ภาคผนวก ก

การตั้งเครื่องและปิดเครื่อง (setting up and closing down)

ระบบวิเคราะห์การไหลแบบต่อเนื่อง ของ ChemLab Instrument Ltd. (England) รุ่น CPP15SB

การวิเคราะห์ด้วยการไหลแบบต่อเนื่อง

เครื่องมือที่ใช้เป็นระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ มีการไหลของสารอย่างต่อเนื่อง โดยมีของเหลวไหลสลับกับฟองอากาศเป็นรูปแบบเดียวกันตลอดทั้งระบบ (segmented flow) ดังแสดงรูปที่ ก-1 การนำฟองอากาศมาใช้ในระบบการไหล มีข้อดี คือ เมื่อมีการผสมกันของของเหลวระหว่างฟองอากาศ 2 ฟอง จะเกิดการแรงต้านเนื่องจากการเสียดสีผนังท่อ ทำให้เกิดการไหลทะลักช่วยให้การผสมผสานเกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้การแยกกันที่สมบูรณ์ระหว่างแต่ละคู่ของเหลวกับฟองอากาศ เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายและการไหลผสมกันของแต่ละตัวอย่าง จึงลดการปนเปื้อนระหว่างการวิเคราะห์สารตัวอย่าง และฟองอากาศยังทำหน้าที่ล้างผนังท่ออย่างต่อเนื่อง โดยการเสียดสีของอากาศกับผนังท่อ จะทำให้แผ่นฟิล์มของเหลวที่เคลือบอยู่บนผนังท่อถูกขับออกจากผนังท่อ เป็นการขจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากผนังท่อให้ออกตามสารตัวอย่างในขณะที่ไหลไป

รูปที่ ก-1 ฟองอากาศสลับกับสารละลายในระบบการไหลแบบ segmented flow (รูปจาก http:/www.uga.edu/~sisbl/contin.html)

หลักการ

สารละลายจะถูกส่งให้ไหลต่อเนื่องผ่านระบบท่อ โดยแยกกันไประหว่างตัวอย่าง (หรือสารละลายมาตรฐาน) และรีเอเจนต์ ขณะเดียวกันมีการปั๊มอากาศ (หรือก๊าซเฉื่อย) เข้าไปในระบบท่อทั้งของตัวอย่างและรีเอเจนต์ ทำให้มีการไหลสลับระหว่างของเหลวกับฟองอากาศอย่างต่อเนื่อง

โดยตัวอย่างกับรีเอเจนต์จะไหลมาบรรจบกันที่ไดอะไลเซอร์ (dialyser) ซึ่งมีเมมเบรน (membrane) เป็นส่วนประกอบ จะเกิดการแลกเปลี่ยนสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง โดยจะผ่านเมมเบรนไปยังระบบการไหลของรีเอเจนต์ จากนั้นสารที่ต้องการวิเคราะห์และรีเอเจนต์จะถูกนำเข้าผสมผสานกันในระบบท่อ ซึ่งขดเป็นวงเพื่อเพิ่มเวลา (ระยะทาง) เพื่อให้เกิดการผสมผสานอย่างดีระหว่างของเหลวที่มีความหนืดต่างกัน ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี จนกระทั่งสิ้นสุดระบบการไหล สารละลายที่มีสีที่ได้ จะถูกส่งไปยังเซลล์ของตัวตรวจวัดการดูดกลืนแสง

ภายในระบบการไหลแบบต่อเนื่องมีลักษณะสำคัญ 2 ลักษณะ (Hydes, 1984) คือ

1. ช่วงฟองอากาศและการผสม ช่วงฟองอากาศพิจารณาจากขนาดฟองอากาศ เมื่ออากาศถูกปั๊มเข้าไปในระบบ อากาศจะขยายตัวจนพอดีกับขนาดของท่อ แล้วแบ่งออกเป็นช่วงสลับกับตัวอย่างและรีเอเจนต์ โดยที่ขนาดของฟองอากาศจะขึ้นกับรูปร่างของตัวฉีดและแรงตึงผิวของสารเคมีผสม แต่ไม่ขึ้นกับอัตราการไหลเข้าของอากาศ โดยขนาดฟองอากาศที่เหมาะสม คือ ความยาวประมาณ 2 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อ สำหรับช่วงฟองอากาศที่ไหลผ่านท่อซึ่งขดเป็นวง หรือคอยล์ (coil) ความยาวที่เหมาะสม คือ 2.5 - 3 ช่วงฟองอากาศต่อคอยล์หนึ่งรอบ มีข้อดี คือทำให้เกิดผสมของสารที่มีความหนืดต่างกัน
2. อัตราการดูดและการลำเลียงตัวอย่าง เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไหลผ่านไปยังเซลล์วัดการดูดกลืนแสง จะมีการดึงฟองอากาศออกจากระบบการไหล ทำให้เกิดปัญหาการลำเลียงสารตัวอย่างแรกกับสารตัวอย่างถัดไป ภายในระบบการไหลบริเวณเซลล์วัดการดูดกลืนแสง คือ เกิดการซ้อนทับของพีค (overlapping peak) บนกระดาษชาร์ตระหว่างสารตัวอย่างแรกกับตัวถัดไป ดังนั้นจึงต้องมีการล้างสารละลายที่มีสีออกจากเซลล์ตรวจวัด โดยการดูดน้ำดีไอออไนซ์ที่ใช้ทำแบลงค์พร้อมรีเอเจนต์เข้าในระบบการไหลระยะหนึ่ง เพื่อให้พีคลงมายังเส้นฐาน เวลาในการล้างขึ้นอยู่กับรูปร่างของเซลล์ตรวจวัด และความหนืดของสาร

ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นและระหว่างตัวอย่างแต่ละตัว ระบบการไหลจะต้องอยู่ในสภาวะการตอบสนองที่เป็นศูนย์ (zeroed) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ หรือสัญญาณอยู่ที่เส้นฐาน (base line) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อระบบอยู่ในสภาวะการล้างโดยแบลงค์หรือน้ำดีไอออไนซ์ร่วมกับรีเอเจนต์

