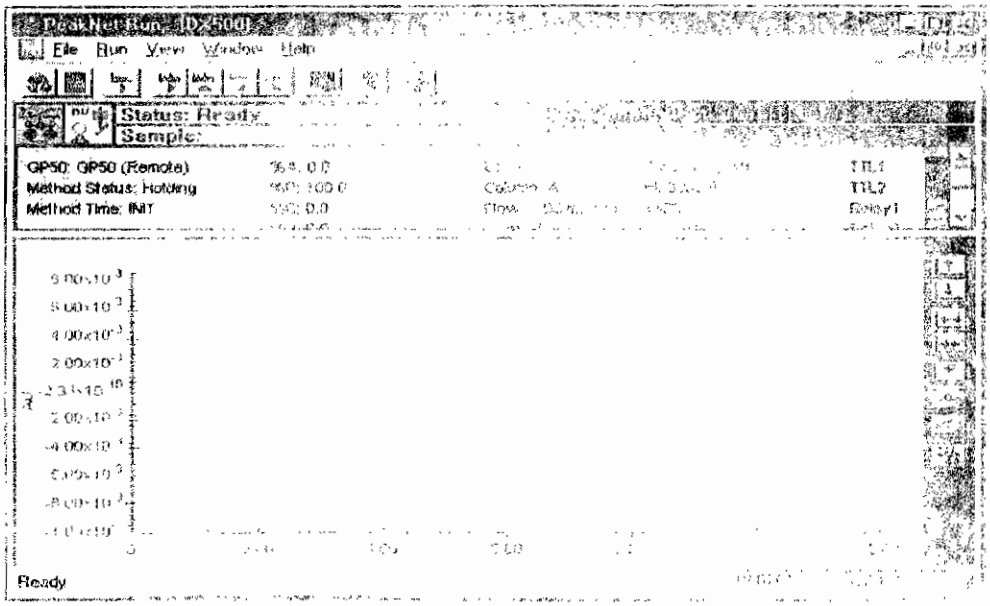
   ↻ ที่เมนู ***File*** เลือก **Load Method** และเลือก Method ที่สร้างไว้ (?????)

- เลือก (Open) ขั้นตอนการดูแลรักษา Load Method



- กด Enter หรือกด "ตกลง"

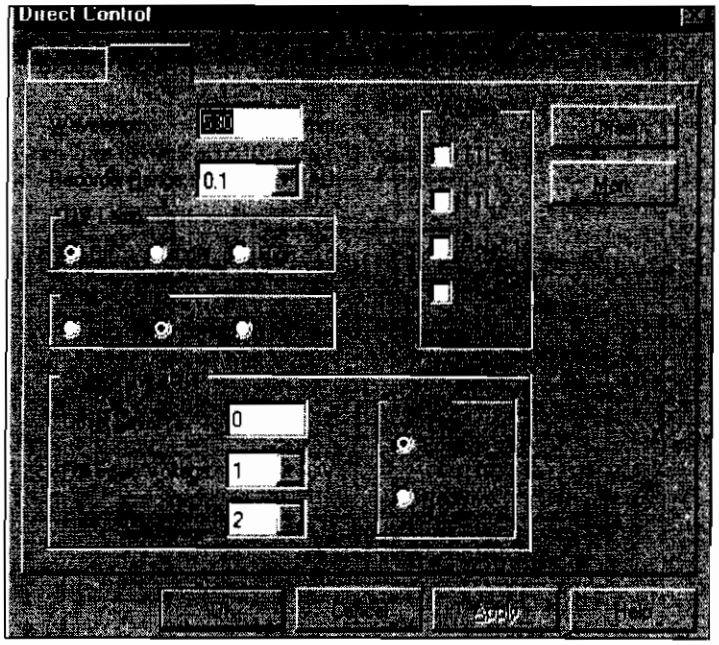
- จะขึ้นหน้าจอการทำงานของเครื่องมือ ดังรูป



2. click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Direct Control** จอปรากฏ Direct Control ให้ click ที่ GP50 และ AD20 จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับ GP50 และ CD20

<u>เลือก AD20</u> จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวตรวจวัด กด Offset ค่าบนตัวตรวจวัต (AD20) เป็นศูนย์

กด OK



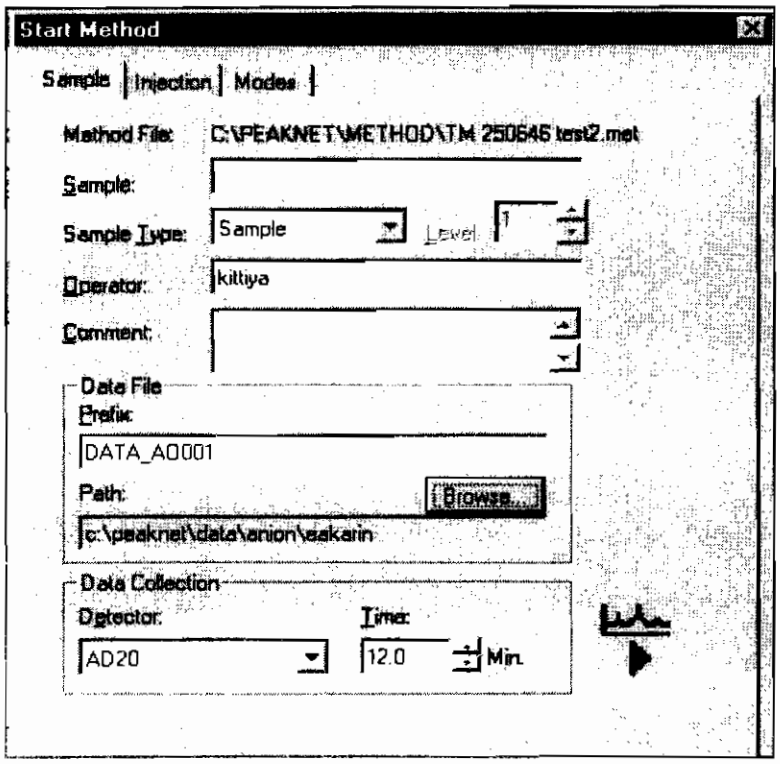
3. ใช้เมาส์ click เมนู ***Run*** เลือก **Baseline** ถ้า Baseline ไม่นิ่งก็ให้รอสักระยะหนึ่ง (10นาที)

หมายเหตุ

***** การตรวจดูความเรียบของเส้น baseline โดยเลือก Icon Scale (ตัวล่างสุดขวามือ) ที่ scale แก้ค่า minimum เป็น –0.2 และ Maximum เป็น 0.2 กด OK**

4. นำสายยางที่ออกจาก inject port จุ่มในสารละลายที่ต้องการ run ใช้เข็มฉีดดูดสารละลายจากสายยางทางเข้า loop ประมาณ 2 ml (ใช้ระบบดูดสารละลายย้อนกลับในการเติมสารตัวอย่างเข้าใน sample loop)

5. ✏ click ที่เมนู ***Run*** เลือก **Start** จะปรากฏหน้า **Start Method**



✏ ที่ **Sample** พิมพ์ชื่อ **Sample**

✏ ที่ **Operator** พิมพ์ **operation name**

(โดยปกติจะ run standard ที่มีความเข้มข้น ในชุดนั้นก่อน เพื่อตรวจสอบชื่อและตำแหน่งของพีกต่างๆ)

✏ ที่ **Sample Type** เลือก **Sample**

6. ที่ **Browse** เลือก directory และ subdirectory หรือ create ใหม่ สำหรับเป็นที่เก็บข้อมูลที่เราต้องการไม่ให้ปะปนกับผู้อื่น **กด Enter**

7. เมื่อ run สารตัวแรกเสร็จ click ที่เมนู ***File*** เลือก **Exit** ให้ทำการ Integrate และ ใส่ชื่อพีกก่อน (name peak) ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในแอนไอออนและแคตไอออน

2.2.5 การ Integrate และ Label ชื่อพีก

การ Integrate และ Label ชื่อพีก ดูในหัวข้อ 2.I.5

2.2.6 ทำการ Run สารมาตรฐานและตัวอย่างต่อๆ กัน

การ Run สารมาตรฐานและตัวอย่างต่อๆ กัน ดูในหัวข้อ 2.I.6

2.2.7 การดูผลของ Standrad Curve หลังจาก Run สารมาตรฐานเสร็จแล้ว

การดูผลของ Standrad Curve หลังจากRun สารมาตรฐานเสร็จแล้ว ดูในหัวข้อ 2.I.7

2.2.8 ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับการสร้าง Calibration Curve

ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับการสร้าง Calibration Curve ดูในหัวข้อ 2.1.8

2.2.9 การทำงานต่าง ๆ ที่ Icon Batch
การซ้อนทับพีก
การพิมพ์ Report สารตัวอย่าง
การปิดเครื่อง

