



วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินงาน

การศึกษาปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนที่ละลายในน้ำในงานวิจัยนี้ ซึ่งใช้เทคนิคของ IOC/WMO ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้เทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมตริก (Spectrofluorometric Method) และได้เพิ่มเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตริก (Gas Chromatographic Mass Spectrometric Method) ในการวิเคราะห์หาชนิดขององค์ประกอบ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนโดยการชั่งน้ำหนัก (Gravimetric Method) และวิธีการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงช่วงอินฟราเรดของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน (Partition Infrared Method) เปรียบเทียบกับเทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมตริก

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง
  - ก. ขวดแก้วสีชาสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 3 ลบ.ตม.
  - ข. แผ่นอะลูมิเนียมบาง (Aluminum foil)
  - ค. เครื่องมือสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ (Water Sampler) ชนิด Ditto Type
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
  - 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและเก็บสารตัวอย่าง
    - ก. กรวยแยก (Separatory funnel) ขนาด 2 ลบ.ตม.
    - ข. เครื่องมือระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Evaporator)
    - ค. ตู้อบ (Oven)
    - ง. กรวยแก้ว (Glass funnel)
    - จ. กระดาษกรองแยกเฟส (Phase filter paper) Whatman. no.1 PS.
    - ฉ. ขวดรูปกรวย (Erlenmeyer flask)

- ข. กระบอกตวง (Graduated Cylinder)
- ช. ขวดแก้วสี่ขาขนาด 150 ลบ.ซม.
- ฉ. ขวดแก้วจุกเกลียว (Vial) ขนาด 5 ลบ.ซม.
- ญ. หลอดเซนต์ฟิวส์ (Centrifuge tube)
- ฎ. โถบรรจุสารดูดความชื้น (Desiccator)

## 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับกำจัดสิ่งแปลกปลอมในสารตัวอย่าง

- ก. คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75 ซม. ยาว 20 ซม. สำหรับทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)
- ข. ใยแก้ว (Glass Wool)
- ค. เครื่องมือสกัดสาร (Soxhlet Extraction Apparatus)

## 2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

- ก. เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer)  
Shimadzu Different Spectrofluorophotometer  
Model. RF-520
- ข. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph)  
Shimadzu GC-6A Gas Chromatograph ชนิด FID  
Model. Chromatopac 1A Data System
- ค. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer)  
Hitachi M-80 Combined Mass Spectrometer - Gas  
Chromatograph Model. Hitachi M-003 Data Processing  
System ชนิด EI Source
- ง. เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared Spectrophotometer)  
PERKIN ELMER Model. 683 Recorder : PERKIN ELMER  
56 (Double Beam) Scan Speed 6 min/1 sample
- จ. เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าอย่างละเอียด (Analytical Balance)

## 2.4 สารเคมีที่ใช้

- ก. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ( $\text{CCl}_4$ ) AR Grade
- ข. นอร์มัลเฮกเซน ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ) Spectro. Grade
- ค. โซเดียมซัลเฟตแห้ง (anh.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- ง. ซิลิกาเจล (Silica gel) ขนาด 20-40 mesh.
- จ. สารมาตรฐานโครซิน ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}$ ) สำหรับเทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมตรี
- ฉ. ฟรอน  $\text{C}_2\text{Cl}_3\text{F}_3$
- ช. กรดซัลฟริก (1+1)
- ซ. สารมาตรฐาน iso-octane 37.5% + hexadecane 37.5% + benzene 25% โดยปริมาตร
- ฅ. น้ำมันมาตรฐาน (จากห้องปฏิบัติการเคมีของบริษัทน้ำมันเอสโซ่)  
(ช, ฅ. สารมาตรฐานสำหรับเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตเมตรี)
- ญ. น้ำกลั่น (ได้จากการกลั่นน้ำโดยมีโพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ pH. 2-3)