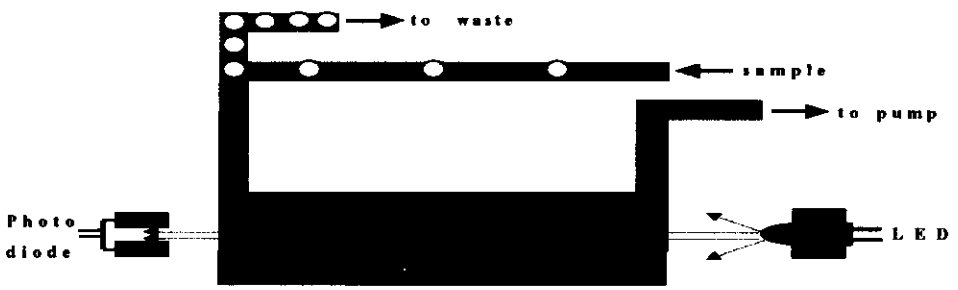
การวัดการตอบสนองใช้การวัดความสูงของสัญญาณ หรือพีค (peak-detecting method) ซึ่งตัวอย่างให้ค่าการตอบสนองการดูดกลืนแสงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ภายใต้

สภาวะที่ควบคุมในระบบการไหล (ปฏิกิริยาเคมี ความเข้มข้นของสารเคมี อุณหภูมิ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา) การวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีนั้น สามารถวัดความเข้มข้นของตัวอย่างได้โดยอาศัยกฎของเบียร์ (Beer's law) คือ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงของตัวถูกละลาย เป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายนั้น ๆ

การตรวจวัดการดูดกลืนแสง

เมื่อสารตัวอย่าง (หรือสารละลายมาตฐาน) ผ่านระบบการไหลเข้าผสมกับรีเอเจนต์ที่เหมาะสม และเกิดปฏิกิริยาเคมี ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีที่เกิดขึ้นก็จะถูกส่งผ่านไปยังเซลล์ของตัวตรวจวัดเพื่อตรวจวัดการดูดกลืนแสง โดยก่อนที่สารละลายจะเข้าไปยังเซลล์ตรวจวัด จะต้องมีการดึงฟองอากาศออกจากระบบการไหลเสียก่อน (รูปที่ ก-2)

แหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็น Ligth Emitting Diode (LED) ซึ่งมีข้อดี คือ ขนาดเล็ก ใช้พลังงานไม่สูง ประสิทธิภาพดีและราคาถูกโดยแสงจากแหล่งกำเนิดจะส่องผ่านตัวเลือกความยาวคลื่น(ซึ่งเรียกว่า ฟิลเตอร์ (filter) เพื่อให้ได้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับการดูดกลืนแสงของสารแต่ละตัว) ก่อนที่แสงจะส่องทะลุผ่านเซลล์ ไปยังตัวตรวจวัดการดูดกลืนแสง หรือ Photo Diode) ดังแสดงในรูปที่ 1-3



รูปที่ ก-2 การดึงฟองอากาศออกจากเซลล์ของตัวตรวจวัด
(ดัดแปลงจาก Hansen and Koroleff, 1999)

1. สัญญลักษณ์สีของสายยาง

Colour code	Inner diameter (inches)	Flow rate (mL/min)
Macro pumping tube		
Black (Bk)	0.030	0.32 (0.33)*
Orange (O)	0.035	0.42 (0.42)*
Colourless (W)	0.040	0.60 (0.60)*
Red (R)	0.045	0.80 (0.78)*
Grey (Gy)	0.050	1.00 (1.00)*
Yellow	0.056	1.20
Blue - Yellow (Bu-Y)	0.060	1.40 (1.37)*
Blue	0.065	1.60
Green	0.073	2.00
Purple	0.081	2.50
Purple-black	0.090	2.90
Purple-orange	0.100	3.40
Purple-colourless (P-W)	0.110	3.90 (3.80)*
Micro pumping tube		
Orange-black	0.005	0.015
Orange-red	0.0075	0.030
Orange-blue	0.010	0.048
Orange-green (O-Gn)	0.015	0.096 (0.100)*
Orange-yellow (O-W)	0.020	0.159 (0.16)*
Orange-white (O-W)	0.025	0.235 (0.23)*

* คือ ค่าที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการสำหรับท่อที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารแต่ละ ชนิด

2. วิธีการใช้เครื่องมือ

เมื่อติดตั้งเครื่องมือแล้ว ทำการเดินเครื่องเพื่อให้สารละลายไหลเข้าระบบ เมื่อได้เส้นฐานที่คงที่แล้ว ดำเนินการ ดังต่อไปนี้

1. นำสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละชนิดบรรจุลงในถ้วยตัวอย่าง
2. วางลงในถาดบนเครื่องดูดสารอัตโนมัติ ระหว่างสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและระหว่างตัวอย่างแต่ละตัว จะแทรกด้วยถ้วยน้ำดีไอออไนซ์ เพื่อให้การล้างระบบสมบูรณ์ขึ้น
3. ตั้งเวลาที่เหมาะสมในการดูดและล้างตัวอย่าง จากนั้นเปิดเครื่องดูดสารอัตโนมัติ ตัวอย่างจะถูกดูดเข้าไปยังระบบการไหล สลับน้ำดีไอออไนซ์ ตลอดการวิเคราะห์
4. เมื่อตัวอย่างถูกดูดเข้าไปในระบบ จะไหลเข้าไปผสมกับรีเอเจนต์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับสารอาหารแต่ละชนิด เมื่อสิ้นสุดระบบการไหลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์
5. สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีที่เกิดขึ้น จะไหลผ่านไปยังส่วนของตัวตรวจวัด โดยผ่านเซลล์ของระบบการไหล (flow cell) ดังแสดงในรูปที่ 2-2 ซึ่งฟองอากาศถูกดึงออกจากระบบโดยใช้เพอริสตาติคปั๊มช่วย
6. สารละลายที่ไม่มีฟองอากาศจะผ่านเซลล์ในส่วนที่เป็นทางผ่านของแสงจากแหล่งกำเนิดแสง และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม
7. เครื่องรายงานผลจะแสดงสัญญาณการตอบสนองตามปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างกับรีเอเจนต์ ปริมาณสารอาหารปริมาณน้อยจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีที่เกิดขึ้น
8. ความเข้มข้นของสารอาหารปริมาณน้อยได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งได้จากการเขียนกราฟระหว่างสัญญาณที่เกิดขึ้น (ความสูงของพีค) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ค่าการตอบสนองมีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์