ทำเช่นเดียวกับวิธีการใช้เครื่องสำหรับแคตไอออนและแอนไอออน

2.2.10 การเปลี่ยนระบบจากการวิเคราะห์
Cations หรือ Anions เป็น Transition Metals

1. ถอดคอลัมน์ AS 12A หรือ CS 12A ออกจากระบบ
2. เปลี่ยนขวดด่างชะเป็น PDCA หรือ Oxalic acid ในขวดให้ต่อกับ line C
3. บรรจุ Post Column Derivatizing reagent ในขวดพลาสติก และใส่ไว้ใน PC 10ไม่ให้ถูกแสง

4. เอา Suppreesor ออกเก็บไว้ ให้ปิดที่ปลาย Eluent in – out และ Reagent in – out เพราะไม่ต้องใช้สำหรับการวิเคราะห์ Transition Metals

5. จากทางออกของปั๊มยังไม่ให้ต่อเข้าคอลัมน์ ให้ล้าง line ของระบบและปั๊มก่อน เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนตัวชะใหม่ ให้ทำการดูดสารละลายทาง Priming Block Valve โดยหมุนปุ่มทวนเข็ม ½ - 1 รอบ ที่ปั๊ม GP50 เลือก %C 100 เปิดปั๊มและใช้เข็มดูด 20 CC ทำเช่นนี้ 2 – 3 ครั้ง แล้วทำการ Priming อีกประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงต่อเข้ากับ CG 5A (Guard column) ตามทิศของลูกศร

6. ทำการเปิดปั๊มเพื่อล้างเฉพาะ Guard column

7. จากนั้นต่อเข้ากับ Analytical Column CS 5A

8. ทำการเปิดปั๊มเพื่อล้างคอลัมน์ก่อนประมาณ 5 นาที และเพื่อตรวจดูว่าคอลัมน์ไม่ตัน

9. ต่อคอลัมน์เข้ากับ UV detector โดยผ่าน mixing coil

10. จากขวด PAR ต่อปลายท่อเข้าสู่ UV detector

11. ทำการเก็บคอลัมน์เดิมที่ใช้อยู่ปิดปลายคอลัมน์ให้เรียบร้อย ระวัง! Ferrule หาย

12. ทำการเปิดปั๊มเพื่อ equilibrate คอลัมน์ ประมาณ 20 นาที

13. ที่ PC 10 เปิด ON SET 40 Psi

14. ที่ AD20 Absorbancc Detector
    เลือก Local ที่ UV เลือก OFF ที่ VIS เลือก LOW ที่ wave length เลือก 530 nm
    กด Enter กด OFF SET

15. เครื่องมือพร้อมที่จะทำการวิเคราะห์ Transition Metals

2.2.11 การเตรียม PDCA Eluent

PDCA Eluent สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. 7 mM PDCA (PDCA = 1.1698 g.; MW. = 167.12)
2. 66 mM KOH (KOH = 3.7033 g.; MW. = 56.11)
3. 74 mM Formic Acid (Formic Acid = 2.8485 ml.; MW. = 46.05; 99%; d = 1.20)
4. 5.6 mM K_2SO_4 (K_2SO_4 = 0.9759 g.; MW. = 174.27)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง KOH 3.7033 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย DI-water ปริมาณเล็กน้อย
2. ชั่ง PDCA 1.1698 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย สารละลาย KOH จากข้อ 1 (เนื่องจาก PDCA ละลายในเบสเท่านั้น) แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml.
3. ชั่ง K_2SO_4 0.9759 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย DI-water ปริมาณเล็กน้อย แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 2
4. ปิเปต HCOOH 2.8485 g. แล้วค่อย ๆ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรในข้อ 3
5. เติม DI-water จนปริมาตรเกือบ 1000 ml.
6. ทำการปรับ pH ด้วย KOH และ HCOOH ให้มี pH 4.5
7. ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1000 ml. แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm.
8. นำ PDCA Eluent ที่เตรียมได้ไปทำการ sonicate 15 นาที เพื่อไล่อากาศออก ก่อนนำไปใช้

2.2.12 การเตรียม Oxalic Eluent

Oxalic Acid Eluent สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. 80 mM Oxalic Acid (Oxalic acid = 10.0856 g.; MW. = 126.07 g/mol)
2. 100 mM Tetramethylammonium hydroxide (Tetramethylammonium hydroxide = 90.2574 ml; MW. = 91.16 g/mol; 10%; d = 1.01)
3. 50 mM Potassium Hydroxide (KOH = 2.8055 g.;MW. = 56.11 g/mol)

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Oxalic Acid 10.0856 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย DI-water ปริมาณเล็กน้อย แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตร 1000 ml.
2. ปิเปต Tetramethylammonium hydroxide 90.2574 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรข้อ 1
3. ชั่ง KOH 2.8055 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย DI-water ปริมาณเล็กน้อย แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรข้อ 2
4. เติม DI-water จนปริมาตรเกือบ 1000 ml.
5. ทำการปรับ pH ด้วย KOH และ oxalic acid ให้มี pH 4.5
6. ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1000 ml. แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm.
7. นำ Oxalie Acid Eluent ที่เตรียมได้ไปทำการ sonicate 15 นาที เพื่อไล่อากาศออก ก่อนนำไปใช้

2.2.13 การเตรียม PAR (Post Column Reagent)

PAR (Post Column Reagent) สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. 0.3 mM PAR (4-(2-pyridylazo) resorcinol) (PAR = 0.07116g.; MW. = 237.20 g/mol)
2. 1 M Acetic Acid (CH_3COOH = 57.1905 ml.; MW. = 60.05; 30%; d = 1.05)
3. 3 M Ammonium Hydroxide (NH_4OH = 392.8924 ml; MW. = 35.046 g/mol; 30%; d = 0.892)

วิธีการเตรียม

1. ปิเปต NH_4OH = 392.89 ml. ลงในขวดวัดปริมาตร 1000 ml. ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยด์ (เนื่องจาก PAR นั้น sensitive ต่อแสง) ที่มี DI-water ประมาณ 200 ml.
2. ชั่ง PAR 0.0711 g. ในบีกเกอร์ ละลายด้วย DI-water ปริมาณเล็กน้อย แล้วใส่ในขวดวัดปริมาตรในข้อ 1
3. ปิเปต CH_3COOH 57.1905 ml. แล้วค่อย ๆ หยดลงในในขวดวัดปริมาตรในข้อ 2
4. ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1000 ml. ทำการ Sonicate 15 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm.
5. นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วใส่ลงในขวดพลาสติกที่มีกระดาษฟอยด์กันแสงหุ้มไว้

3. ปฏิบัติการทดลองทางคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative analysis)

การทดลองที่ 5.1

การแยกสารผสมของไอออนอนินทรีย์และ การคำนวณพารามิเตอร์ของคอลัมน์

(Separation of mixture of inorganic ions and calculation of column parameters)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีใช้เครื่อง IC ของบริษัท Dionex รุ่น DX 500
2. ศึกษาการใช้เทคนิค IC วิเคราะห์แยก inorganic cations หรือ anions
3. หาค่าพารามิเตอร์ต่างๆของคอลัมน์ได้แก่ N, k', α และ R_S
4. วิเคราะห์ unknown

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง IC DX500 ประกอบด้วย
   - GP 50 gradient pump (operated in isocratic mode)
   - LC 20 ประกอบด้วย injection value Rheodyne model 9126 loop ขนาด 25 µl
   - CD 20 conductivity detector
   - Suppressor ASRS-II หรือ CSRS-II
   - Peak-Net 5 Chromatography workstation
2. คอลัมน์ AS12A หรือ CS12A พร้อม Guard
3. เตรียมสารละลายสต็อกของไอออนเหล่านี้เข้มข้น 100 ppm F^-, Cl^-, NO_3^-, PO_4^{3-} และ $SO_4^{=}$ หรือ Na^+, K^+,NH_4^+ ,Ca^{2+} และ Mg^{2+}
4. เตรียมสารละลายผสมของแอนไอออนได้แก่ F^-, Cl^-, NO_3^-, $PO_4^{=}$ และ $SO_4^{=}$ เข้มข้นอย่างละ 5 ppm จากสต็อก หรือ สารละลายผสมของ Na^+, K^+, NH_4^+ ,Ca^{2+} และ Mg^{2+} เข้มข้นอย่างละ 5 ppm

หมายเหตุ น้ำปราศจากไอออน (DI water) ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดต้องเป็นน้ำที่มีความต้านทานมากกว่า 18 MΩ-cm

วิธีทดลอง

1. ให้อ่านวิธีการใช้เครื่องในหัวข้อ 2.1 ให้เข้าใจก่อนลงมือปฏิบัติ
2. ติดตั้งคอลัมน์ และ suppressor เข้ากับเครื่องให้ถูกต้องกับงานที่จะวิเคราะห์
3. เปิดวาล์วที่ถังแก๊สไนโตรเจนและ EO1 เปิดเครื่อง DX 500 และคอมพิวเตอร์
4. ไล่ฟองอากาศจากระบบปั๊ม
5. โดยระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์จะมี chromatographic condition ดังนี้

Chromatographic Conditions

สำหรับการวิเคราะห์ Anions

Column : **Analytical Column IonPac® AS12A (4x250 mm)**

Guard Column IonPac® AG12A (4x50 mm)