## 2.5 การเตรียมภาชนะที่จะใช้

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ทำความสะอาดด้วยผงซักฟอกและน้ำยา ทำความสะอาด (cleaning solution) และล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด อบให้แห้ง สำหรับภาชนะที่จะใช้เก็บสารตัวอย่าง หลังจากอบให้แห้งแล้ว จะชะด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ส่วนภาชนะที่ใช้ในการเตรียมสารเพื่อที่จะนำไปวัดด้วยเครื่องมือจะชะด้วยนอร์มัลเฮกเซน

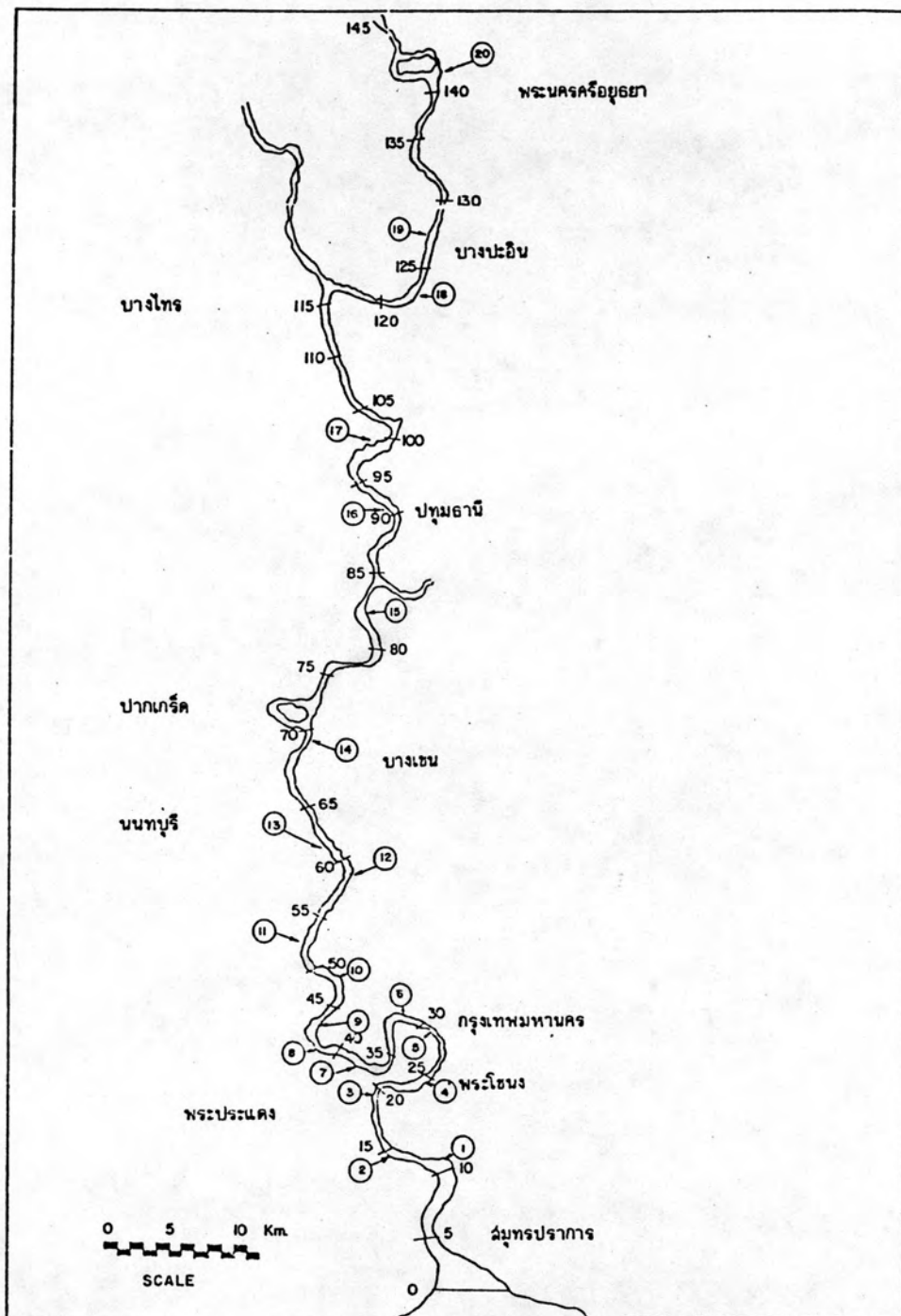
วิธีดำเนินงาน1. การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำท่าจีน และ  
อ่าวไทยตอนบน ได้กำหนดตามสถานีเก็บตัวอย่างน้ำตามโครงการศึกษาวิจัย คุณภาพน้ำของ  
สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ดังนี้