3. การตั้งระบบเริ่มต้น

จัดสายยางต่อเข้าปั๊ม แต่ละสายวางลงในชุดควบคุมการไหล (peristaltic pump manifold) ดังรูปที่แสดงวงจรการไหลของสารเคมีสำหรับสารอาหารแต่ละชนิด ดังนี้

- รูปที่ 2-2 ในบทที่ 2 สำหรับการวิเคราะห์ ไนไตรต์หรือไนเตรต
- รูปที่ 2-3 ในบทที่ 2 สำหรับการวิเคราะห์ แอมโมเนีย
- รูปที่ 2-4 ในบทที่ 2 สำหรับการวิเคราะห์ ฟอสเฟต

การต่อสายยางให้ใช้สายยางแต่ละสายให้สั้นที่สุด โดยที่ความยาวของสายยางที่จุ่มลงในขวดสารเคมี อยู่พอดีกับก้นขวดบรรจุสารเคมี

4. การเปิดเครื่องในแต่ละครั้งที่วิเคราะห์

วอร์มเครื่อง โดยเปิดตัวตรวจวัดและอ่างควบคุมอุณหภูมินาน 1 ชั่วโมง และเปิดเครื่องรายงานผลแบบกระดาษนาน 20 นาที จากนั้นเริ่มต้นเปิดปั๊มน้ำรีเอเจนต์และน้ำดีไอออไนซ์ เพื่อเป็นแบลงค์เข้าระบบการไหล โดยที่รูปแบบฟองอากาศต้องเหมือนกันตลอดทั้งระบบ สังเกตที่เส้นฐานจนกระทั่งเส้นฐานคงที่ จึงจะทำการใช้เครื่องเพื่อการวิเคราะห์

ก่อนวิเคราะห์สารตัวอย่าง ตรวจสอบเครื่อง โดยการดูดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูง 3 ความเข้มข้น เพื่อตรวจสอบว่าอยู่ในสเกลหรือไม่ และให้ค่าการตอบสนองดังที่ควรจะเป็นหรือไม่

5. การปิดเครื่อง

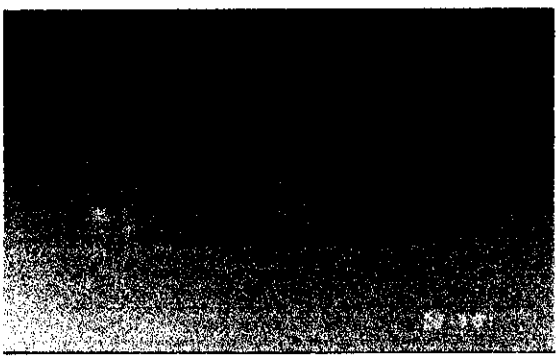
เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ ดึงสายยางออกจากขวดสารเคมี จุ่มสายยางลงในภาชนะที่บรรจุน้ำกลั่น หรือสารเคมีที่ใช้สำหรับล้าง เปิดปั๊มทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ถ้าไม่ได้ใช้หลายวัน ให้ปั๊มน้ำกลั่นผ่านนาน 15 นาที แล้วปั๊มต่อให้น้ำออกจากระบบให้แห้ง (Hydes, 1984) แล้วปลดสายยางทุกเส้นออกจากตัวยึด เพื่อยืดอายุการใช้งานของสายยาง

6. การปรับเส้นฐาน

หลังจากวอร์มตัวตรวจวัด เครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเครื่องรายงานผล เรียบร้อยแล้ว เปิดปั๊มเพื่อดูดสารเคมีและน้ำดีไอออไนซ์ (แบลงค์) เข้าสู่ระบบการไหลเกิดรูปแบบฟองอากาศเหมือนกันตลอดทั้งระบบ เมื่อแบลงค์ไหลไปยังเซลล์ของตัวตรวจวัด (ฟองอากาศจะถูกดึงออก) จากนั้นเลือกการรายงานผลของเครื่องรายงานผลเป็นการวัดศักย์ไฟฟ้า (potentiometric recorder) เพื่อ

ปรับเส้นฐานให้ได้เส้นฐานที่เหมาะสมตามที่เลือกไว้ โดยใช้ปุ่มควบคุมศูนย์ การปรับสัญญาณเข้า (input) การปรับขยายสัญญาณ (gain) ปุ่มควบคุมชัตเตอร์ (shutter) ปุ่มควบคุมละเอียด (fine control) ปรับให้ปากกาให้อยู่ในตำแหน่งของเส้นฐานที่เลือกไว้ เพื่อให้ได้เส้นฐานที่คงที่ ตามตำแหน่งที่ต้องการ และให้ความไววิเคราะห์สูงสุด

7. เมื่อได้เส้นฐานคงที่แล้ว เลือกความเร็วกระดาษที่เหมาะสม คือ 10 –30 เซนติเมตรต่อนาที จากนั้นก่อนวิเคราะห์สามารถปรับขยายหรือลดสัญญาณ ให้เหมาะสมกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์