Eluent : **2.7 mN Na_2CO_3 / 0.3mM $NaHCO_3$**

Flow Rate : **1.5 mL/min**

SRS : **50 mA**

Detection : **Supressed Conductivity ASRS-II™**

Storage Solution : 0.1M NaOH

สำหรับวิเคราะห์ : F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}

สำหรับการวิเคราะห์ Cations

Column : **Analytical Column IonPac® CS12A (4x250 mm)**

Guard Column IonPac® CG12A (4x50 mm)

Eluent : **22 mN Sulphuric acid**

Flow Rate : **1.0 mL/min**

SRS : **100 mA**

Detection : **Supressed Conductivity CSRS-II™**

Storage Solution : 22 mN sulphuric acid

สำหรับวิเคราะห์ : **Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}**

6. สร้าง method สำหรับ run chromatogram (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1)
7. ฉีดสารตัวอย่างผสมของแอนไอออน หรือ แคตไอออน เลือกทดลองอย่างใดอย่างหนึ่ง แล้ว run chromatogram
8. identify ว่าพีกใดคือไอออนใด ทำได้ 2 วิธี คือ

   8.1 ฉีดสารละลายของไอออนแต่ละตัวที่เข้มข้น 5 ppm แล้วเทียบ t_R จะทำให้ทราบได้ว่าพีกใดคือไอออนใด

   8.2 นำสารผสมมา spike ไอออนมาตรฐานทีละตัวลงไป แล้ว run chromatogram พีกใดที่มีขนาดมากขึ้นแสดงว่าคือไอออนที่ spike ลงไปนั่นเอง วิธีนี้เรียกว่า spiking
9. เมื่อทราบว่าพีกใดคือไอออนใดให้ Name peak แล้ว save data file และ save method file
10. Load method ที่ name peak แล้วนำมา run chromatogram ตัวอย่าง น้ำประปา (น้ำประปาต้องกรองก่อนฉีด)
11. เปิดหน้า optimize → open file ตัวอย่างน้ำประปา จะได้ chromatogram ที่แสดงว่าน้ำประปามีไอออนอะไรปนอยู่บ้าง

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

นำโครมาโทแกรมของสารผสมมาคำนวณหา

1. จำนวนเพลตตามทฤษฎี (theoretical plate)

$$N = 16(t_R / w_b)^2 \text{ หรือ } 5.54(t_R / w_{h/2})^2$$

และ

$$N_{eff} = 5.54 ((t_R - t_V) / w_{h/2})^2$$

ให้นำค่า N_{eff} ของไอออนทุกตัวมาหาค่าเฉลี่ย

t_V คือ viod peak หมายถึงเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้เดินทาง 1 ความยาวคอลัมน์

2. ปัจจัยความจุ (capacity factor)

$$k' = (t_R - t_V) / t_V$$

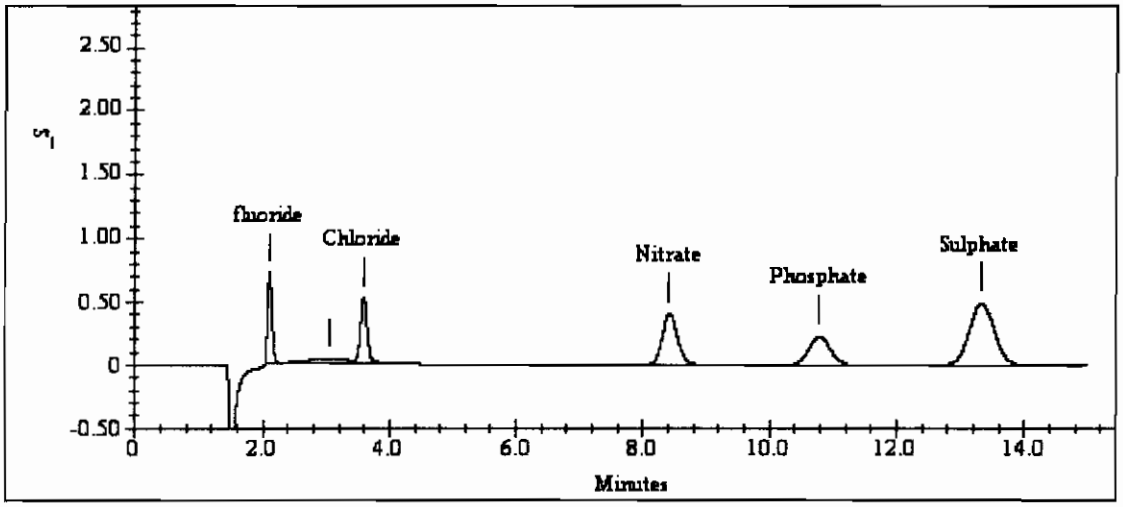
3. คำนวณหาค่า selectivity (α) ของไอออน F^- กับ Cl^- หรือ Na^+ กับ K^+

$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_V)}{(t_{R1} - t_V)}$$

4. คำนวณหาค่าการแยกของไอออน F^- กับ Cl^- หรือ Na^+ กับ K^+ หรือคู่ของไอออนอื่นที่อยู่ใกล้กัน

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})}$$

ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารผสมแอนไอออนที่แยกได้



<u>คำถาม</u>

1. หลักการของ HPLC กับ IC ต่างกัน หรือ เหมือนกันอย่างไร
2. จงอธิบายหน้าที่การทำงานของ Suppressor
3. Theoretical plate มีความหมายอย่างไร
4. Retention time ของไอออนแต่ละตัวขึ้นอยู่กับอะไรบ้าง

4. ปฏิบัติการทดลองทางปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative analysis)

การทดลองที่ 5.2 **ฝนกรด (Acid Rain)**

น้ำฝนที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5 จะเรียกว่าฝนกรด ฝนกรดเกิดได้จากมีแก๊สเข้าปะปนในน้ำฝน เช่น แก๊ส CO_2, SO_2, H_2S และ NO_X เป็นต้น แก๊สเหล่านี้เกิดจากภัยธรรมชาติ เช่น ภูเขาไฟระเบิด หรือเกิดจากมนุษย์ คือ แหล่งโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ การเผาไหม้เชื้อเพลิง การเผาขยะ เป็นต้น ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดมลภาวะทางอากาศ แก๊สเหล่านี้เมื่อเกิดปฏิกิริยากับน้ำฝนจะทำให้เกิดฝนกรด

ปฏิกิริยาการเกิดฝนกรด

การเกิดกรดซัลฟูริก

$$SO_2(g) + 2H_2O(l) \longrightarrow 2\,H^+(aq) + SO_4^{2-}(aq) + H_2(g)$$

การเกิดกรดไนตริก

$$2\,NO_X(g) + H_2O(l) \longrightarrow 2\,H^+(aq) + 2NO_3^-(aq)$$

การเกิดกรดคาร์บอนิก

$$CO_2(g) + H_2O(l) \longrightarrow H^+(aq) + HCO_3^-(aq)$$

การเกิดกรดไฮโดรคลอริก

$$2\,Cl_2(g) + 2H_2O(l) \longrightarrow 4\,H^+(aq) + 4\,Cl^-(aq) + O_2(g)$$

ผลกระทบจากฝนกรดต่อแหล่งน้ำ

ฝนกรดไหลลงสู่ลำธาร ทะเลสาบ บึง หลังจากผ่านป่า ทุ่งหญ้า อาคารและถนน หรืออาจตกลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง มีผลให้ค่าความเป็นกรด (pH) ของทะเลสาบ ซึ่งปกติอยู่ในช่วง 6-8 มีค่าลดลง แหล่งน้ำที่เป็นกรดจะชะอะลูมิเนียมหรือโลหะหนักต่างๆจากดินลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งเป็นพิษอย่างมากต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ผนวกเข้ากับความเป็นกรดของน้ำเอง ส่งผลให้ประชากรปลาลดลง และบางชนิดสูญพันธุ์ จนกระทบต่อระบบนิเวศน์ของสิ่งมีชีวิตในน้ำ

ผลกระทบจากฝนกรดต่อป่าและต้นไม้

ในอดีตนักวิทยาศาสตร์และพนักงานป่าไม้ สังเกตเห็นว่า ป่าไม้ลดอัตราการเจริญเติบโตลง และไม่สมบูรณ์ ใบไม้และก้านเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและร่วงหล่นก่อนเวลาอันควร บางต้นก็ตายโดยไม่มีสาเหตุ ซึ่งในปัจจุบันค้นพบว่าอาการเหล่านี้มีสาเหาตุมาจากฝนกรดนั่นเอง โดยวงจรของการทำอันตรายต่อต้นไม้เริ่มจากการทำความเสียหายต่อใบไม้ซึ่งเป็นแหล่งผลิดอาหาร ลำต้นก็จะไม่แข็งแรง ขณะเดียวกันก็จะดูดซึมสารพิษที่ถูกปล่อยออกจากดิน เช่น อะลูมิเนียม

