พิพิธภัณฑ์สถานแห่งชาติ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

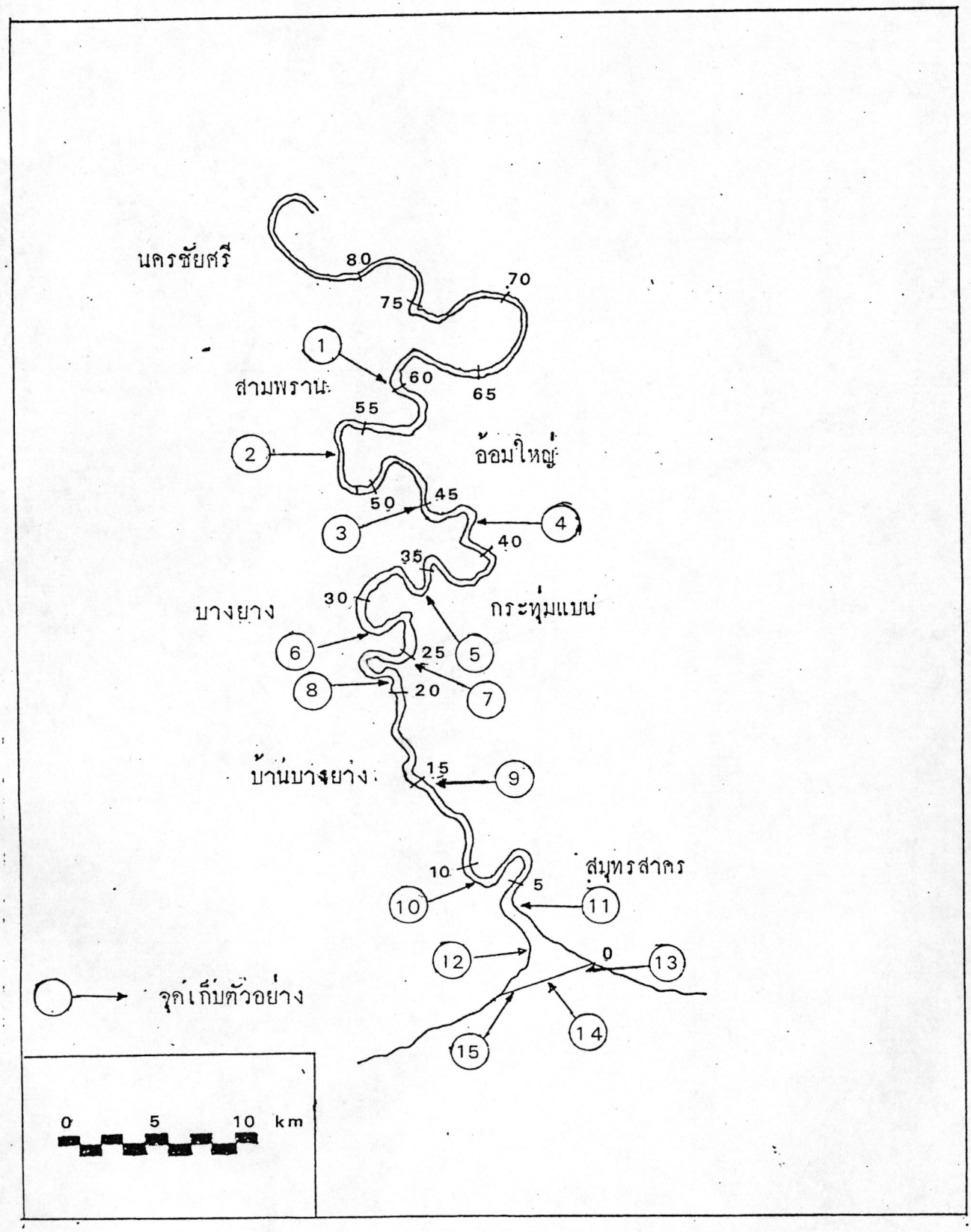
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาชนิดและปริมาณไนโตรเจนไฮโดรคาร์บอนในแม่น้ำท่าจีนตอนล่างนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี ตัวอย่างดินตะกอนและหอยแมลงภู่วิเคราะห์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปีและแกสโครมาโตกราฟี โดยทำการเก็บตัวอย่างใน 2 ช่วงฤดู คือ ฤดูน้ำน้อย (มีนาคม 2532) และฤดูน้ำหลาก (สิงหาคม 2532) ซึ่งมีรายละเอียดเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา ดังต่อไปนี้

<u>การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง</u>

การเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนในแม่น้ำท่าจีนตอนล่าง จะเริ่มเก็บตั้งแต่บริเวณสะพานโพธิ์แก้ว อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม (กม.60) ลงไปจนถึงปากแม่น้ำ (กม.0) อำเภอเมืองจังหวัดสมุทรสาคร โดยกำหนดสถานีเก็บตัวอย่างตามโครงการศึกษาวิจัยคุณภาพน้ำของสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ รวมทั้งสิ้น 15 สถานี ดังนี้ (แผนที่ประกอบแสดงดังรูปที่ 3.1)

สถานี	สถานที่	ระยะทางจากปากแม่น้ำ (กม.)
1	สะพานโพธิ์แก้ว	60
2	วัดบางช้างเหนือ	53
3	วัดเทียนดัด	45
4	วัดอ้อมใหญ่	42
5	โรงเรียนบ้านปล่องเหลี่ยม	34
6	ปากคลองดำเนินสะดวก	28
7	ท่าเรืออ่างทอง	25



รูปที่ 3.1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนในแม่น้ำท่าจีนตอนล่าง

สถานี (ต่อ)	สถานที่	ระยะทางจากปากแม่น้ำ (กม.)
8	หน้าไร่องุ่น	21
9	วัดบางปลา	15
10	สะพานท่าจีน	9
11	หน้าตลาดท่าฉลอม	4
12	วัดช่องลม	1.5
13	ปากแม่น้ำ-ฝั่งซ้าย	0
14	ปากแม่น้ำ-กลางร่องน้ำ	0
15	ปากแม่น้ำ-ฝั่งขวา	0

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

การกำหนดระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอน จะแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ

ช่วงที่ 1 (ฤดูน้ำน้อย) ในเดือนมีนาคม 2532

ช่วงที่ 2 (ฤดูน้ำหลาก) ในเดือนสิงหาคม 2532

ตัวอย่างหอยแมลงภู่เก็บครั้งเดียวในเดือนสิงหาคม 2532

การเก็บตัวอย่าง

ก. ตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างบริเวณกลางแม่น้ำที่ระดับความลึก 1 เมตรจากผิวน้ำ โดยใช้ขวดแก้วขนาดจุ 500 มิลลิลิตร ด้วยวิธี drop-bottle technique ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ IOC/UNESCO (1984) เทตัวอย่างน้ำทิ้งประมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วเติมนอร์มัลเฮกเซน 30 มิลลิลิตรทันที ปิดฝาและเขย่าอย่างแรง 5 นาที เก็บไว้ในที่มืดเพื่อรอการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างน้ำในเดือนมีนาคม เก็บสถานีละ 2 ตัวอย่าง ส่วนเดือนสิงหาคมเก็บสถานีละ 3 ตัวอย่าง

ข. ตัวอย่างดินตะกอน

เก็บตัวอย่างดินตะกอนตามสถานีเดียวกับที่กำหนดเก็บตัวอย่างน้ำ โดยใช้ที่ตักดินแบบ petersen grab ตักดินตะกอนขึ้นมา 3 ครั้ง แล้วช้อนเอาเฉพาะผิวหน้าของดินตะกอน (0-5 เซนติเมตร) มาผสมกัน แล้วบรรจุใส่ขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาและแช่แข็งไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ค. ตัวอย่างหอยแมลงภู่

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่โดยซื้อจากบริเวณท่าเรือ หมู่บ้านชาวประมง ตลาดท่าฉลอม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร

<u>การเตรียมและการวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

สารอินทรีย์ทุกชนิดที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด จะผ่านการกลั่นก่อนนำไปใช้ (re-distill) ส่วนการเตรียมเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดและน้ำ ล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น แล้วชะด้วยอะซีโตน อบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำอุปกรณ์ไปใช้ชะด้วยเฮกเซนก่อนใช้ทุกครั้ง

ก. <u>การวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี</u>

1. การสกัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ

1) ถ่ายตัวอย่างน้ำลงในกรวยแยกขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 20 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกเอาชั้นเฮกเซนใส่ในขวดแก้วที่เตรียมไว้

2) ทำการสกัดตัวอย่างน้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมเฮกเซนครั้งละ 50 มิลลิลิตร สกัดเหมือนครั้งแรก แล้วแยกชั้นเฮกเซนออกมารวมกัน

3) ใส่โซเดียมซัลเฟตแห้ง (Na_2SO_4,anh.) ที่ทำความสะอาดแล้วปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายที่สกัดได้ เพื่อกำจัดน้ำที่อาจปนอยู่

4) นำสารละลายที่สกัดได้ไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องมือระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) และระเหยโดยผ่านแกสไนโตรเจน (nitrogen flow) จนได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี

เครื่องมือที่ใช้คือ Fluorescence Spectrometer Perkin-Elmer 3000

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานไครซีน โดยชั่งสารประกอบไครซีน 0.010 กรัม ละลายด้วยเฮกเซนในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นเป็น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

2) นำสารมาตรฐานตั้งต้นจากข้อ (1) มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3) วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ที่ความยาวคลื่นเอกไซเตชัน 310 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอิมิชชัน 360 นาโนเมตร แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนต์ของตัวอย่างน้ำที่สภาวะเดียวกัน

4) สแกนความยาวคลื่นเอกไซเตชันและอิมิชชันไปพร้อมๆ กัน โดยเริ่มตั้งแต่ความยาวคลื่นเอกไซเตชัน 230-400 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอิมิชชัน ตั้งแต่ 253-423 นาโนเมตร ด้วยอัตราการสแกน 60 นาโนเมตร/นาที

3. การคำนวณความเข้มข้นของปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์ในตัวอย่างน้ำที่วัดได้ นำไปคำนวณหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนดังนี้

ตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 0.5 ลิตร นำมาสกัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนให้อยู่ในนอร์มัลเฮกเซน 5 มิลลิลิตร

ให้ X เป็นความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างค่าความเข้มฟลูออเรสเซนต์กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานไครซีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

จะได้ว่า ในนอร์มัลเฮกเซน 1 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮโดรคาร์บอน X ไมโครกรัม

ในนอร์มัลเฮกเซน 5 มิลลิลิตร มีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 5X ไมโครกรัม

หรือ ในตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 0.5 ลิตร มีปริมาณไฮโดรคาร์บอน 5X ไมโครกรัม

ดังนั้น ตัวอย่างน้ำ 1 ลิตร จะมีปริมาณไฮโดรคาร์บอน $\frac{5X}{0.5}$ ไมโครกรัม

ข. <u>การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินตะกอน</u>

1. การสกัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่างดินตะกอน

1) นำตัวอย่างดินตะกอนไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze-dry แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 80 เมส

2) นำไปสกัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธี soxhlet extraction โดยชั่งตัวอย่างดินตะกอน 100 กรัม ใส่ในทิมเบิล เติมสารมาตรฐาน 2 ตัว คือ 2-เมทิลออกตะเดคเคน และ 1,1-ไบแนพทิล ชนิดละ 50 ไมโครกรัม เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด และใช้ไดคลอโรมีเธน 300 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำสารละลายที่สกัดได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องมือระเหยสารแบบลดความดัน และผ่านแกสไนโตรเจน จนสารละลายเกือบแห้ง เปลี่ยนตัวทำละลายให้เป็นเฮกเซน แล้วนำไปลดปริมาตรสารละลายให้เหลือ 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อทำการแยกแฟรคชันในขั้นต่อไป

2. การแยกสารละลายมาตรฐานผสมของไฮโดรคาร์บอน ออกเป็นอะลิฟาติกและอะโรมาติก โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของนอร์มัลอัลเคน C_{15} - C_{36} และสารอะโรมาติก 7 ชนิด คือ แนพธาลีน ไบเฟนิล ฟีแนนทรีน ไพรีน ไครซีน เพอริลีน และเบนโซ(จีเอ็ชไอ)เพอริลีน

2) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างนอร์มัลอัลเคน และอะโรมาติกจากข้อ (1) โดยให้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดประมาณ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรสุดท้าย 0.5 มิลลิลิตร