รูปที่ ก-3 ลักษณะเซลล์ของระบบการไหลที่บรรจุในส่วนของการตรวจวัด

ภาคผนวก ข

สารเคมี และวิธีการเตรียมรีเอเจนต์

1. สารเคมี

- ไตรโซเดียมซิเตรต (trisodium citrate : $Na_3C_6H_8O_7.H_2O$, AR Grade, Unilab, Australia)
- บี อาร์ ไอ เจ (Brij-35 GRP 30% w/v, AR Grade, Merck, Germany)
- โซเดียมซาลิไซเลต (sodium salicylate : $C_6H_4(OH)COONa$, M&B Laboratory Chemicals, England)
- โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside : Na_2 [Fe (III) $(CN)_5$ NO].H_2O, Merck, Germany)
- โซเดียมไดคลอโรไอโซไซยานิวเรต (sodium dichloroisocyanurate : $C_3Cl_2N_3NaO_3.2H_2O$, Fluka, Switzerland)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH, Eka Nobel, Sweden)
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride : NH_4Cl, AR Grade, Merck, Germany)
- คอปเปอร์(II)ซัลเฟต (copper (II) sulphate : $CuSO_4.5H_2O$, AR Grade,Merck, Germany)
- ไฮดราซีนซัลเฟต (hydrazine sulphate : $H_6N_2O_4S$, AR Grade, Riedel-dehaen, Germany)
- ซัลฟานิลาไมด์ (sulphanilamide : $C_6H_8N_2O_2S$ AR Grade, Fluka, Switzerland)
- 85 %กรดฟอสฟอริค (phosphoric acid : H_3PO_4, Univar, Australia)
- โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate : KNO_3 AR Grade, Carlo erba, Italy)
- โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite : $NaNO_2$, AR Grade, BDH Chemicals, England)
- 98 % กรดซัลฟูริค (sulphuric acid : H_2SO_4, AR Grade, J.T. Baker, USA)
- โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate : $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, AR Grade, Fluka, Switzerland)
- แอมโมเนียโมลิบเดต (ammonium molybdate : $(NH_4)_4$ $Mo_7O_{24}.4H_2O$, AR Grade, Merck, Germany)

- แอนติโมนีโพแทสเซียมตาร์เตรต (antimony potassium tartrate : $KSbO.C_4H_4O_6$, AR Grade, Carlo Erba, Italy)
- กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid : $C_6H_8O_6$, AR Grade, Fluka, Switzerland)
- อาซีโตน (acetone : C_3H_6O, AR Grade, Merck, Germany)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (potassium dihydrogen orthophosphate : KH_2PO_4, AR Grade, Carlo Erba, Italy)
- โซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride : solid NaF, AR Grade, Merck, Germany)
- ซิลเวอร์ซัลเฟต (silversulphate : Ag_2SO_4, AR Grade, Merck, Germany)
- โพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dicromate : $K_2Cr_2O_7$, AR Grade, Carlo Erba, Italy)
- แอมโมเนียมไอรอน(II)ซัลเฟต (ammonium iron(II)sulphate : $(NH_4)_2SO_4.FeSO_4.6H_2O$, AR Grade, Fisher Chemical, UK)
- ไดฟีนิลลามีน (diphynilamine : $C_{12}H_{11}N$ AR Grade, Fluka, Switzerland)
- ก๊าซไนโตรเจน (N_2, ไทยอินดัสเตรียส จำกัด, ประเทศไทย)
- น้ำกลั่นดีไอออไนซ์

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอมโมเนีย

1) ซิเตรต บัฟเฟอร์ (citrate buffer) ประกอบด้วย
   - trisodium citrate 40.00 กรัม
   - Brij-35 (GRP 30% w/v) 1.00 มิลลิลิตร
   - น้ำดีไอออไนซ์
   - ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2) ซาลิไซเลต (salicylate) ประกอบด้วย
   - sodium salicylate 34.00 กรัม
   - sodium nitroprusside 40.00 กรัม
   - น้ำดีไอออไนซ์
   - ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3) สารละลาย ดี.ไอ.ซี. (D.I.C.) ประกอบด้วย

- sodium dichloroisocyanurate 0.80 กรัม
- sodium hydroxide 10.00 กรัม
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย 71.43 มิลลิโมลต่อลิตร (1000 mgN/L)

- ammonium chloride 3.8170 กรัม
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ออกซิไดซ์ไนโตรเจนรวม

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 โมลาร์ (ควรเก็บในขวดพลาสติก)

- sodiumhydroxide (NaOH) 16.00 กรัม
- Brij-35 (GPR, 30% w\v) 1.00 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์

2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ (ควรเก็บในขวดพลาสติก)

- sodiumhydroxide (NaOH) 8.00 กรัม
- Brij-35 (GPR, 30% w\v) 1.00 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์

3) สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต[1]

- คอปเปอร์ซัลเฟต 4.00 กรัม
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์

4) สารละลายคอปเปอร์–ไฮดราซีน[2]

- ไฮดราซีนซัลเฟต 1.50 กรัม
- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 3.00 มิลลิลิตร
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์

---

[1] ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในน้ำ และ ผสมให้ละลายได้ดี

[2] ละลายไฮดราซีนซัลเฟตในน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5) สารละลายซัลฟานิลาไมด์

- ซัลฟานิลาไมด์ 10 กรัม
- 85 % กรดฟอสฟอริค 100.00 มิลลิลิตร
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6) การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรต 7142.86 ไมโครโมลต่อลิตร (100 mgN/L)[3]

- โพแทสเซียมไนเตรต 7.1280 กรัม
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

7) สารละลายมาตรฐานไนไตรต์ 7142.86 ไมโครโมลต่อลิตร (100 mgN/L)[4]

- โซเดียมไนไตรต์ 4.9260 กรัม
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอสเฟต

1) กรดซัลฟูริค[5] ประกอบด้วย

- 98 % กรดซัลฟูริค 20.00 มิลลิลิตร
- โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 0.50 กรัม
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

---

[3] เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เป็นตัวพรีเซอร์เวทีฟ

[4] เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เป็นตัวพรีเซอร์เวทีฟ

[5] เติมกรดลงในน้ำกลั่นดีไอออไนซ์ประมาณ 900 มิลลิลิตร แล้วเติม S.D.S. คนจนละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2) สารละลายโมลิบเดต[6] ประกอบด้วย