## 1.1 สถานีเก็บตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยา มีทั้งหมด 20 สถานี

เลขที่สถานี	ชื่อสถานี	ระยะทางจากปากแม่น้ำ (กม.)
CHL 1	พระสมุทรเจดีย์	10
CHL 2	โรงสีกรมพระนครใต้	14
CHL 3	พระประแดง	20
CHL 4	วัดโยธินราชนครินทร์	24
CHL 5	ปากคลองพระโขนง	28
CHL 6	ท่าเรือกรุงเทพ	30
CHL 7	โรงน้ำมันรำ	36
CHL 8	สะพานกรุงเทพ	42
CHL 9	โรงงานยาสูบ	44
CHL 10	สะพานพุทธ	48
CHL 11	ปากคลองเทเวศร์	52
CHL 12	สะพานพระราม 6	58
CHL 13	วัดเฉลิมพระเกียรติ	62
CHL 14	วัดเชิงเลน	68.8
CHL 15	สะพานนนทบุรี	82.4
CHL 16	ปทุมธานี	91.6
CHL 17	อำเภอสามโคก	98.6
CHL 18	โรงงานกระดาษ	131.1
CHL 19	อำเภอบางปะอิน	137.2
CHL 20	ป้อมเพชร	142.6

(ดังแสดงในแผนที่ประกอบรูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง

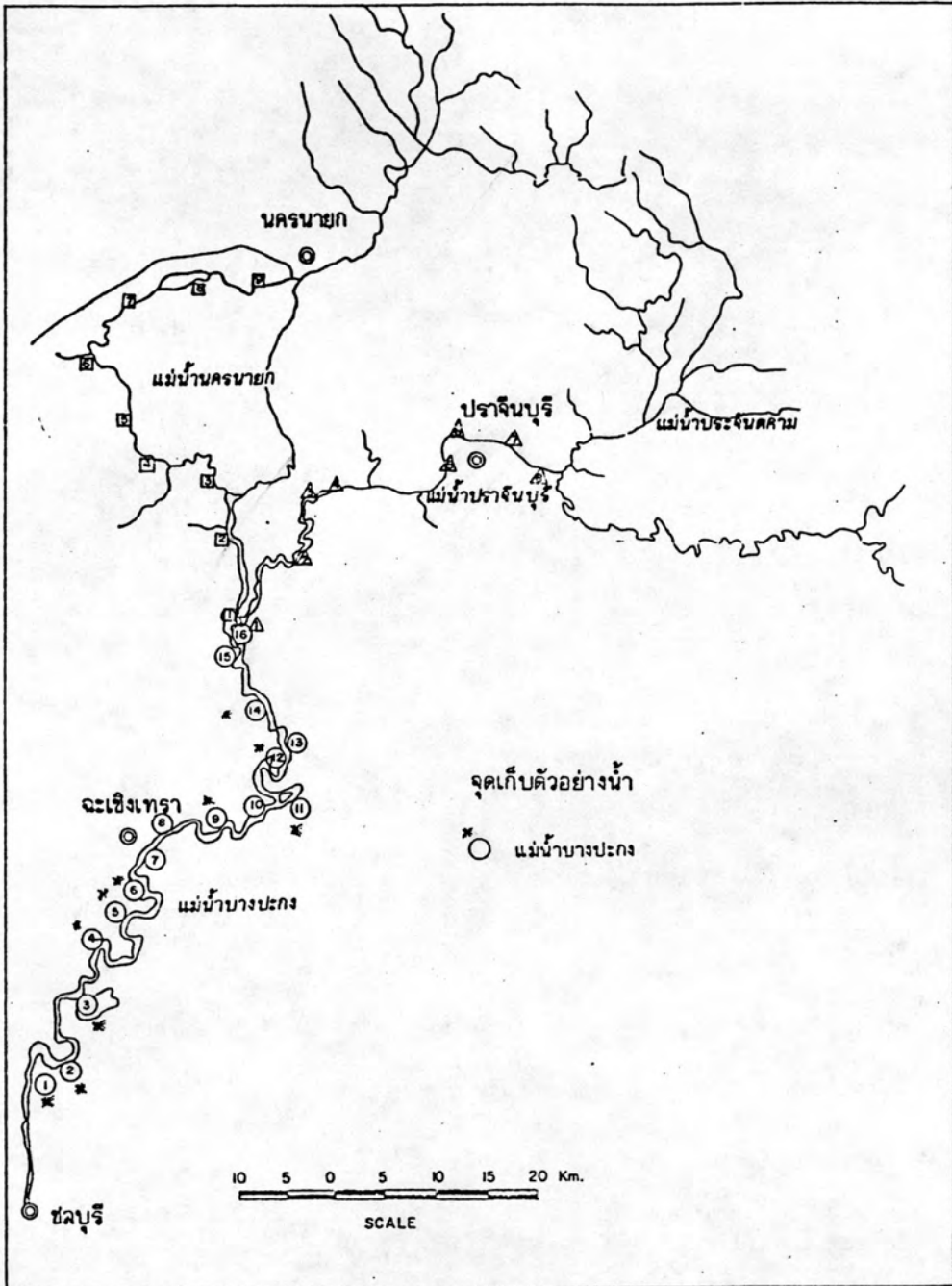


1.2 สถานีเก็บตัวอย่างน้ำ แม่น้ำบางปะกง 12 สถานี

เลขที่สถานี	ชื่อสถานี	ระยะทางจากปากแม่น้ำ (กม.)
BPL 1	ปากแม่น้ำ	2.0
BPL 2	สะพานบางปะกง	8.6
BPL 3	ปากคลอง อ้อมใหญ่	22.1
BPL 4	วัดหัวเนิน	29.6
BPL 5	ประตูน้ำท่า ถั่ว	42.2
BPL 6	วัดท่าอิฐ	49.5
BPL 9	วัดสังฆารัตนาราม	70.0
BPL 11	ท่าเรือบางคล้า	81.5
BPL 12	บ้านท่าสาน	91.5
BPL 14	วัดบางกระเจ็ด	104.5
BPL 15	บางขนาก	117.0
BPL 16	ต้นแม่น้ำบางปะกง	122.0

(ดังแสดงในแผนที่ประกอบรูปที่ 3.2)