3) บรรจุซิลิกาเจลที่อิ่มตัวในเฮกเซน (วิธีเตรียมซิลิกาเจล คือทำการแอกติเวต โดยอบที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการดีแอกติเวตด้วยน้ำกลั่น 5 %) ลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร ที่ปลายคอลัมน์อุดด้วยใยแก้วเล็กน้อยจนได้ชั้นของซิลิกาเจลสูง 17.5 เซนติเมตร เคาะข้างคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ผงซิลิกาเจลเรียงตัวแน่นขึ้น ระวังอย่าให้ระดับของเฮกเซนลดลงมาจนถึงชั้นของซิลิกาเจล วัดอัตราการไหลของเฮกเซนที่ปลายคอลัมน์ ปรับให้อัตราการไหลเป็น 2 มิลลิลิตร/นาที แล้วผ่านเฮกเซนเพื่อชะคอลัมน์ 50 มิลลิลิตร

4) รอให้ระดับของเฮกเซนลดลงจนเกือบถึงชั้นของซิลิกาเจล แล้วจึงค่อยๆ

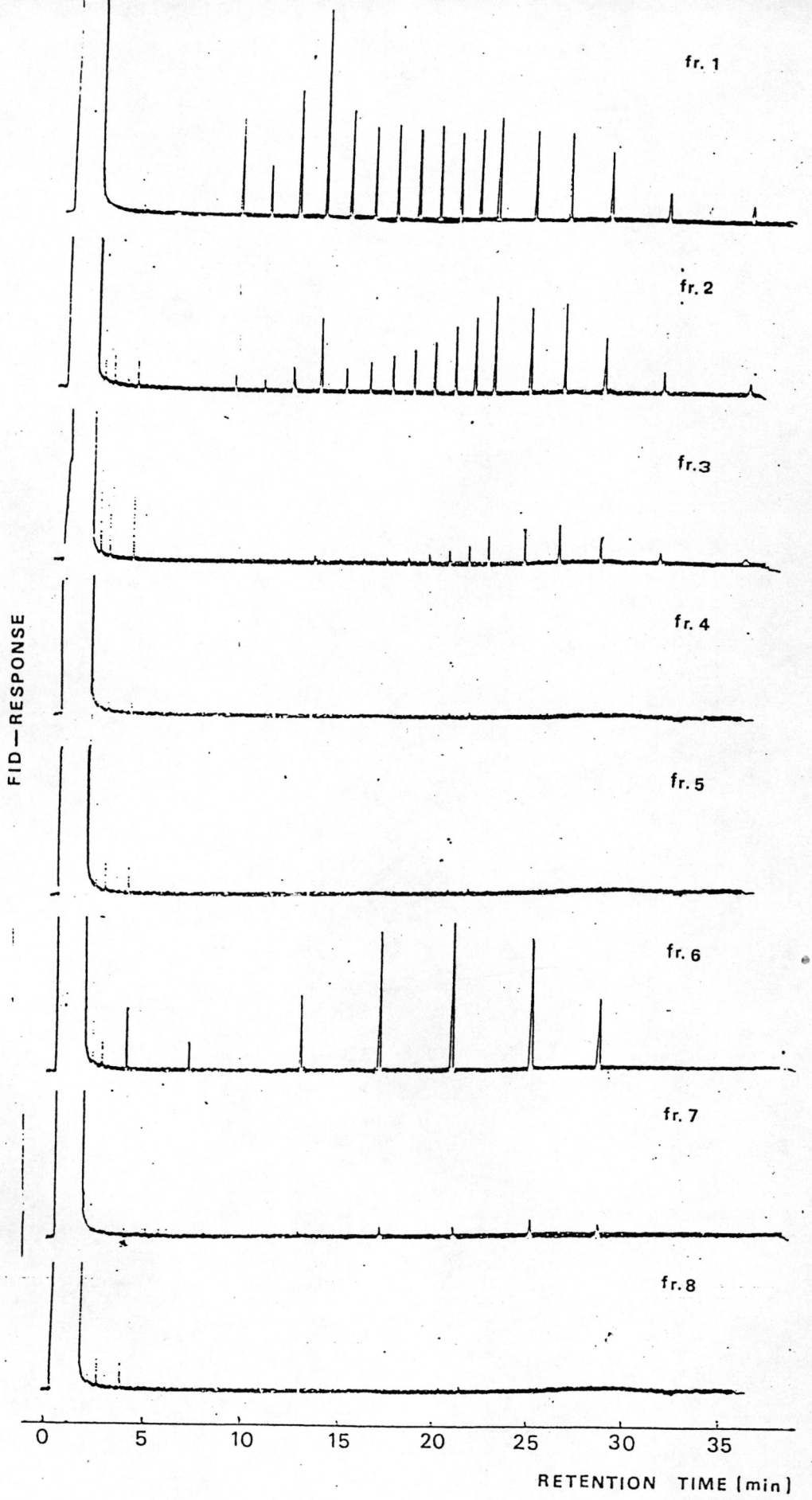
ใส่สารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้จากข้อ (2)ลงในคอลัมน์ ชะด้วยเฮกเซน 40 % ไดคลอโร-มีเธน ในเฮกเซน และไดคลอโรมีเธน เก็บแฟรคชันตามลำดับดังต่อไปนี้

ตัวทำละลายที่ชะคอลัมน์	ปริมาตรที่เก็บ (มิลลิลิตร)	แฟรคชัน
เฮกเซน	5	(ทิ้ง)
	13	1
	1	2
	1	3
40 % ไดคลอโรมีเธน		
ในเฮกเซน	1	4
	1	5
	30	6
	1	7
	1	8
ไดคลอโรมีเธน	1	9
	1	10
	13	11
	1	12

5) นำแต่ละแฟรคชันไปลดปริมาตร และเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นโทลูอีน จนได้ปริมาตรสุดท้าย 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟ

ผลการศึกษาการแยกแฟรคชันของสารมาตรฐานผสม พบว่านอร์มัลอัลเคนจะถูกชะออกมาในแฟรคชัน 1 , 2 และ 3 โดยในแฟรคชัน 3 เหลือปริมาณเพียงเล็กน้อย และในแฟรคชัน 4 และ 5 ไม่พบทั้งนอร์มัลอัลเคนและอะโรมาติก สารอะโรมาติกจะถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วเล็กน้อยของ 40 % ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน ในแฟรคชัน 6 จนเกือบหมด มีเหลือบางส่วนจะถูกชะออกมาในแฟรคชัน 7 และตั้งแต่แฟรคชัน 8 จนถึง 12 ไม่พบสารใดๆ (แกสโครมาโตแกรมแสดงผลการแยกแฟรคชัน แสดงดังรูปที่ 3.2)