- แอมโมเนียม โมลิบเดต 10.00 กรัม
- แอนติโมนีโพแทนเซียมทาร์เตรต 0.20 กรัม
- 98 % กรดซัลฟูริค 62.00 มิลลิลิตร
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3) ascorbic acid[7] ประกอบด้วย

- กรดแอสคอบิค18.00 กรัม
- อาซีโตน 5.00 มิลลิลิตร
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 32,289.31 ไมโครโมลต่อลิตร (1,000 mgP/L)

- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.3950 กรัม
- 98 % กรดซัลฟูริค 1.0 มิลลิลิตร
- น้ำดีไอออไนซ์
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

หมายเหตุ :

1. สารนอนไอออนิค ดีเทอร์เจน (ที่มีกลุ่มโพลีเอธลีน) เช่น บริดจ์-35, ไตรตัน เอ็กซ์-100, โนไนเดท พี-40, ทวีน-80 จะทำปฏิกิริยากับโมลิบเดต ทำให้เกิดสัญญาณรบกวน ควรใช้โซเดียมโดดีซิล ซัลเฟต หรือแอโรซอล-21 (cynamid UK.Ltd.) หรืออัตราเวท 60-แอล (Sigma)
2. โมลิบดินัมบลู มักจะดูดซึมตามท่อพีวีซี ทำให้เกิดสัญญาณมีหาง (tailling) แก้ไขโดยการใช้ท่อทนกรด ในระหว่างระบบและเซลล์ของการไหล

---

[6] เติมกรดลงในน้ำ 800 มิลลิลิตร ละลายโมลิบเดต แล้วตามด้วย antimony potassium tartrate เติมน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ถ้าสารละลายที่ได้ขุ่นหรือมีสีน้ำเงินควรเตรียมใหม่

[7] ละลายกรดแอสคอบิคในน้ำกลั่นดีไอออไนซ์ แล้วเติมอาซีโตน ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บได้นาน 1 อาทิตย์ ที่ 0-4 °C หรือควรเตรียมใช้ใหม่ ๆ

ภาคผนวก ค

วิธีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของรีดิวซิงเอเจนต์

1. ละลาย hydrazine sulfate 1 g ในน้ำดีไอออไนซ์ประมาณ 80 mL เติม copper sulfate stock solution 4 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำดีไอออไนซ์ จนครบ 100 mL
2. สารละลายที่เตรียมได้นี้ นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.0–2.6 g/L โดยเพิ่มครั้งละ 0.2 g/L ใส่สารละลายที่เตรียมได้ในถ้วยตัวอย่าง แล้ววางเรียงลงในเครื่องดูดสารตัวอย่าง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป จากนั้นต่อสาย hydrazine เข้ากับเครื่องดูดสารตัวอย่าง
3. สายตัวอย่างวางในน้ำดีไอออไนซ์ จนกระทั่ง baseline คงที่ หลังจากนั้นเปลี่ยนสายตัวอย่างเป็นสารละลายไนไตรต์ 5 mg-N/L (357.14 ไมโครโมลต่อลิตร) เดินเครื่องจนได้ค่าสูงสุด บันทึกค่าการตอบสนองที่ได้ เพื่อเปรียบเทียบกับค่าการตอบสนองต่อไนเตรตที่ได้ในข้อ 4.

สุดท้ายเปลี่ยนสายตัวอย่างเป็นสารละลายไนเตรต 5 mg-N/L (357.14 ไมโครโมลต่อลิตร) เดินเครื่องดูดสารตัวอย่าง โดยดูด Copper hydrazine solution แต่ละความเข้มข้น เพื่อหาปริมาณของ copper hydrazine ที่เหมาะสม คือ ให้ความสูงของพีคไนเตรต เท่ากับไนไตรต์ที่ได้จากข้อ 3

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ออกซิไดซ์ง่าย

1. หลักการวิเคราะห์

เนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์จะปลดปล่อยสารอาหารปริมาณน้อยออกมา วิธีการวิเคราะห์แบบ Walkey–Black (1947) ซึ่งพัฒนาโดย Jackson (1958) (Loring and Rantala, 1993) เป็นวิธีที่เหมาะสม เพราะว่านอกจากจะสะดวกแล้ว ยังสามารถแยกสารฮิวมัสออกจากคาร์บอนอื่น ๆ และคาร์บอนอินทรีย์ที่เฉื่อยต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และเป็นวิธีที่ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับวิธีการสันดาป (LECO combusion) (Gaudette *et al.*, 1974)

หลักการวิเคราะห์ คือ ในสภาวะที่เป็นกรด คาร์บอนอินทรีย์ในตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับไดโครเมต ดังแสดงในสมการ 2-1

$$2Cr_2O_7^{2-} + 3C + 28H^+ \rightarrow 4Cr^{3+} + 3C^{4+} + 14H_2O \qquad \text{ง-1}$$

เมื่อใส่ไดโครเมตให้มีปริมาณที่มากเกินพอ เมื่อคาร์บอนอินทรีย์ถูกออกซิไดซ์ไปหมดแล้ว สามารถหาปริมาณไดโครเมตที่เหลือ โดยปฏิกิริยารีดักชันของโครเมตด้วยสารละลายเฟอรัส ใช้ไดฟีนิลลามีนเป็นอินดิเคเตอร์ เติมกรดฟอสฟอริคลงไปเพื่อให้สังเกตจุดยุติได้ง่ายขึ้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงในสมการ 2-2

$$Cr_2O_7^{2-} + 6Fe(NH_4)_2^{4+} + 14H^+ \rightarrow 2Cr^{3+} + 6Fe(NH_4)^{4+} + 6NH_4^+ + 7H_2O \qquad \text{ง-2}$$

เนื่องจากไดโครเมตทำปฏิกิริยากับคลอไรด์ไอออน ดังสมการ 2-3 เพื่อป้องกันการสูญเสียไดโครเมตรไปในปฏิกิริยานี้ จึงมีการเติมซิลเวอร์ซัลเฟต

$$Cr_2O_7^{2-} + 6Cl^- + 14H^+ \rightarrow 2Cr^{3+} + 3Cl_2 + 7H_2O \qquad \text{ง-3}$$