ผลกระทบจากฝนกรดต่อสุขภาพ

คนสามารถหายใจเอาอนุภาคของซัลเฟตและไนเตรต ที่เกิดขึ้นจาก SO_2 และ NO_X ในบรรยากาศเข้าสู่ปอดแล้วซึมผ่านเข้าสู่ร่างกาย จนทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคทางเดินหายใจและปอดทำงานผิดปกติได้ในที่สุด

<u>วัตถุประสงค์</u>

เพื่อการตรวจหาปริมาณแอนไอออน 6 ชนิด ได้แก่ F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-} ในน้ำฝนเพื่อประเมินสภาพความเป็นกรดของน้ำฝนในเขตกรุงเทพฯ

<u>เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. **เครื่อง IC Dionex DX 500 ระบบประกอบด้วย**
   - GP-50 Gradient pump
   - CD20 Conductivity Detector
   - LC20 Enclosure
     i. IonPac®AS12-A (4 x 250mm) และ AG-12A guard column
     ii. Sample loop ขนาด 25 µl
   - Peaknet 5 Chromatography Workstation

2. อุปกรณ์

- Volumetric Flask ขนาด 10, 1000 ml
- ขวดบรรจุตัวชะขนาด 1000 ml
- ชุดกรองสารละลายแบบ suction
- Micropipette ขนาด 500-5000 µl และ 100-1000 µl
- Membrane filter ขนาด 0.45 µm
- Syringe ขนาด 3 ml
- Ultrasonic bath

3. สารเคมี

- Na_2CO_3 และ $NaHCO_3$ AR grade
- สารมาตรฐานผสมสต็อกของไอออน 5ชนิด ได้แก่ F^-, Cl^-, NO_3^-, PO_4^{3-} และ SO_4^{2-} ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20, 30, 50, 50 และ 100 ppm ตามลำดับ
- Sodium Nitrite AR grade และทำการเตรียมใหม่เป็นสต็อก 50 ppm เพื่อเติมลงในสารละลายมาตรฐานผสมที่ต้องเตรียมขึ้นมาใช้เพื่อให้ได้แอนไอออน 6 ชนิด คือ F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-} และ SO_4^{2-}
- Deionized Water

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-} และ $SO_4^{=}$ จากสารละลายสต็อก (Stock Solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทำ Calibration curve ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ (รวม Blank) โดยปิเปตสารละลายจากสารละลายสต็อกผสม ดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วทำการปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำ DI

ตารางที่ 1 แสดงปริมาตรของสารละลายสต็อก สำหรับการทำ Standard Solution

Standard level	ปริมาตรที่ปิเปต (ml)	Anions concentration : ppm (Stock Conc.)					
		F^- (20)	Cl^- (30)	NO_2^- (50)	NO_3^- (50)	PO_4^{3-} (50)	SO_4^{2-} (100)
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0.25	0.5	0.75	1.25	1.25	1.25	2.5
3	0.50	1.0	1.5	2.5	2.5	2.5	5.0
4	1.00	2.0	3.0	5.0	5.0	5.0	10.0
5	2.00	4.0	6.0	10.0	10.0	10.0	20.0

1.2) การเตรียมตัวชะ (2.7 mM Na_2CO_3 / 0.3 mM $NaHCO_3$) จากสารละลายสต็อก (0.5 M Na_2CO_3 และ 0.5 M $NaHCO_3$)

1.2.1) นำ 0.5 M Na_2CO_3 5.4 ml และ 0.5 M $NaHCO_3$ 0.6 ml ใส่ลงใน ขวดวัดปริมาตร (VolumetricFlask) ขนาด 1000 ml ทำการปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ DI

1.2.2) นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน membrane ขนาด 0.45 μm (เพื่อกำจัดฝุ่นผงขนาดเล็ก) แล้วจึงไปผ่านเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 15-20 นาที (เพื่อกำจัดฟองอากาศ)

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

นำน้ำฝนที่เก็บได้มากรองผ่าน syringe membrane filter ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี

3. **การ run chromatogram**

อ่านวิธีการใช้เครื่องในการวิเคราะห์แอนไอออนในหัวข้อ 2.1 ให้เข้าใจ แล้วปฏิบัติตามขั้นตอนต่อไปนี้

Chromatographic condition

สำหรับการวิเคราะห์ Anions

Column : **Analytical Column IonPac® AS12A (4x250 mm)**

Guard Column IonPac® AG12A (4x50 mm)

Eluent : **2.7 mN Na_2CO_3 / 0.3mM $NaHCO_3$**

Flow Rate : **1.5 mL/min**

SRS : **50 mA**

Detection : **Supressed Conductivity ASRS-II™**

Storage Solution : 0.1M NaOH

สำหรับวิเคราะห์ : F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}

3.1 ติดตั้งคอลัมน์ AS12A พร้อม Guard AG12A และSuppressor ASRS-II เข้าระบบของเครื่อง IC DX 500 วางขวดตัวชะเข้าที่ line B ถ้าเครื่องอยู่ในระบบอื่นอยู่ก่อน เมื่อต้องการเปลี่ยนให้อ่านหัวข้อ 2.2.10

3.2 ปิดวาล์วถังแก๊สไนโตรเจนและวาล์ว EO1 เปิดเครื่อง IC และคอมพิวเตอร์

3.3 ไล่ฟองอากาศจากระบบปั๊ม

3.4 สร้าง method สำหรับการวิเคราะห์

3.5 ทำการ run สารมาตรฐานชุดที่มีความเข้มข้นเหมาะสม เพื่อทำการ name peak และสร้าง component table จากนั้น save data file และ save method file

3.6 ใช้ method ที่สร้าง run chromatogram ของสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างกันอย่างน้อย 4 ระดับจากน้อยไปหามาก ตามที่เตรียมไว้

3.7 เปิด method ที่สร้าง และ click ที่ component table เปิดดู calibration curve ถ้าได้เป็นเส้นตรงถูกต้องมีค่า r^2 ไม่ต่ำกว่า 0.99 ให้ save method file

3.8 เปิด method file เดิมที่สร้าง calibration curve แล้ว run chromatogram ของสารตัวอย่างตามต้องการจนเสร็จ

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1) ไปที่ Icon Optimize เปิด file ของตัวอย่าง แล้วพิมพ์ผลของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งทำอย่างน้อยตัวอย่างละ 3 ครั้ง

4.2) จากข้อมูลของตัวอย่างที่ได้ให้สรุปผลการทดลอง และวิจารณ์ผลในการทำรายงาน

<u>คำถาม</u>

1. ให้นักศึกษาค้นคว้าเพื่อหาว่านอกจากคอลัมน์ AS 12A แล้ว สามารถใช้คอลัมน์ชนิดใดวิเคราะห์แอนไอออนได้อีก
2. อธิบายว่าฝนกรดเกิดขึ้นได้อย่างไร และมีโทษอย่างไรบ้าง
3. r^2 คืออะไร

การทดลองที่ 5.3

การหาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในเนื้อหมูโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

(Determination of Nitrate and Nitrite in Pork Using Ion Chromatography)

ไนเตรตและไนไตรต์เป็นสารที่มักใช้เติมลงไปในอาหารจำพวกเนื้อหมู ที่นำไปผลิตเป็นไส้กรอก ลูกชิ้น และหมูยอ เป็นต้น เพื่อป้องกันการเน่าเสียเนื่องจากพวก microorganisms เช่น *Clostridium botulinium* แต่กลับพบว่ามีโทษต่อร่างกายด้วย เพราะไนไตรต์สามารถทำปฏิกิริยากับเอมีน-ทุติยภูมิ (Secondary amines) ที่มีอยู่ในอาหาร แล้วได้สารประกอบพวกไนโตรซามีน (Nitrosamines) ซึ่งถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็ง โดยทั่วไปไนเตรตจะเสถียรกว่าไนไตรต์แต่สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้โดยปฏิกิริยา microbial reduction ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับไนเตรต จึงถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการหาปริมาณของไนเตรตและไนไตรต์ในเนื้อหมูที่มีจำหน่ายตามห้างสรรพสินค้าโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

1. **เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี Dionex DX 500** ระบบประกอบด้วย
   - GP50 Gradient pump ทำงานในระบบ isocratic elution
   - AD20 UV/Visible Absorbance Detector
   - LC20 ที่บรรจุด้วย
     i. IonPac®AS12-A (4 x 250 mm) และ AG-12A guard column
     ii. Sample loop ขนาด 25 µl
     iii. ASRS - II suppress conductivity detector

2. อุปกรณ์

- ขวดแก้วบรรจุตัวชะขนาด 1000 ml
- ชุดกรองสารละลายแบบ suction
- ไมโครปิเปต ขนาด 100-1000 µl
- ปิเปต ขนาด 1, 5, 10 ml
- ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 ml
- Membrane filter ขนาด 0.45 µm
- Syringe ขนาด 2.5 ml และ syringe membrance filter 0.2 µm

3. สารเคมี

- Na_2CO_3 และ $NaHCO_3$ AR grade
- Nitrate standard solution (1000 ppm)
- Sodium Nitrite AR grade