6) จากผลการศึกษาการแยกแฟรคชันของอะลิฟาติกและอะโรมาติกไฮโดร



รูปที่ 3.2 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการแยกแฟรคชันของสารมาตรฐานผสมระหว่างนอร์มัลอัลเคน และสารอะโรมาติก

คาร์บอน เมื่อนำมาใช้กับการศึกษาในตัวอย่าง จะทำการเก็บเพียง 2 แฟรคชัน ดังนี้

ชะด้วยเฮกเซน 5 มิลลิลิตรแรก (ทิ้ง)

เก็บ 15 มิลลิลิตร เป็นแฟรคชัน 1

ชะด้วย 40 % ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน

เก็บ 35 มิลลิลิตร เป็นแฟรคชัน 2

3. การแยกองค์ประกอบในตัวอย่างดินตะกอนออกเป็นอะลิฟติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1) บรรจุซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์จนได้ความสูง 17.5 เซนติเมตร ปรับอัตราการไหลให้ได้ 2 มิลลิลิตร/นาที แล้วใส่ผงคอปเปอร์ (ที่เตรียมโดย ล้างด้วยกรดไฮโดรคลอลิกเข้มข้น, น้ำกลั่น, อะซีโตน และเฮกเซนตามลำดับ) ประมาณ 5 กรัม ลงในคอลัมน์ เพื่อกำจัดซัลเฟอร์ที่มีอยู่ในตัวอย่างดินตะกอน แล้วชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตร

2) ผ่านสารละลายตัวอย่างลงในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายดังนี้

เฮกเซน 20 มิลลิลิตร (5 มิลลิลิตรแรกทิ้ง) เป็นแฟรคชัน 1

40 % ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน 35 มิลลิลิตร เป็นแฟรคชัน 2

3) นำทั้งสองแฟรคชัน ไปลดปริมาตรจนเหลือ 0.2 มิลลิลิตร เก็บในหลอดแก้วขนาดเล็กที่มีขีดบอกปริมาตรพร้อมที่นำไปวิเคราะห์หาปริมาณในขั้นต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี

1) ใช้เข็มฉีดยาขนาดเล็ก ดูดสารละลายตัวอย่างจากแฟรคชัน 2 มา 20 ไมโครลิตร ละลายในเฮกเซน 2 มิลลิลิตร (สารละลายของแฟรคชัน 2 ส่วนที่เหลือนำไปลดปริมาตรและเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นโทลูอีน แล้วเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์โดยเทคนิคแกสโครมาโตกราฟี)

2) นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการคายคลื่นแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ความยาวคลื่นเอกไซเตชัน 310 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอิมิชชันที่ 360 นาโนเมตร

3) สแกนความยาวคลื่นเอกไซเตชันและอิมิชชันพร้อมๆ กัน โดยเริ่มที่ความยาวคลื่นเอกไซเตชันตั้งแต่ 230-253 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอิมิชชันตั้งแต่ 400-423 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินตะกอนโดยเทคนิคแกสโครมาโตกราฟี

เครื่องมือที่ใช้ คือ Gas Chromatograph, Varian Model 3700, fused silica capillary column

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณ คือ

1.1) สารละลายมาตรฐานผสมของอัลเคน ประกอบด้วย C_{15}-C_{36}

1.2) สารละลายมาตรฐานผสมของสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ประกอบด้วย

แนพธาลีน	ไครซีน
ไบเฟนิล	เพอริลีน
ฟีแนนทรีน	เบนโซ (จีเอ็ชไอ) เพอริลีน
ไพรีน	

2) สภาวะของเครื่องแกสโครมาโตกราฟ

ตัวตรวจแบบเฟลมไอโอไนเซชัน (FID)

คอลัมน์เคลือบด้วย SE-54 ลิควิดเฟส, ยาว 25 เมตร,

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม.(capillary column)

อุณหภูมิของช่องที่ฉีดสาร	240 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์	280 องศาเซลเซียส

โปรมแกรมของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเริ่มต้น	70 องศาเซลเซียส
อัตราของการเพิ่มอุณหภูมิ	8 องศาเซลเซียส/นาที
อุณหภูมิสุดท้าย	280 องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของกาซไฮโดรเจน (สำหรับ FID)	30 มิลลิลิตร/นาที
อัตราการไหลของอากาศ (สำหรับ FID)	300 มิลลิลิตร/นาที
อัตราการไหลของกาซพา (ไฮโดรเจน)	1-2 มิลลิลิตร/นาที
เมคอัพกาซ	30 มิลลิลิตร/นาที
ปริมาตรของสารละลายที่ฉีด	1-2 ไมโครลิตร
range	x 10^{-11}
Splitter	30 มิลลิลิตร/นาที

6. การวิเคราะห์ชนิดของไฮโดรคาร์บอนโดยเทคนิค GC/MS

7. การวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์(Oxidizeable Organic Carbon) ในตัวอย่างดินตะกอน (Walkey-Black method)

1) การออกซิไดซ์สารอินทรีย์

ชั่งตัวอย่างดินตะกอนแห้ง 0.5 กรัม ซึ่งร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.2 มม.(80 เมส ต่อนิ้ว) ใส่ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมต 1 นอร์มอล ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มีตัวอย่างดินตะกอน แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนเบาๆประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที ควรทำแบลงค์ ควบคู่ไปด้วย

2) การไตเตรทย้อนกลับ

เจือจางสารละลายในข้อ (1) ด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก 85% ปริมาณ 10 มิลลิลิตร โซเดียมฟลูออไรด์ 0.2 กรัม และไดเฟนนิลเอมีนอินดิเคเตอร์ 30 หยด ไตเตรทย้อนกลับโดยใช้สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นไตแตรนท์

3) การคำนวณ

$$\%OM = \frac{10\ (1 - T\ ) \times 1.34}{S}$$

OM คือ สารอินทรีย์ในตัวอย่างดินตะกอน(readily oxidizable)

S คือ ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรท ตัวเปรียบเทียบ (มิลลิลิตร)

T คือ ปริมาตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างดินตะกอน (มิลลิลิตร)

1.34 ได้จาก $(1.0\ N) \times \frac{12}{4000} \times \frac{1.72}{0.77} \times \frac{100}{0.5}$

ค. <u>การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่</u>

1. การเตรียมตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างหอยแมลงภู่มาคัดเลือกขนาด โดยการวัดความกว้างและยาวของเปลือก แยกเป็น 2 ขนาดคือ