2. สารเคมีและวิธีการเตรียม

- ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4 AR Grade, Merck, Germany)

  ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต 2.5 กรัมในกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1 ลิตร
- สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 1.0 นอร์มาลิตี

  ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 49.04 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1000 มิลลิลิตร
- สารละลายเฟอรัส 0.5 นอร์มาลิตี

  ละลายแอมโมเนียมไอรอน (II) ซัลเฟต 196.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟูริคเข้มข้นอยู่ 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร
- ไดฟีนิลลามีนอินดิเคเตอร์

  ละลายไดฟีนิลลามีน 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กับกรดซัลฟูริคเข้มข้น 100 มิลลิลิตร

3. วิธีการวิเคราะห์

4. ร่อนขนาดตะกอนแห้งผ่านตะแกรงขนาด 200 ไมครอน เพื่อคัดขนาดอนุภาคหยาบออก
5. ชั่งตะกอนแห้งซึ่งร่อนแล้วประมาณ 0.5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร โดยไขจากบิวเรต และสารละลายผสมของกรดซัลฟูริคเข้มข้นกับซิลเวอร์ซัลเฟต 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันประมาณ 1 นาที ระมัดระวังอย่าให้ตะกอนกระเด็นไปติดข้างขวด เพราะสารเคมีเข้าทำปฏิกิริยาไม่ถึง)
7. ทิ้งไว้ 30นาที
8. เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร 85 % กรดออร์โธฟอสฟอริค 10 มิลลิลิตร และโซเดียมฟลูอไรด์ 0.2 กรัม ตามลำดับ
9. นำไปไทเทรตกับสารละลายเฟอรัส 0.5 นอร์มาลิตี เพื่อหาปริมาณไดโครเมตที่เหลือ จุดยุติสังเกตจากสารละลายซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มใส (brillian green) จดปริมาตรสารละลายเฟอรัสที่ใช้ไป
10. ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 2 ถึง 6 ซ้ำอีก 2 ซ้ำ
11. ทำแบลงค์ โดยวิธีการเดียวกัน ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 6 แต่ไม่ใช้ตะกอน

4. การคำนวณหาปริมาณสารอินทรีย์

ปริมาณสารอินทรีย์ที่ได้จากการไทเทรตคำนวณได้จากสมการ

$$\text{เปอร์เซนต์สารอินทรีย์} = 10\,(1 - T / S) \times F$$

เมื่อ T คือ จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสที่ใช้ในการไทเทรตสารตัวอย่าง

S คือ จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสที่ใช้ในการไทเทรตแบลงค์

F คือ แฟคเตอร์ หาได้จากสมการ

$$F = (1.0\ N) \times 12/4000 \times 1.72 \times 100 / \text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}$$

เมื่อ 12/4000 คือ มิลลิกรัมสมมูล (milli-equivalent weigth)

1.72 คือ แฟคเตอร์ของคาร์บอนที่อยู่ในสารอินทรีย์

ถ้าน้ำหนักตัวอย่างตะกอนเท่ากับ 0.500 กรัม ค่า F จะมีค่าเป็น 1.03

5. การทำมาตรฐานในการวิเคราะห์สารอินทรีย์

การทำมาตรฐานของสารละลายที่ใช้เด็กโตรส ($C_6H_{12}O_6$) เป็นสารมาตรฐานในการไทเทรตสารอินทรีย์ กล่าวคือ ในเด็กโตรสจะมีคาร์บอนอยู่ 39.99 เปอร์เซนต์ การทำมาตรฐาน มีขั้นตอนดังนี้

1) ชั่งเด็กโตรสมาอย่างละเอียด 0.01 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่
2) ทำการทดลองหาปริมาณคาร์บอนวิธีการเหมือนกับตัวอย่าง
3) คำนวณหาปริมาณเปอร์เซนต์คาร์บอน ซึ่งต้องได้ค่าใกล้เคียงกับ 39.99 เปอร์เซนต์ ดังวิธีการคำนวณดังสมการ

$$\text{เปอร์เซนต์คาร์บอน} = 10\,(1 - T / S) * F$$

$F = (1.0\ N) * 12/4000 * 100 / \text{น้ำหนักเด็กโตรส}$ มีค่าเป็น 30 เมื่อเด็กโตรสหนัก 0.01 กรัม

ภาคผนวก จ

ตาราง จ-1 ค่าการตอบสนองของสัญญาณเหนือแบลงค์ของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และไนเตรต คือ 0.25, 0.025 และ 0.10 mg-N/L ตามลำดับ และสำหรับฟอสเฟต คือ 0.025 mg-P/L (หรือเท่ากับ 20.0, 1.79, 7.14 และ 0.81 μmol/L) แต่ละชนิด

ครั้งที่	ค่าการตอบสนอง (mV)			
	แอมโมเนีย	ไนไตรต์	ไนเตรต	ฟอสเฟต
1	2.97	0.50	0.88	0.90
2	2.81	0.52	0.96	0.90
3	2.81	0.50	0.88	0.88
4	2.97	0.52	0.92	0.88
5	2.81	0.52	0.84	0.88
6	2.81	0.50	0.92	0.90
7	2.65	0.50	0.92	0.88
8	2.81	0.50	0.96	0.88
9	2.81	0.52	0.92	0.88
10	2.81	0.52	0.96	0.88
11	2.81	0.52	0.88	0.90
12	2.81	0.52	0.88	0.88
13	2.81	0.52	0.84	0.90
14	2.81	0.52	0.88	0.88
15	2.81	0.50	0.84	0.88
เฉลี่ย	2.82	0.51	0.90	0.89
SD	0.07	0.01	0.04	0.01

ภาคผนวก ฉ

ค่าความถูกต้อง ได้จาก การคำนวณหาค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Sheldon and Wiebe, 1997)

จากระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ (Miller and Miller, 1993)

$$u = \bar{x} \pm t\frac{s}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ u : ช่วงของค่าจริง (range of true value)