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารมาตรฐานในการทำ calibration curve

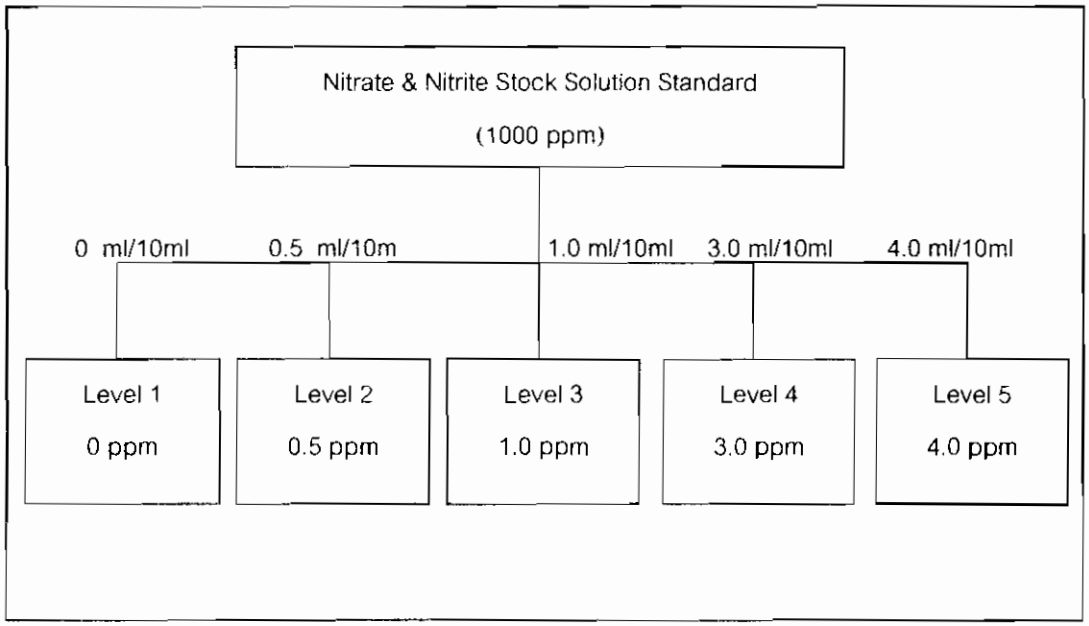
1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน Nitrate stock solution

จาก Nitrate stock solution ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ทำเป็น stock solution ที่ 10 ppm โดยปิเปตมา 100 µl แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml

1.2 การเตรียมสารมาตรฐาน Nitrite stock solution

เตรียมจาก $NaNO_2$ AR grade โดยชั่งมา 0.15 กรัม นำมาละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml จะได้ความเข้มข้น stock solution ของ NO_2^- เป็น 1000 ppm

นำ stock solution ของสารมาตรฐานทั้งสองมาเจือจางในอัตราส่วนต่างๆดังแสดงในไดอะแกรมข้างล่างดังนี้



1.3 การเตรียมตัวชะ (2.7 mM $NaCO_3$ / 0.3mM $NaHCO_3$)

1.3.1 โดยทำเป็น stock solution 0.5 M Na_2CO_3 โดยการชั่ง Na_2CO_3 มา 26.49 กรัม แล้วละลายในน้ำ 500 ml

1.3.2 โดยทำเป็น stock solution 0.5 M $NaHCO_3$ โดยการชั่ง $NaHCO_3$ มา 21.00 กรัม แล้วละลายในน้ำ 500 ml

1.3.3 จากนั้นนำ 0.5 M Na_2CO_3 5.4 ml และ 0.5 M $NaHCO_3$ มา 0.6 ml มาละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1000 ml นำสารละลายที่ไปกรองผ่าน membrane ขนาด 0.45 μm (เพื่อกำจัดฝุ่นขนาดเล็ก) แล้วจึงไปผ่านเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อกำจัดฟองอากาศ) ก่อนที่เทลงขวดสำหรับตัวชะต่อไป

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่าง 2 ชนิด คือ เนื้อหมู และไส้กรอกหมู ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังต่อไปนี้

1. นำเนื้อหมูและไส้กรอกหมูมาชั่งให้ได้น้ำหนักอย่างละ 10.0 กรัมบดละเอียด
2. เติมน้ำลงไป 100 ml ให้ทำเครื่องหมายระดับของน้ำไว้ แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
3. ทิ้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนได้ระดับเดิม คนให้ทั่ว
4. จากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนที่ใสนำมากรองโดยผ่าน ODS Cartridge และ 0.2 μm syringe membrance filter เพื่อกำจัดโปรตีนและฝุ่นผงที่ไม่ต้องการก่อนที่จะฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง IC

3. การ Run Chromatogram

ให้อ่านวิธีการใช้เครื่องในหัวข้อ 2.1 ให้เข้าใจก่อนลงมือปฏิบัติ

Chromatographic condition

คอลัมน์	IonPac®AS12-A(4 x 250 mm) และ AG-12A guard column
ปริมาตรที่ใช้ฉีด	25 ไมโครลิตร
อัตราการไหล	1.5 ml/min
การตรวจวัด	UV-detector, 225 nm
ตัวชะ	2.7 mM $NaCO_3$/0.3 mM $NaHCO_3$

3.1. เทตัวชะที่ผ่านการกรองและกำจัดฟองอากาศลงใน eluent resevouir ต่อตัวชะเข้าตาม line B เปิดแก๊สไนโตรเจน และวาล์ว EO1

3.2. เปิดเครื่อง IC และคอมพิวเตอร์

3.2.1. เปิดสวิทซ์ GP 50 Gradient pump แล้วทำการล้างท่อและกำจัดฟองอากาศที่อาจจะเกิดขึ้นขณะทำการเปลี่ยนตัวชะด้วยใหม่

3.2.2. เปิดสวิทซ์ AD 20 UV-Visible Absorbance detector

3.2.3. ทำการควบคุมระบบต่างๆผ่านทาง software peak Net 5

3.2.4. ตั้งค่าของพารามิเตอร์ต่างๆที่จะใช้ใน method ดังแสดงในตาราง

Time event ที่ใช้ในการ run แบบ Isocratic เป็นดังนี้

Time	Flow rate	Valve	หมายเหตุ
Initial	1.50	Load	ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ sample loop
0.00	1.50	Load	Off-set สัญญาณมาที่ศูนย์
0.10	1.50	Inject	สารตัวอย่างถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดย ตัวชะและเริ่มต้นแสดงสัญญาณของโครมาโทแกรม
2.00	1.50	Load	วาล์วกลับมาสู่ตำแหน่งที่พร้อมจะฉีดสารตัวต่อไป

3.2.5. เช็ค base-line ของระบบ เมื่อ base-line เรียบก็พร้อมที่จะ run chromatogram

3.3. ทำ calibration curve ตามความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เตรียมไว้

3.4. Calibration curve ที่ได้จะพิจารณาจากค่า linear coefficient $(r)^2$ ที่มากกว่า 0.99 ขึ้นไป ถึงจะยอมรับ

3.5. ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ได้เตรียมไว้แล้ว

4. จากข้อมูลที่ได้นำไปทำรายงานสรุปผลและวิจารณ์

<u>คำถาม</u>

1. ทำไมการทดลองนี้จึงไม่ใช้การตรวจวัดด้วย suppress conductivity detector
2. หลักการเลือกใช้คอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่ และดีเทคเตอร์ มีวิธีการอย่างไร

การทดลองที่ 5.4

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนไอออนอนินทรีย์ในน้ำดื่มโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี

(Determination of Inorganic Anion in Drinking Waters by Ion Chromatography)

ปริมาณแอนไอออน เช่น ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเตรต และซัลเฟต ในน้ำ เป็นดัชนีชี้คุณภาพของน้ำดื่มได้เป็นอย่างดี แอนไอออนบางชนิดถ้ามีอยู่ในน้ำดื่มในปริมาณที่พอเหมาะก็จะเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ถ้ามีมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ ในน้ำดื่มจำเป็นต้องมีปริมาณไอออนต่างๆ เหล่านี้ตามมาตรฐานกำหนด การบริโภคน้ำดื่มที่มีปริมาณไอออนเกินค่ามาตรฐานบางตัวอาจก่อให้เกิดโทษกับร่างกาย ตัวอย่างเช่น ไนเตรต ซึ่งมักมีปะปนในแหล่งน้ำต่างๆ ไนเตรตเมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ เมื่อไนไตรต์เกิดปฏิกิริยากับ อะมีน จะได้ไนโทรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และการมีปริมาณฟลูออไรด์มากเกินไปก็จะเป็นสาเหตุของโรคกระดูกและฟันดกกระได้ ปัจจุบันมีผู้ผลิตน้ำดื่มบรรจุขวดขึ้นจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครหลายบริษัท แต่ละบริษัทต้องผลิตให้ได้ตามมาตรฐานของสมอ. (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม) หรือ อย. (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา) จึงจะสามารถจำหน่ายได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีหาปริมาณแอนไอออนในน้ำดื่มโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี
2. เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำดื่มแต่ละยี่ห้อที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้คือ IC บริษัท Dionex model DX 500 ระบบประกอบด้วย
   - GP50 Gradient pump โดยทำงานในระบบ isocratic elution
   - CD20 Conducdetecuppress conductivity, ASRS, (AutoSuppression recycle mode)
   - LC20 Chromatography Enclosure equipped with Rheodyne Model 9126 injector
   - Peaknet chromatography workstation