ขนาดเล็ก มีความกว้างของเปลือก 3 เซนติเมตร
ความยาวของเปลือก 6-7 เซนติเมตร
ขนาดใหญ่ มีความกว้างของเปลือก 3.5-4.5 เซนติเมตร
ความยาวของเปลือก 7.5-10 เซนติเมตร

ล้างเปลือกหอยด้วยน้ำให้สะอาด แล้วแกะเนื้อเยื่อทำการแยกเพศผู้และเพศเมีย จะได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อหอย 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะมีจำนวนตัวอย่างหอยประมาณ 50-100 ตัว ดังนี้

เพศผู้ตัวเล็ก (MS)
เพศเมียตัวเล็ก (FS)
เพศผู้ตัวใหญ่ (ML)
เพศเมียตัวใหญ่ (FL)

2) นำตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นเนื้อเยื่อแบบความเร็วสูง แล้วนำไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze-dry

2. การสกัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างหอยแมลงภู่

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แห้ง 20 กรัม ใส่ในทิมเบิล เติมสารมาตรฐาน 1,1-ไบแนฟทิล และ 2-เมทิลออกตะเดคเคน ชนิดละ 50 ไมโครกรัม เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

2) ทำการสกัดแบบต่อเนื่องโดยวิธี soxhlet extraction พร้อมกับการกำจัดไขมัน (Saponification) โดยใช้สารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล 1 นอร์มอล และโทลูอีนในอัตราส่วน 7:3 (V/V) ปริมาณ 300 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) สารละลายที่ได้นำไปสกัดสารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และเฮกเซน 50 มิลลิลิตร เขย่าในกรวยแยกเป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกชั้นเฮกเซนไว้ ทำการสกัดซ้ำอีกสองครั้ง โดยเติมเฉพาะเฮกเซน ครั้งละ 50 มิลลิลิตร

4) นำสารละลายในเฮกเซนที่ได้จากข้อ (3) ไปลดปริมาตรให้เหลือ 0.5 มิลลิลิตร เก็บในหลอดแก้วเพื่อรอการแยกแฟรคชัน ในขั้นต่อไป

3. การแยกองค์ประกอบเป็นอะลิฟติกและอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยการผ่านคอลัมน์ของซิลิกาเจล

1) บรรจุซิลิกาเจลที่อิ่มตัวด้วยเฮกเซน ลงในคอลัมน์สูง 17.5 เซนติเมตร และเติมฟลอริซิลแห้งให้ได้ชั้นสูง 5 เซนติเมตร (ฟลอริซิลเตรียมโดยแอกติเวท โดยการอบที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดีแอกติเวทด้วยน้ำกลั่น 0.5 % และตั้งทิ้งไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ก่อนนำไปใช้หนึ่งวัน) เพื่อกำจัดไขมันและสารอื่นๆ ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ ชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 50 มิลลิลิตร

2) ผ่านตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ ชะด้วยเฮกเซน และ 40 % ไดคลอโรมีเธนในเฮกเซน เก็บแฟรคชันเช่นเดียวกับในตัวอย่างดินตะกอน

3) นำแฟรคชันที่ได้ไปลดปริมาตร จนมีปริมาตรเป็น 0.2 มิลลิลิตร

4) ใช้เข็มฉีดยาขนาดเล็ก ดูดสารละลายเฉพาะแฟรคชัน 2 ในข้อ (3) มา 20 ไมโครลิตร ละลายในเฮกเซน 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี

5) นำสารละลายของแฟรคชัน 1 ในข้อ (3) และสารละลายส่วนที่เหลือของแฟรคชัน 2 ในข้อ (4) ไปเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นโทลูอีน ปริมาตรสุดท้ายเป็น 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟ โดยมีสภาวะของเครื่องเหมือนกับการวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินตะกอน

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันในตัวอย่างหอยแมลงภู่

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แห้งประมาณ 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง แล้วใส่ลงในทิมเบิล

2) เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ ลงในขวดสกัด 90 มิลลิลิตร

3) ทำการสกัดโดยวิธี soxhlet extraction เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วระเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ออกจนเกือบแห้ง

4) นำส่วนที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5) ทิ้งให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักของไขมัน

แผนผังโดยสรุปแสดงวิธีวิเคราะห์ปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ ดินตะกอน และหอยแมลงภู่ แสดงดังรูปที่ 3.3 , 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะพิจารณาจากพีค และลักษณะของโครมาโตแกรม โดยใช้ค่าดัชนี Kovats ในการวิเคราะห์ชนิดของสารพวกนอร์มัลอัลเคน และไอโซพรีนอยด์ และใช้ดัชนี ARI (Aromatic Retention Index) ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารอะโรมาติก การคำนวณค่าดัชนีต่างๆ และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก. ดัชนี Kovats

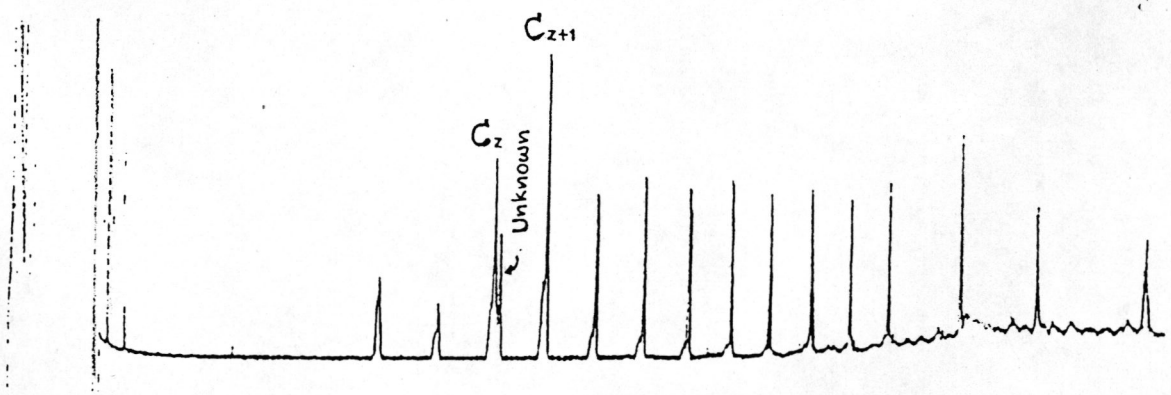
เป็นดัชนีที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จากตัวอย่างกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานพวกนอร์มัลอัลเคน โดยในการหาค่าดัชนี Kovats ของสารใดๆ ใช้สูตรดังนี้ (Lee and Vassilaros,1979)

$$I = 100 \frac{T_{R(substance)} - T_{R(Cz)}}{T_{R(Cz+1)} - T_{R(Cz)}} + 100z$$

เมื่อ $T_{R(substance)}$ คือ Retention time ของสารที่ต้องการหาค่าดัชนี

$T_{R(Cz)}$ และ $T_{R(Cz+1)}$ คือ Retention time ของสารมาตรฐานนอร์มัลอัลเคนที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน C_z และ C_{z+1} ตามลำดับ

z คือ จำนวนอะตอมคาร์บอนของสารมาตรฐานนอร์มัลอัลเคนที่ถูกชะออกมาก่อนสารที่ต้องการหาค่าดัชนี Kovats