$\bar{x}$: ค่าเฉลี่ย (mean)

t : ค่าระดับความอิสระ (degree of fredom พิจารณาจากค่า n-1)

s : ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

n : จำนวนซ้ำของการวิเคราะห์ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 3 ซ้ำ ดังนั้น n = 3

ตาราง ฉ-1 ค่าความถูกต้องจากการวิเคราะห์สารอาหารแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน 3 ซ้ำ

ความเข้มข้น	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD	ค่าความถูกต้อง
แอมโมเนีย (µmol/L)	192.25	195.96	187.79	191.00	4.65	191.00 ± 13.32
ไนไตรต์ (µmol/L)	84.12	85.54	86.56	85.41	1.23	85.41 ± 3.52
ไนเตรต (µmol/L)	93.56	92.02	92.54	92.71	0.75	92.86 ± 2.25
ฟอสเฟต (µmol/L)	30.00	28.95	29.48	29.40	0.52	29.48 ± 1.50

ภาคผนวก ช

ตารางที่ ช-1 ค่าการตอบสนอง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ %RSD ของการวิเคราะห์แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 710, 14.29, 142.96 และ 322.89 µmol/L ชนิดละ 10 ซ้ำ

ครั้งที่	ค่าการตอบสนอง (mV)			
	แอมโมเนีย	ไนไตรต์	ไนเตรต	ฟอสเฟต
1	7.50	0.80	8.36	35.50
2	7.40	0.82	8.40	35.26
3	7.50	0.82	8.24	35.34
4	7.30	0.80	8.26	34.94
5	7.50	0.80	8.12	35.26
6	7.50	0.80	8.36	35.42
7	7.50	0.78	8.28	35.42
8	7.50	0.82	8.28	35.58
9	7.50	0.80	8.40	35.58
10	7.40	0.86	8.06	35.50
เฉลี่ย	7.46	0.81	8.28	35.38
SD	0.07	0.02	0.11	0.19
% RSD	0.94	2.67	1.38	0.55

ภาคผนวก ซ

ซ-1 แอมโมเนีย

จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 3-7 นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบ การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2533) ของผลการวิเคราะห์แอมโมเนียในน้ำระหว่างตะกอนที่ได้จากความลึกระดับต่าง ๆ ของตะกอน ดังแสดงในตารางที่ ซ-1 โดยนำตัวอย่างตะกอนในแต่ละระดับความลึกมาเตรียมน้ำระหว่างตะกอนภายในและภายนอกบรรยากาศไนโตรเจน จึงมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองมี 2 ปัจจัย คือ

1) ปัจจัย A คือ ความลึก มี 7 ระดับ (a_1, a_2, ... ,a_7)
2) ปัจจัย B คือ สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน มี 2 ระดับ (b_1 และ b_2)

ตารางที่ ซ-1 ค่าการตอบสนองของปริมาณแอมโมเนีย (mV) ในน้ำระหว่างตะกอน จากตัวอย่างที่เตรียมในและนอกกระโจมไนโตรเจน

ปัจจัย 1 ความลึก	ปัจจัย 2		รวม
	ใน	นอก	
	26.80	9.40	
1	12.40	8.80	
รวม	39.20	18.20	57.40
	9.20	12.60	
2	10.00	7.72	
รวม	19.20	20.32	39.52
	15.40	14.00	
6	25.60	16.60	
รวม	41.00	30.60	71.60
	16.00	15.80	
10	30.20	8.20	
รวม	46.20	24.00	70.20

ตารางที่ ซ-1 (ต่อ)

ปัจจัย 1 ความลึก	ปัจจัย 2		รวม
	ใน	นอก	
	35.20	34.00	
14	19.80	6.60	
รวม	55.00	40.60	95.60
	58.00	61.60	
18	23.28	23.40	
รวม	81.28	85.00	166.28
	56.00	54.40	
22	23.60	4.80	
รวม	79.60	58.20	138.80
รวม	361.48	277.92	639.40

ซ.1.1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยการคำนวณผลรวมกำลังสอง (sum of squares) แยกตามแหล่งแปรผันต่าง ๆ ดังนี้

ซ.1.1.1. ผลรวมกำลังสองทั้งหมด (the total sum of squares) : SST

$$SST = \sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{n} Y_{ijk}^2 - \frac{(G.T.)^2}{nab}$$

เมื่อ Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตจากตัวอย่างที่ k ในระดับที่ i ของปัจจัย A และระดับที่ j ของปัจจัย B

a คือ จำนวนระดับของปัจจัย A เท่ากับ 7

b คือ จำนวนระดับของปัจจัย B เท่ากับ 2

n คือ ค่าสังเกตในแต่ละ treatment combination เท่ากับ 2

G.T คือ ผลรวมของทุกค่าสังเกต

ดังนั้น

$$SST = (26.80)^2 + (9.40)^2 + ... + (4.80)^2 - \frac{(639.40)^2}{2 \times 7 \times 2} = 7442.72$$

ช.1.1.2. ผลรวมกำลังสองของทรีทเมนต์ : $S_{treatmentts}$ คือ ผลรวมกำลังสองของ treatment combination มี ทั้งหมด 14 กลุ่ม

$$SS_{treatments} = \frac{\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} T_{ij.}^2}{n} - \frac{(G.T.)^2}{nab}$$

เมื่อ $T_{ij.}$ คือ ผลรวมของค่าสังเกตใน treatment combination อันเกิดจากการรวมตัวของระดับที่ i

ของปัจจัย A และระดับที่ j ของปัจจัย B

ดังนั้น

$$SS_{treatments} = \frac{(39.20)^2 + (18.20)^2 + ... + (58.20)^2}{2} - \frac{(639.40)^2}{2 \times 7 \times 2} = 3560.25$$