2. Deionized water (DI water) ที่มีความต้านทานสูงกว่า 18 MΩ-cm เตรียมโดยใช้ DI water ผ่านเครื่อง Easy pure RF compact ultrapure water system บริษัท Branstead

3. สารละลายมาตรฐาน stock ของแอนไอออนแต่ละชนิดเข้มข้น 1000 ppm ของบริษัท BDH

- fluoride prod. 16080 3 R
- chloride prod. 16113 4H
- nitrate prod. 16148 3C
- sulfate prod. 16116 4N

4. สารที่ใช้เตรียมตัวชะ (eluent)

Na_2CO_3 AR grade Merck และ $NaHCO_3$ AR grade

เงื่อนไขการทดลอง (Experimental conditions)

Column : IonPac AS12A (4 x 250 mm) และ AG-12A guard column

Eluent : 2.7 mM Na_2CO_3 /0.3mNaHCO$_3$

Flow rate : 1.5 ml/min

SRS : 50 mA

Sample volume: 25 µl

Detection : Suppressed conductivity, ASRS in recycle mode 100mA current

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวชะ

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมจาก stock ของสารละลายมาตรฐานแอนไอออนแต่ละชนิด คือ ฟลูออไรด์ คลอไรด์ ไนเทรต และซัลเฟต เนื่องจากปริมาณ ฟลูออไรด์ และ ไนเตรต ในน้ำดื่มมีในระดับต่ำส่วน คลอไรด์ และซัลเฟต มีอยู่ในระดับสูง การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ต้องทำเป็นสองชุด ดังนี้

	กราฟมาตรฐาน ชุดที่ 1 fluoride, nitrate (ppm)	กราฟมาตรฐาน ชุดที่ 2 chloride, sulfate (ppm)
level 1	0.1	20
level 2	0.5	40
level 3	1.0	60
level 4	1.5	80

1.2 การเตรียมตัวชะ

1.2.1 เตรียม stock Na_2CO_3 180 mM ชั่ง Na_2CO_3 1.9078 กรัม เจือจางเป็น 100 ml ด้วย DI water

1.2.2 เตรียม stock $NaHCO_3$ 170 mM ชั่ง $NaHCO_3$ 1.4282กรัม เจือจางเป็น 100 ml ด้วย DI water

1.2.3 นำ stock Na_2CO_3 และ $NaHCO_3$ มาอย่างละ 10 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml แล้วเจือจางด้วย DI water กรองตัวชะที่เตรียมได้ผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45μm แล้วนำไปไล่แก๊สโดยใช้ ultrasonic bath เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำดื่มที่สุ่มเก็บมาจากร้านอาหารภายในมหาวิทยาลัย กรองผ่าน syringe membrance filter ขนาด 0.45 μm แล้วจึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง IC

3. **การ run chromatogram**

3.1 ดำเนินการทดลองแบบเดียวกับการทดลองที่ 3.2 (ฝนกรด)

3.2 สร้าง method ขึ้นสองชุด คือ สำหรับกราฟมาตรฐาน ชุดที่ 1 และ 2

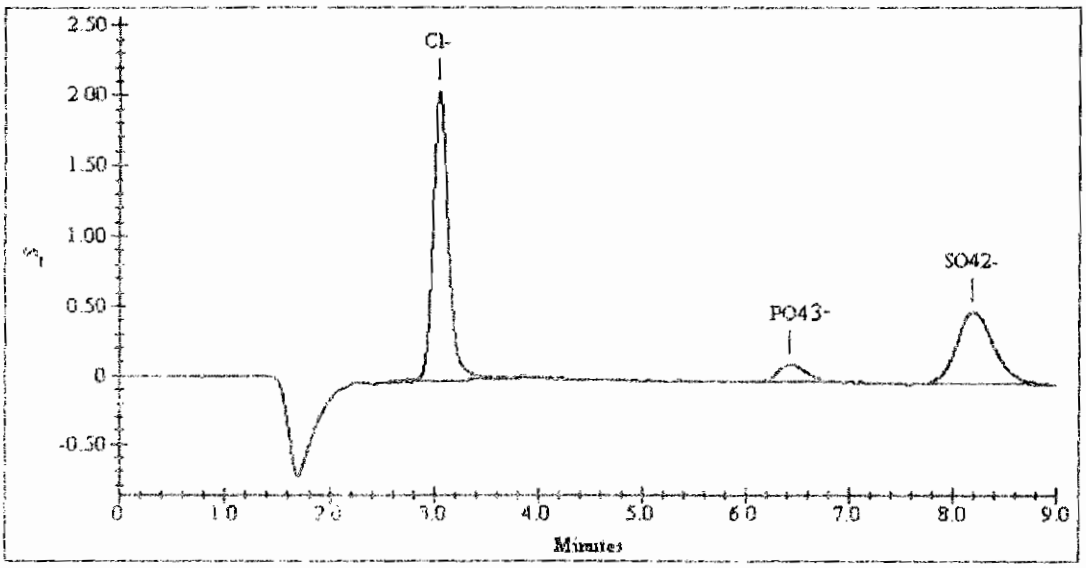
3.3 run chromatogram ของตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองมาแล้ว ตัวอย่างละ 3 ครั้ง

3.4 อ่านค่าปริมาณ ฟลูออไรด์ และไนเตรต จาก method ของกราฟมาตรฐานชุดที่ 1 และ คลอไรด์ กับ ซัลเฟต จาก method ของกราฟมาตรฐานชุดที่ 2

4. **สรุปผล**

ทำการสรุปผลปริมาณแอนไอออนที่มีในน้ำดื่มแต่ละยี่ห้อแล้วเปรียบเทียบกัน พร้อมทำรายงาน

รูปตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงพีกของแอนไอออนต่างๆ ในตัวอย่างน้ำดื่ม



<u>การทดลองที่ 5.5</u>

การวิเคราะห์หาปริมาณแคตไอออนอนินทรีย์ในน้ำประปาโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี

(Determination of Inorganic Cations in Tap Waters by Ion Chromatography)

โดยปกติในน้ำประปาจะมีแคตไอออนอนินทรีย์ที่ทำให้เกิดความกระด้างของน้ำ ได้แก่ เกลือ ของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่อยู่ในรูปของไบคาร์บอเนต ที่เป็นความกระด้างชั่วคราว และคลอไรด์ กับ ซัลเฟต ที่เป็นความกระด้างถาวร ยังมีแคตไอออนที่สามารถมีอยู่ได้ในปริมาณสูงในน้ำประปาและไม่ได้กำหนดค่ามาตรฐานไว้ คือ โซเดียม และโพแทสเซียม แคตไอออนเหล่านี้ จัดเป็นไอออนที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย แต่เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายถ้ามีปริมาณที่พอเหมาะ ไอออนที่ทำให้เกิดน้ำกระด้างถ้ามีปริมาณมากเกินไปในน้ำประปาก็จะทำให้เกิดผลเสียได้ เช่น ทำให้เกิดตะกรันในหม้อต้มน้ำ รับประทานมากๆ อาจทำให้เกิดเป็นโรคนิ่ว

การรายงานคุณภาพน้ำประปาทั่วๆไป ต้องรายงานพารามิเตอร์ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1

จะเห็นได้ว่า แคตไอออน แคลเซียม และแมกนีเซียม ไม่ได้มีเกณฑ์กำหนดไว้ในองค์การอนามัยโลก เพราะจัดเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายและสามารถดื่มกินได้ แต่ที่พบในน้ำประปาในเขตกรุงเทพฯ แคลเซียม จะมีอยู่ประมาณ 24 ppm ส่วน แมกนีเซียมประมาณ 8 ppm

ตารางที่ 1

มาตรฐานคุณภาพน้ำประปาของการประปานครหลวง

(ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก ปี 2536)