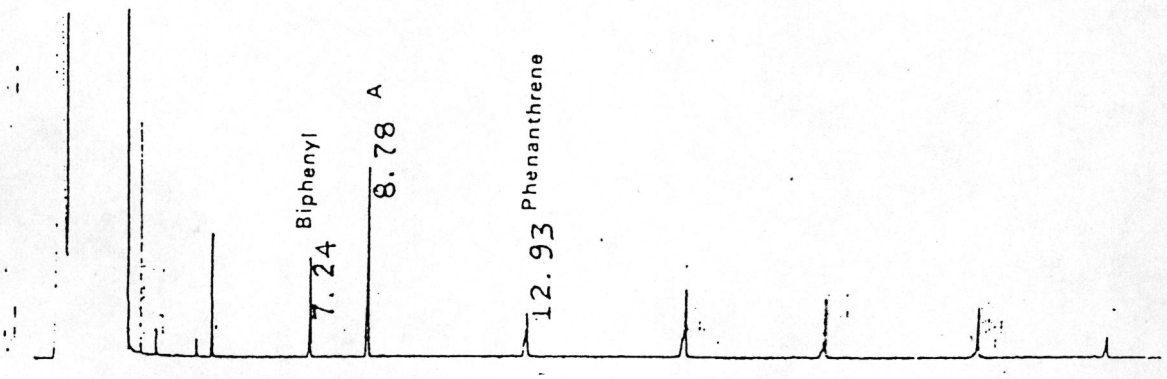
ข . ดัชนี ARI (Aromatic Retention Index)

เป็นดัชนีที่นิยมใช้ในการเปรียบเทียบพีคในโครมาโตแกรมจากสารตัวอย่าง กับพีคในโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานพวกอะโรมาติก โดยเฉพาะกลุ่มของ PAHs (Lee and Vassilaros, 1979) โดยการเปลี่ยนค่ารีเทนชันไทม์จากโครมาโตแกรมให้อยู่ในรูป ARI ซึ่งมีวิธีการดังตัวอย่างต่อไปนี้

1. กำหนดให้สารมาตรฐานอะโรมาติก 7 ตัวหลัก มีค่า ARI ดังนี้

แนพธาลีน	0
ไบเฟนิล	100
ฟีแนนทรีน	200
ไพรีน	300
ไครซีน	400
เพอริลีน	500
เบนโซ(จีเอ็ชไอ)เพอริลีน	600

2. ฉีดสารมาตรฐานตัวที่ต้องการหาค่า ARI ร่วมกับสารมาตรฐานอะโรมาติก 7 ตัวหลัก (co-inject) แล้วนำค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้มาเปรียบเทียบกันดังนี้



สารที่ต้องการหาค่า ARI ในที่นี้คือ A ซึ่งมีค่ารีเทนชันไทม์ 8.78 นาที และอยู่ระหว่างไบเฟนิล (รีเทนชันไทม์เท่ากับ 7.24 นาที) และฟีแนนทรีน (รีเทนชันไทม์เท่ากับ 12.93 นาที) ดังนั้น จะได้ว่ารีเทนชันไทม์ ต่างกัน (12.93-7.24) 5.69 นาที ค่า ARI ต่างกัน 100

ถ้า รีเทนชันไทม์ ต่างกัน (8.78-7.24) 1.54 นาที ค่า ARI ต่างกัน $\frac{1.54 \times 100}{5.69}$

= 27.06

เพราะฉะนั้น สาร A มีค่า ARI เท่ากับ 100 + 27.06 = 127.06

ค. <u>การคำนวณปริมาณสารโดยการเทียบพื้นที่ใต้พีคเทียบกับสารมาตรฐาน</u>

การคำนวณปริมาณสารใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารนั้นๆ กับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่เติมลงไปซึ่งทราบปริมาณที่แน่นอน ดังต่อไปนี้

สมมุติว่าเติมสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่างก่อนทำการสกัดปริมาณ S นาโนกรัม

และปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างเป็น F ไมโครลิตร

ปริมาตรที่ฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ I ไมโครลิตร มีพื้นที่ใต้พีค A

จะได้ว่า ปริมาณสารมาตรฐาน ใน I ไมโครลิตร มีเนื้อสารอยู่ $\frac{I \times S}{F}$ นาโนกรัม

ให้ unknown มีพื้นที่ใต้พีคเป็น B และน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเป็น W

นั่นคือ พื้นที่ A หน่วย หมายถึงเนื้อสาร $\frac{I \times S}{F}$ นาโนกรัม

และ พื้นที่ B หน่วย หมายถึงเนื้อสาร $\frac{I \times S \times B}{F \times A}$ นาโนกรัม

ดังนั้น ปริมาณสารทั้งหมดที่มีอยู่ในปริมาตร F เท่ากับ $\frac{I \times S \times B \times F}{F \times A \times I}$ นาโนกรัม

หรือ เท่ากับ $\frac{S \times B}{A \times W}$ นาโนกรัม/กรัม

ง. <u>การคำนวณเปอร์เซนต์กลับคืน</u> (% recovery)

การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนสามารถหาได้จากสารมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่างก่อนสกัดสาร ในที่นี้ใช้ 2-เมทิลออกตะเดคเคน เป็นตัวแทนในการคำนวณเปอร์เซ็นต์กลับคืนของสารกลุ่มอะลิฟติก และสาร 1,1-ไบแนพทิล เป็นตัวแทนการหาเปอร์เซ็นต์กลับคืนของสารอะโรมาติก ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

ให้ W_{ext} เป็นปริมาณของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (นาโนกรัม)
ในที่นี้คือ 2-เมทิลออกตะเดคเคน และ 1,1-ไบแนพทิล

W_{int} เป็นปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่าง (นาโนกรัม)
ในที่นี้คือ 2-เมทิลออกตะเดคเคน และ 1,1-ไบแนพทิล