ช.1.1.3. คำนวณผลรวมกำลังสองปัจจัยA ปัจจัย B และระหว่าง A และ B

1) ผลรวมกำลังสองของปัจจัย A : SSA

$$SSA = \frac{\sum_{i=1}^{a} T_{i..}^2}{nb} - \frac{(G.T.)^2}{nab}$$

เมื่อ $T_{i..}$ คือ ผลรวมของค่าสังเกตในทุกระดับของปัจจัย B ในระดับที่ i ของปัจจัย A

ดังนั้น

$$SSA = \frac{(57.40)_2 + (39.52)^2 + ... + (138.80)^2}{2 \times 2} - \frac{(639.40)^2}{2 \times 7 \times 2} = 3140.10$$

2) ผลรวมกำลังสองของปัจจัย B

$$SSB = \frac{\sum_{j=1}^{b} T_{.j.}^2}{na} - \frac{(G.T.)^2}{nab}$$

เมื่อ $T_{.j.}$ คือ ผลรวมของค่าสังเกตในทุกระดับของปัจจัย A ในระดับที่ j ของปัจจัย B

ดังนั้น

$$SSB = \frac{(361.48)^2 + (277.92)^2}{2 \times 7} - \frac{(639.40)^2}{2 \times 7 \times 2} = 249.36$$

3) ผลรวมกำลังสองของปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย A และ ปัจจัย B : SSAB

$$SSAB = SS_{treatments} - SSA - SSB$$

$$= 3560.25 - 3140.10 - 249.36$$

$$= 170.79$$

ซ.1.1.4. ผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อน : SSE

$$SSE = SST - SS_{treatments}$$

$$= 7442.72 - 3560.25$$

$$= 3882.47$$

ซ.1.2. สร้างตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

ตารางที่ ซ-2 ตารางความแปรปรวนของผลรวมกำลังสองของแต่ละปัจจัย

Source of Variation	Df	Sum of squares (SS)	Mean of squares (MS)	F-ratio
Treatment	ab-1			
A	a-1	SSA	MSA = SSA/(a-1)	MSA/MSE
B	b-1	SSB	MSB = SSB/(b-1)	MSB/MSE
AB	(a-1)(b-1)	SSAB	MSAB = SSAB/(a-1)(b-1)	MSAB/MSE
Error	ab(n-1)	SSE	MSE = SSE/ab(n-1)	
Total	Abn-1	SST		

ตารางที่ ซ-3 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์แอมโมเนียที่ระดับความลึก 7 ระดับและเตรียมตัวอย่างภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

Source of Variation	Df	Sum of squares (SS)	Mean of squares (MS)	F-ratio	$F_{(0.05)}$ตาราง
Treatment	13				
A	6	3140.10	523.35	1.89	2.85
B	1	249.36	249.36	0.90	4.60
AB	6	170.79	28.46	0.10	2.85
Error	14	3882.47	277.32		
Total	27	7442.72			

จากค่า F ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่าจากตารางทั้งของสองปัจจัย ดังนั้นค่าการตอบสนองของแอมโมเนียไม่มีความแตกต่างทั้งระดับความลึกและการเตรียมตัวอย่างภายในและนอกกระโจมไนโตรเจน

ซ-2 ฟอสเฟต

จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 3-8 นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการวิเคราะห์ฟอสเฟตในน้ำระหว่างตะกอนที่ได้จากความลึกระดับต่าง ๆ ของตะกอน ดังแสดงในตาราง ซ-4 โดยนำตัวอย่างตะกอนในแต่ละระดับความลึกมาเตรียมน้ำระหว่างตะกอนภายในและภายนอกบรรยากาศไนโตรเจน จึงมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองมี 2 ปัจจัย คือ

1) ปัจจัย A คือ ความลึก มี 7 ระดับ (a_1, a_2, ... ,a_7)
2) ปัจจัย B คือ สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน มี 2 ระดับ (b_1 และ b_2)

ตารางที่ ซ-4 ค่าการตอบสนองของปริมาณฟอสเฟต (mV) ในน้ำระหว่างตะกอน จากตัวอย่างที่เตรียมในและนอกกระโจมไนโตรเจน

ปัจจัย 1 ความลึก	ปัจจัย 2		รวม
	ใน	นอก	
	9.38	3.13	
1	5.55	6.10	
รวม	14.93	9.23	24.16
	8.91	4.86	
2	12.91	7.73	
รวม	21.82	12.59	34.41
6	9.04	5.47	
รวม	10.55	4.92	
	19.59	10.39	29.98
	12.50	14.96	
10	14.82	9.57	
รวม	27.32	24.53	51.85
	17.06	9.22	
14	40.77	19.86	
รวม	57.83	29.08	86.91

ตารางที่ ซ-4 (ต่อ)

ปัจจัย 1 ความลึก	ปัจจัย 2		รวม
	ใน	นอก	
	28.76	7.13	
18	18.00	8.85	
รวม	46.76	15.98	62.74
	44.62	5.54	
22	13.54	7.75	
รวม	58.16	13.29	71.45
รวม	246.41	115.09	361.50

จากนั้นนำข้อมูลในตาราง ซ-3 มาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่าง 2 ปัจจัย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยการคำนวณผลรวมกำลังสอง แยกตามแหล่งแปรผัน ดังวิธีการวิเคราะห์แอมโมเนีย ค่าที่ได้ดังแสดงในตาราง ซ-4

ตารางที่ ซ-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการวิเคราะห์ฟอสเฟตที่ระดับความลึก 7 ระดับ และเตรียมตัวอย่างภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน

Source of Variation	Df	Sum of squares (SS)	Mean of squares (MS)	F-ratio	$F_{(0.05)}$ ตาราง
Treatment	13				
A	6	820.21	136.70	2.07	2.85
B	1	615.89	615.89	9.32	4.60
AB	6	383.46	63.91	0.97	2.85
Error	14	924.85	66.06		
Total	27	2744.41			

จากค่า F ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่าจากตารางทั้งของสองปัจจัย ดังนั้นค่าการตอบสนองของแอมโมเนียไม่มีความแตกต่างทั้งระดับความลึก แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเตรียมตัวอย่างภายในและนอกกระโจมไนโตรเจน