พารามิเตอร์	หน่วย (units)	เกณฑ์ที่แนะนำ
1. <u>คุณสมบัติทางแบคทีเรีย</u> (Bacteriological quality)		
โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total coliform bacteria)	MPN/100 ml	ไม่พบ
แบคทีเรียชนิด อีโคไล (E. coli)	MPN/100 ml	ไม่พบ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พารามิเตอร์	หน่วย (units)	เกณฑ์ที่แนะนำ
2. คุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์		
สี ปรากฏ (Apperance colour)	True colour unit	15
ความขุ่น (Turbidity)	NTU	5
รส และ กลิ่น (Taste and odour)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ
สารหนู (Arsenic)	mg/l	0.01
แคดเมี่ยม (Cadmium)	mg/l	0.003
โครเมี่ยม (Chromium)	mg/l	0.05
ไซอาไนด์ (Cyanide)	mg/l	0.07
ตะกั่ว (Lead)	mg/l	0.01
ปรอท (Mercury)	mg/l	0.001
เซเลเนี่ยม (Selenium)	mg/l	0.01
ฟลูออไรด์ (Fluoride)	mg/l	1.5
คลอไรด์ (Chloride)	mg/l	250
ทองแดง (Copper)	mg/l	1
เหล็ก (Iron)	mg/l	0.3
แมงกานีส (Manganese)	mg/l	0.1
อลูมิเนี่ยม (Aluminium)	mg/l	0.2
โซเดี่ยม (Sodium)	mg/l	200
ซัลเฟต (Sulfate)	mg/l	250
สังกะสี (Zinc)	mg/l	3
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide)	mg/l	0.05
ปริมาณมวลสารที่ละลายทั้งหมด (Total dissolved solids)	mg/l	1,000

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พารามิเตอร์	หน่วย (units)	เกณฑ์ที่แนะนำ
ไนเตรทในรูปไนโตรเจน (Nitrate as N)	mg/l	10
2. <u>คุณสมบัติทางเคมี-ฟิสิกส์</u> (ต่อ)		
แอมโมเนียในรูปไนโตรเจน (Ammonia as N)	mg/l	1.5
เบนซิน (Benzene)	mg/l	10
คาร์บอนเตตราคลอไรด์ (Carbon Tetrachloride)	mg/l	2
ไดโครโรมีเทน (Diehloromethane)	mg/l	20
หนึ่ง, สอง-ไดโครโรอีเทน (1,2-Diehloroethane)	mg/l	30
เบนโซไพรีน (Benzo[a]pyrene)	mg/l	0.7
3. <u>สารเคมีที่ใช้ป้องกันและกำจัดศัตรูพืช</u> (Pesticides)		
อัลดรินและดิลดริน (Aldrin/Dieldrin)	mg/l	0.03
คลอเดน (Chlordane)	mg/l	0.2
ดีดีที (DDT)	mg/l	2
สอง,สี่-ดี (2,4-D)	mg/l	30
เฮปตาคลอและเฮปตาคลออีพอกไซด์ (Heptachlor and Heptachlor epoxide)	mg/l	0.03
เฮกซะคลอโรเบนซิน (Hexachlorobenzene)	mg/l	1
ลินแดน (Lindane)	mg/l	2
เมททอกซิคลอ (Methoxychlor)	mg/l	20
เพนตาคลอโรฟีนอล (Pentachlorophenol)	mg/l	9

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พารามิเตอร์	หน่วย (units)	เกณฑ์ที่แนะนำ
4. ไตรฮาโลมีเทน (Trihalomethanes)		
คลอโรฟอร์ม (Chloroform , $CHCl_3$)	mg/l	200
โบรโมไดคลอโรมีเทน (Bromodichloromethane , $CHBrCl_2$)	mg/l	60
ไดโบรโมคลอโรมีเทน (Dibromochloromethane, $CHBr_2Cl$)	mg/i	100
โบรโมฟอร์ม (Bromoform , $CHBr_3$)	mg/l	100
5. กัมมันตภาพรังสี (Radioactive)		
ความแรงรวมรังสีแอลฟา (Gross alpha activity)	Bq/l	0.1
ความแรงรวมรังสีเบต้า (Gross beta activity)	Bq/l	1

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ Na^+, K^+, Ca^{2+}และ Mg^{2+} ในน้ำประปาโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. **เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี Dionex DX500** ระบบประกอบด้วย
   - GP50 Gradient pump (วิเคราะห์ในระบบ isocratic)
   - CD20 conductivity detector
   - LC20 บรรจุด้วย
     i. IonPac CS12A (4 x 250 mm) และ CG12A guard column
     ii. Injection valve ที่มี Sample loop ขนาด 25 µl
     iii. suppressor CSRS - II
   - Peaknet Chromatography Workstation

2. **อุปกรณ์**

- volumetric flask 10 ml, 1000 ml
- ชุดกรองตัวชะ
- Micropipette
- syringe membrane filter
- ultrasonic bath

3. **สารเคมี**

สารมาตรฐานผสมของแคตไอออน 6 ชนิด จาก Dionex P/N 46070 ประกอบด้วย

- Lithium 50 mg/l
- Sodium 200 mg/l
- Ammonium 250 mg/l
- Potassium 500 mg/l
- Magnesium 250 mg/l
- Calcium 500 mg/l
- H_2SO_4 AR grade
- DI water

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทำ calibration curve ดังนี้ นำสต็อกของสารละลายมาตรฐานผสมของแคตไอออน 6 ชนิดมา 2.0 ml เจือจางให้มีปริมาตร 25.0 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.5, I.0, 2.0, 4.0 และ 6.0 ml ตามลำดับใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้พอดีขีด จะทำให้ได้ระดับความเข้มข้นของแคตไอออนแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นแต่ละระดับของ calibration curve

ระดับความเข้มข้น	ความเข้มข้นของแคตไอออน (mg/l)					
	Li^+	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
1	0.2	0.8	1.0	2.0	1.0	2.0
2	0.4	1.6	2.0	4.0	2.0	4.0
3	0.8	3.2	4.0	8.0	4.0	8.0
4	1.6	6.4	8.0	16.0	8.0	16.0
5	2.4	9.6	12.0	24.0	12.0	24.0

2. เตรียมตัวชะ H_2SO_4 เข้มข้น 22 mN H_2SO_4

จากกรด H_2SO_4เข้มข้น ให้เตรียมเป็นสต็อกของ H_2SO_4 เข้มข้น 2.2 N โดยใช้ H_2SO_4 เข้มข้น 6.16 ml เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 100 ml

นำสต็อก 2.2 N H_2SO_4 มา 1 ml เจือจางให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำ DI จะได้ตัวชะ 22 mN H_2SO_4

นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านเมมเบรน 0.45 μm แล้วทำการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที ก่อนการใช้งาน

3. เตรียมตัวอย่าง

เก็บน้ำประปาที่ต้องการวิเคราะห์ มากรองด้วย syringe membrane filter ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไป run chromatogram

4. run chromatogram โดยมี Chromatographic condition ดังนี้

Column	:	**Analytical Column IonPac® CS12A (4x250 mm)**
		Guard Column IonPac® CG12A (4x50 mm)
Eluent	:	**22 mN Sulphuric acid**
Flow Rate	:	**1.0 mL/min**
SRS	:	**100 mA**
Detection	:	**Supressed Conductivity CSRS-II™**
		Storage Solution : 22 mN sulphuric acid

4.1 อ่านวิธีการใช้เครื่องและวิเคราะห์ cation ในหัวข้อ 2.1 วิธีการใช้เครื่องให้เข้าใจ

4.2 ติดตั้งคอลัมน์ CS12 A พร้อม guard column CG 12A และ suppressor CSRS II เข้าระบบของเครื่อง IC DX 500 วาง eluent เข้าที่ line D

4.3 เปิดวาล์วถังแก๊สไนโตรเจน และวาล์ว EO1 เปิดเครื่อง IC และคอมพิวเตอร์

4.4 ไล่อากาศออกจากระบบปั๊ม

4.5 สร้าง method และ run chromatogram เพื่อทำ name peak

4.6 run chromatogram ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ระดับ แล้ว save method

4.7 load method ที่สร้างกราฟมาตรฐานไว้แล้วมา run chromatogram ของตัวอย่างน้ำประปา

4.8 เปิดฟอร์มรายงานเพื่อดูว่าในน้ำประปามีแคดไอออนชนิดใดอยู่บ้าง และแต่ละชนิดมีปริมาณเท่าไร

5. สรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ผลพร้อมทำรายงาน

การทดลองที่ 5.6

การหาปริมาณโลหะหนักในน้ำเสียโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี

(Determination of Heavy metals in Waste Waters by Ion Chromatography)

โลหะหนักเป็นธาตุที่พบโดยทั่วๆไปในสิ่งแวดล้อม เป็นทรัพยากรธรรมชาติอย่างหนึ่ง พบได้ทั้งในดิน อากาศ และน้ำ มนุษย์ได้นำโลหะหนักใช้ผลิตวัสดุอุปกรณ์และเครื่องใช้ต่างๆ ทำให้มีโอกาสสัมผัสกับธาตุโลหะหนัก ถ้าสัมผัสหรือได้รับธาตุโลหะหนักในปริมาณที่สูง อาจเป็นอันตรายได้ ธาตุโลหะหนักบางชนิดมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต แต่บางชนิดมีอันตรายอย่างมาก ดังนั้น จึงไม่ควรทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆมักมีการปนเปื้อนของโลหะหนักลงในน้ำเสียของโรงงาน ถ้ามีการปล่อยน้ำเสียลงสู่สิ่งแวดล้อมโดยไม่มีการบำบัดให้ถูกต้อง จะทำให้เกิดมลภาวะที่เป็นพิษทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆก่อนปล่อยลงสู่แม่น้ำลำคลองจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง วิธีการทางไอออนโครมาโทกราฟี เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในน้ำเสียได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการหาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ Pb^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} และ Mn^{2+} ในน้ำเสียโดยวิธีไอออนโครมาโทกราฟี

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟี Dionex DX 500 ระบบประกอบด้วย

- GP50 (ทำงานในระบบ isocratic mode)
- LC20 chromatography ประกอบด้วย ระบบฉีดสารตัวอย่างของ Rheodyne Model 9126 โดยใช้ loop ขนาด 25 µl และ A bifunctional ion exchange column IonPac CS5A (Dionex) analytical column (250 x4 mm I.D.) + IonPac CG5A guard column (50 x4 mm I.D.)