A_{ext} เป็นพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน W_{ext}

A_{int} เป็นพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน W_{int}

FV เป็นปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง มีหน่วยเป็นไมโครลิตร

Inj เป็นปริมาตรที่ฉีดเข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ มีหน่วยเป็นไมโครลิตร

การคำนวณ

สาร W_{ext} นาโนกรัม ให้พื้นที่ A_{ext}

ดังนั้น สาร $\frac{W_{int} \times Inj}{FV}$ นาโนกรัม มีพื้นที่ $\frac{W_{int} \times A_{ext} \times In}{FV \times W_{ext}}$

และพื้นที่ $\frac{W_{int} \times A_{ext} \times Inj}{FV \times W_{ext}}$ คือเปอร์เซ็นต์กลับคืน 10

ดังนั้นพื้นที่ A_{int} มีเปอร์เซ็นต์กลับคืนเป็น $\frac{W_{ext} \times FV \times A_{int} \times 100}{W_{int} \times A_{ext} \times Inj}$

$$\text{หรือ \% กลับคืน} = \frac{A_{int} \times W_{ext} \times FV \times 100}{A_{ext} \times W_{int} \times Inj}$$

ซึ่งจากผลการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์กลับคืนในตัวอย่างดินตะกอน จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าดังนี้

แฟรคชัน 1 มีค่าเปอร์เซ็นต์กลับคืน ในช่วง 57.5 - 96.0 % (ค่าเฉลี่ย 82.8 %)

แฟรคชัน 2 มีค่าเปอร์เซ็นต์กลับคืน ในช่วง 41.8 - 86.4 % (ค่าเฉลี่ย 63.7 %)

จ. <u>การทดสอบความแตกต่างของปริมาณบิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนใน 2 ช่วงฤดู โดยใช้ Student's test (t-test)</u>

เพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณบิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในน้ำและดินตะกอนใน 2 ช่วงฤดูที่ทำการศึกษา

สมมุติฐาน H_o : $x_1 = x_2$

H_1 : $x_1 = x_2$

ทดสอบสมมุติฐานโดยใช้สูตร

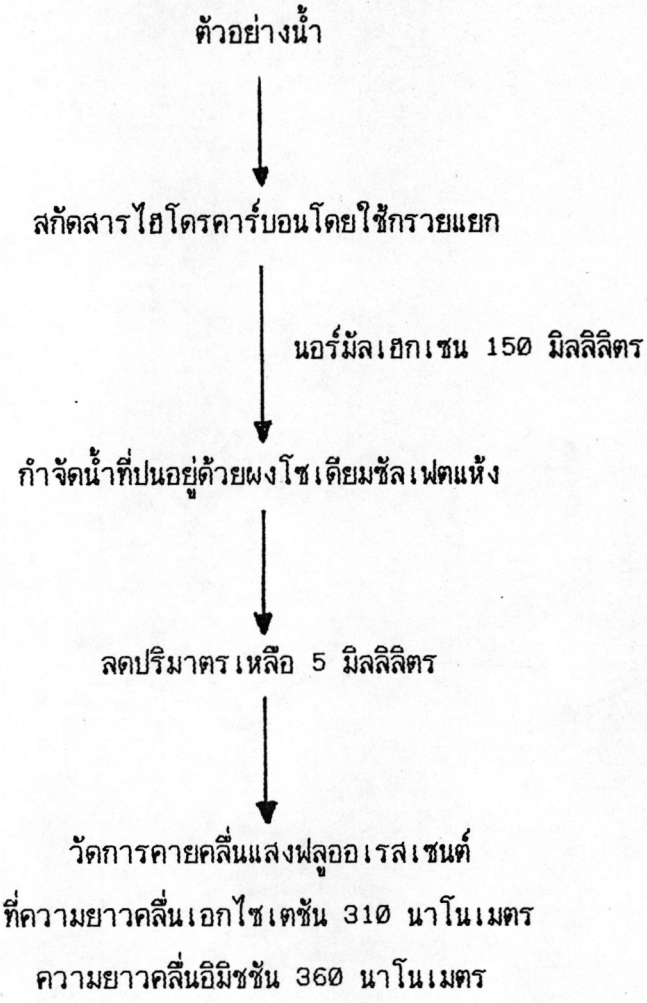
$$t = \frac{\sum (x_1 - x_2)}{\sqrt{\frac{n\sum (x_1-x_2) - \left[\sum(x_1-x_2)\right]^2}{n-1}}}$$

x_1, x_2 คือ ปริมาณสารไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างแต่ละสถานีใน 2 ช่วงฤดู