- PC10 post column pneumatic delivery pump สำหรับใช้เป็นตัวเดิม post column reagent
- AD20 UV/VIS absorbance detector (วัดที่ความยาวคลื่น 530 nm.)

1.2 Brandstead Easy Pure RF compact ultrapure water system.

1.3 NEY Ultrasonic bath

1.4 Vaccuum pump

2 <u>สารเคมี</u>

2.1 Deionized water (DI water)

น้ำที่ใช้ในการเตรียมตัวชะ และสารละลายมาตรฐานทั้งหมดต้องเป็นน้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทานสูงกว่า 18 MΩ-cm เตรียมโดยผ่านน้ำปราศจากไอออนลงในเครื่องมือ Easy Pure RF compact ultrapure water system เพื่อปรับความต้านทานให้ได้ 18.3 MΩ-em

2.2 แก๊สไนโตรเจนที่ความบริสุทธิ์สูงกว่า 99.99%

2.3 รีเอเจนต์ และสารมาตรฐาน (Reagents and standards) ทุกชนิดที่ใช้เป็นเกรดสำหรับงานวิเคราะห์ ที่มีในห้องปฏิบัติการ CM 437 ได้แก่

- Formic acid จาก APS Finechem
- Ammonium Iron (III) Sulphate ($NH_4[Fe(SO_4)_2]$) จาก BDH
- Sodium acetate (CH_3COONa), Ammonia solution 30%, Cobalt (II) nitrate ($Co(NO_3)_2$ และ Potassium sulphate (K_2SO_4) จาก Carlo Erba
- Manganese (II) sulphate ($Mn(SO_4)$) และ 4-(2-Pyridylazo) resocinol monosodium salt hydrate (PAR) จาก Fluka
- Acetic acid glacial 100% , Copper (II) sulphate ($Cu(SO_4).5H_2O$), Lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$) , Nickel(II) sulphate ($NiSO_4.6H_2O$), Potassium hydroxide (KOH), Pyridine-2,6-dicarboxylic acid (PDCA) และ Zinc chloride ($ZnCl_2$) จาก Merck
- Cadmium chloride ($CdCl_2$) จาก Riedel-De Haen AG Seeize-Hannover

3. <u>การเตรียมสารละลายมาตรฐานและรีเอเจนต์</u>

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมดเตรียมด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีความต้านทาน 18.3 MΩ-cm จากข้อ 2.1

3.1 การเตรียมตัวชะ (Eluent) ส่วนประกอบ

- 7.0 mM Pyridine-2,6- dicarboxylic acid (PDCA)
- 66 mM Potassium hydroxide
- 74 mM Potassium sulphate
- 5.6 mM Formic acid

<u>วิธีเตรียม</u>

เตรียมสารละลายให้มีส่วนผสมของ KOH 3.7033 กรัม และ PDCA 1.1698 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารละลายที่มี K_2SO_4 0.9759 กรัมเติมลงในสารผสมข้างต้น จากนั้นเติม Formic acid 2.8 ml ทำให้สารละลายมีปริมาตรใกล้ถึง 1 ลิตร ปรับ PH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 4.2 $\pm$0.1 เทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1.0 ลิตร แล้วเจือจางให้พอดีขีดด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าทั่ว นำสารละลายไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm แล้วนำไป sonicate เพื่อไล่แก๊สเป็นเวลา 15 นาที

3.2 การเตรียม Post Column Reagent ส่วนประกอบ

- 0.3 mM PAR [4-(2-Pyridylazo) resocinol monosodium salt hydrate]
- 1 M Acetic Acid
- 3 M NH_4OH

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลาย PAR 0.077 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออนที่เตรียมใหม่ๆแล้วเทลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตรที่มี DI water 400 ml และ NH_4OH เข้มข้น 30% ความหนาแน่น 0.892 จำนวน 392.9 ml บรรจุอยู่ พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องคน จากนั้นจึงค่อยๆเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 57.5ml (ให้ทำในตู้ควัน) ปรับ pH ให้ได้ 10.4 $\pm$0.2 นำสารละลายมาเจือจางให้พอดีขีดในขวดวัดปริมาตรขนาด

1 ลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 μm เก็บสารละลายในขวดพลาสติกสำหรับใช้งาน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้งาน

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ Pb^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} และ Mn^{2+}

เตรียม stock solution ของไอออนแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1000 ppm ด้วยน้ำปราศจากไอออน โดยทำให้สารละลายมี pH เท่ากับ 2 ด้วยกรดไนตริก เพื่อการเก็บรักษา จาก stock solution ของไอออนแต่ละตัวนำมาเตรียมให้เป็นสารละลายผสมของไอออนทั้ง 8 ชนิด ที่มีความเข้มข้น 100 ppm ยกเว้น Pb^{2+}และ Cd^{2+} ให้มีความเข้มข้น 200 ppm จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มข้นของโลหะหนักในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

Metals	ความเข้มข้นของ Standard calibration curve (ppm)				
	Level	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Pb^{2+}	0	2	4	8	16
Fe^{3+}	0	1	2	4	8
Cu^{2+}	0	1	2	4	8
Ni^{2+}	0	1	2	4	8
Zn^{2+}	0	1	2	4	8
Co^{2+}	0	1	2	4	8
Cd^{2+}	0	2	4	8	16
Mn^{2+}	0	1	2	4	8

4. วิธีการทดลอง

4.1 เงื่อนไขที่ใช้ในการ run chromatogram คือ

Column	: IonPac CS5A (4 x 250 mm), CG5A (4 x 50 mm)
Eluent	: Pyridine 2, 6- dicarboxylic acid (PDCA)
Flow rate	: 1.2 ml/min
Injection Volumn	: 25 µl
Potassium Reagent	: 4-(2-pyridylazo) resorcinol [PAR]
Detector	: UV-VIS detector at 530 nm.

4.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำเสียก่อน run chromatogram

น้ำเสียที่เก็บมาได้ให้เติมกรด HNO_3 เข้มข้น 1 ml ต่อตัวอย่างน้ำเสีย 1 ลิตร แล้วเก็บไว้วิเคราะห์ (เก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือน) ก่อน run chromatogram ให้ใช้ SPE ODS Cartridge ในการ clean up ตัวอย่าง ซึ่งทำโดยผ่านน้ำตัวอย่างลงใน ODS Cartridge ที่ condition แล้ว เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจาก ODS Cartridge กรองอีกครั้งด้วย Syringe membrane filter ขนาด 0.2 µm แล้วจึงนำไป run chromatogram

หมายเหตุ วิธีการ condition ODS Cartridge ทำโดยผ่านน้ำ DI 2 ml ลงใน Cartridge ตามด้วย methanol 5 ml แล้วล้างด้วยน้ำ DI อีก 5 ml เป่าให้แห้ง จากนั้นจึงผ่านตัวอย่างน้ำเสียโดยทิ้ง 4-5 หยดแรก ก่อนเก็บส่วนต่อไป นำไป run chromatogram

4.3 ให้อ่านวิธีการใช้ เครื่องในการวิเคราะห์โลหะ transition ในหัวข้อ 2.2 ให้เข้าใจ

4.4 ติดตั้งขวดบรรจุตัวชะเข้ากับ line e

4.5 เปิดวาล์วถังแก๊สไนโตรเจน และวาล์ว EO1 เปิดเครื่อง IC และคอมพิวเตอร์

4.6 ติดตั้งคอลัมน์สำหรับวิเคราะห์โลหะทรานซิชัน CS 5A พร้อม guard column CG 5A และ เข้าระบบของเครื่อง IC DX 500 โดยก่อนที่จะเชื่อมคอลัมน์เข้ากับปั๊ม ต้องทำการไล่อากาศออกจากระบบปั๊มก่อน

4.7 ใส่ขวดบรรจุ post column reagent (PCR) เข้าที่ PC 10

4.8 สร้าง method และ run chromatogram เพื่อทำ name peak

4.9 run chromatogram ของสารมาตรฐานทั้ง 5 ระดับ แล้ว save method

4.10 load method ที่สร้างกราฟมาตรฐานไว้แล้วมา run chromatogram ของตัวอย่างน้ำเสีย

4.11 เปิดฟอร์มรายงานเพื่อดูว่าในน้ำเสียมีโลหะหนักชนิดใดอยู่บ้าง และแต่ละชนิดมีปริมาณเท่าไร

4.12 สรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ผลพร้อมทำรายงาน