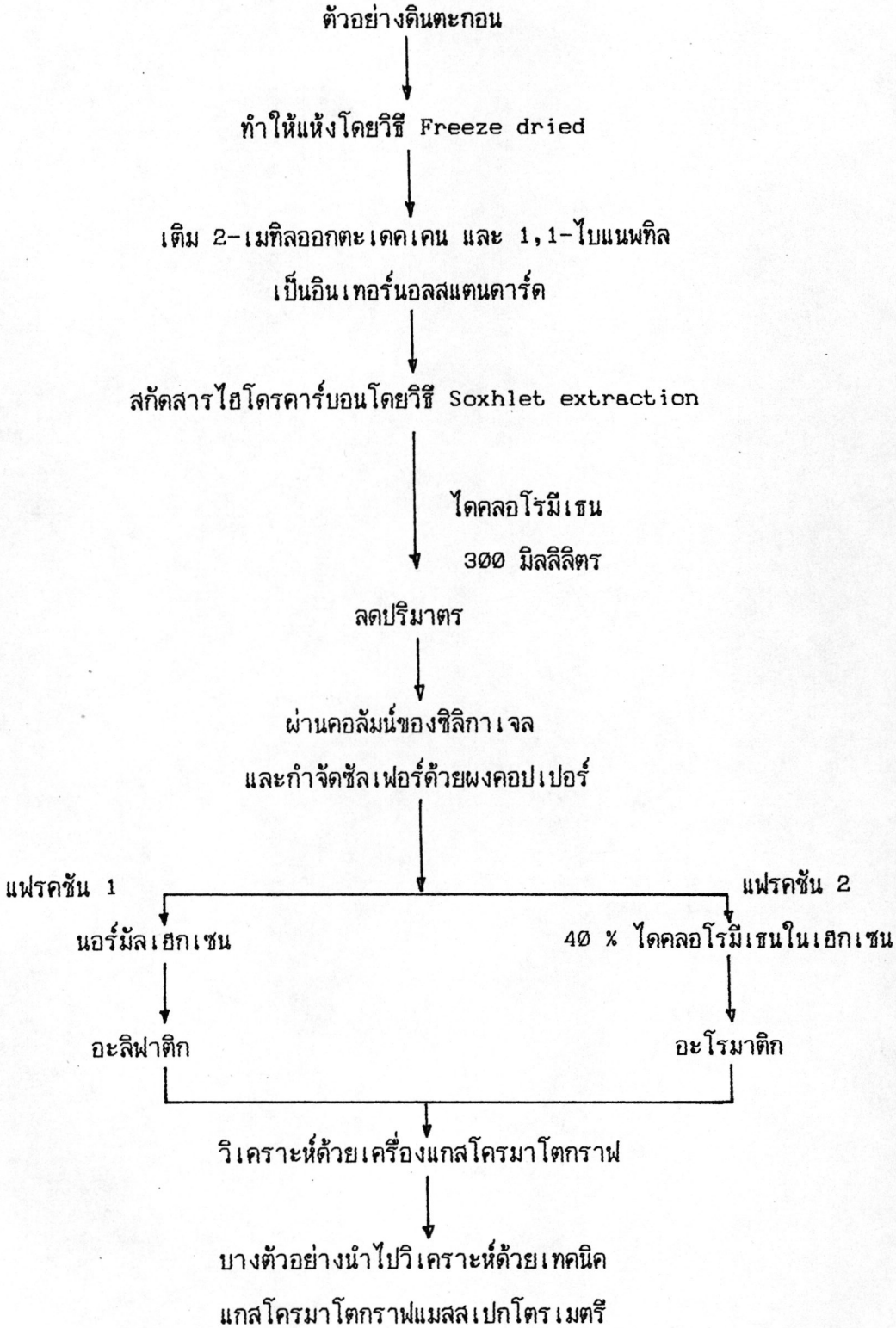
n คือ จำนวนตัวอย่าง

ถ้า t คำนวณน้อยกว่า t ตาราง (ยอมรับ H_o) หมายความว่า ปริมาณสารบิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนใน 2 ช่วงฤดูไม่แตกต่างกัน

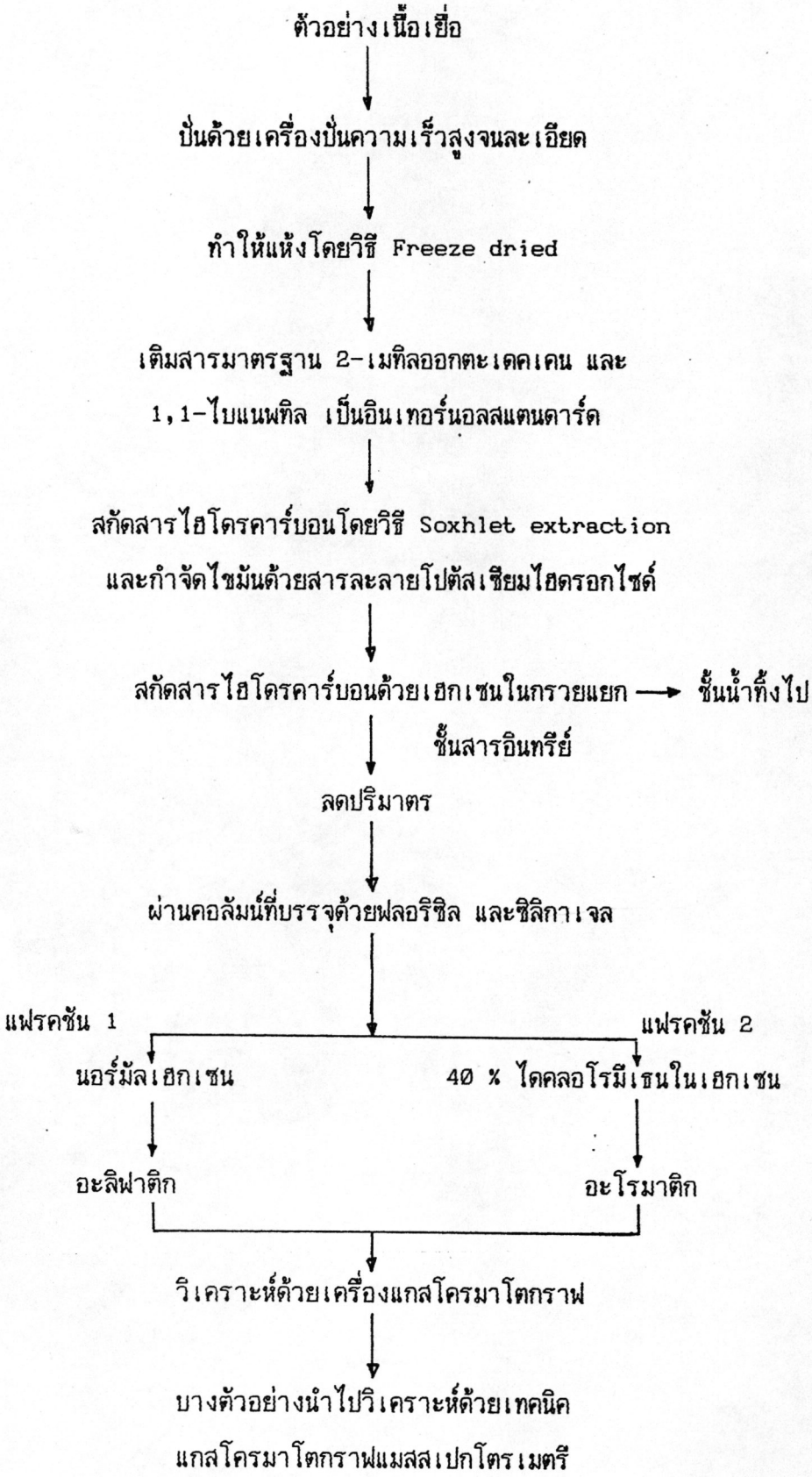
ถ้า t คำนวณมากกว่า t ตาราง (ยอมรับ H_1) หมายความว่าปริมาณสารบิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนใน 2 ช่วงฤดูแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญค่าหนึ่ง



รูปที่ 3.3 แสดงวิธีวิเคราะห์สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำ



รูปที่ 3.4 แสดงวิธีวิเคราะห์สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างดินตะกอน



รูปที่ 3.5 แสดงวิธีวิเคราะห์สารปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างเนื้อเยื่อ