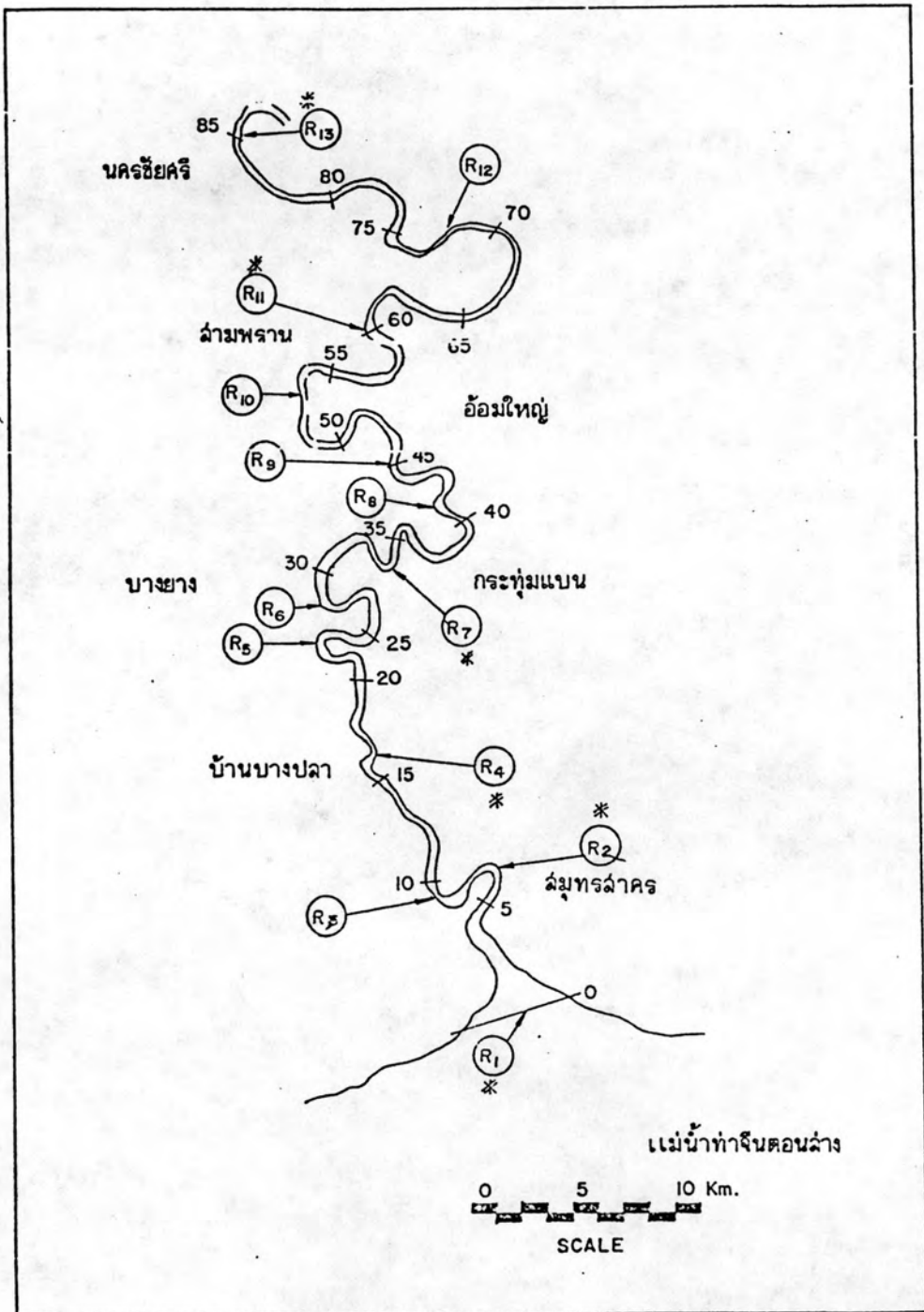
รูปที่ 3.2 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำบางปะกง

## 1.3 สถานีเก็บตัวอย่างแม่น้ำท่าจีน 12 สถานี

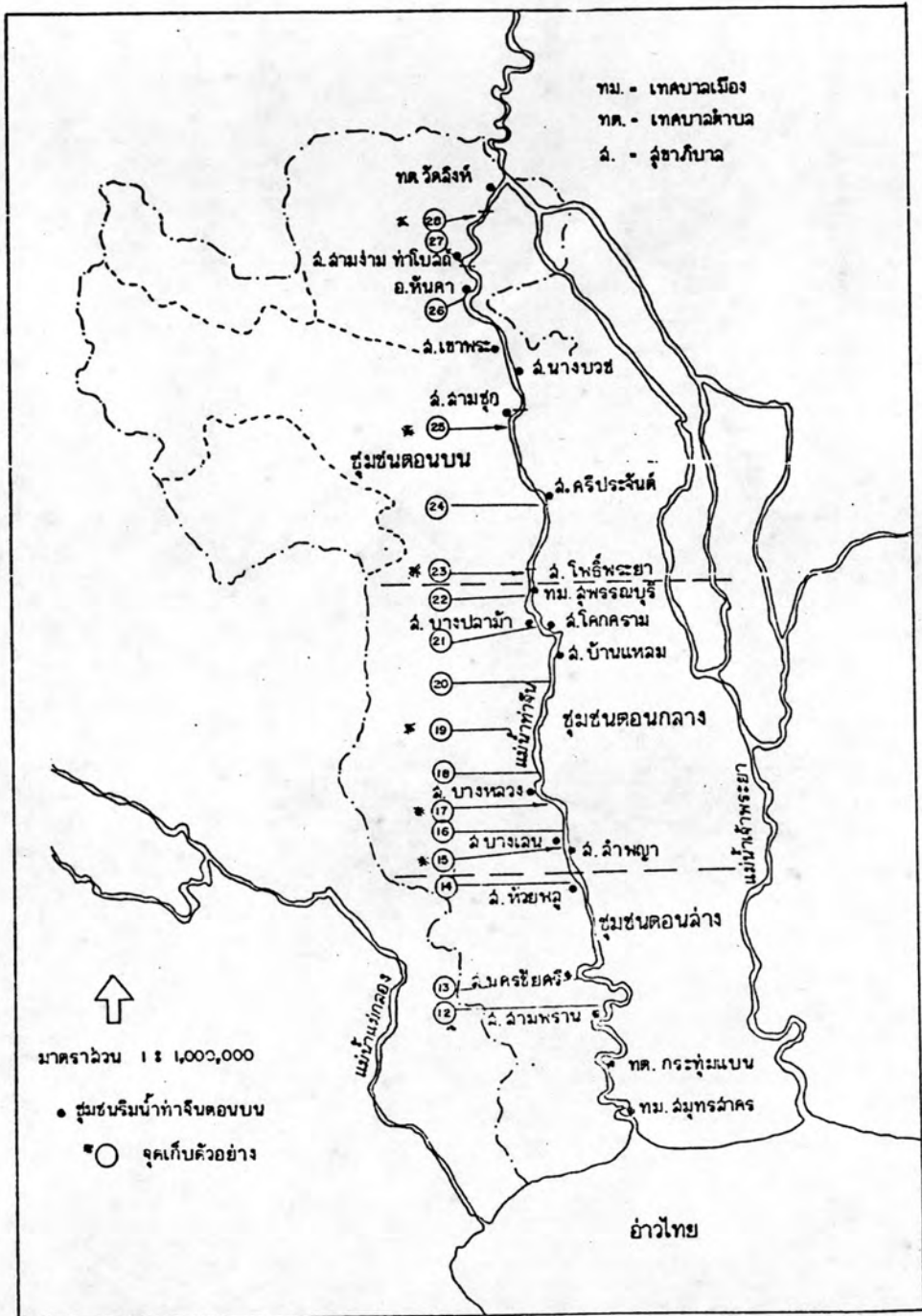
เลขที่สถานี	ชื่อสถานี	ระยะทางจากปากแม่น้ำ (กม.)
TRL 1	ปากแม่น้ำท่าจีน อ. สมุทรสาคร	0
TRL 2	หน้าศาลเจ้า บ้านคลองมหาชัย	4
TRL 4	หน้าวัดศิริมงคล ต. บ้านเกาะ	16
TRL 7	บ้านปล่องเหลี่ยม ต.ท่าไม้ อ.กระทุ่มแบน	34
TRL 11	สะพานโพธิ์แก้ว บ้านท่าข้าม อ.สามพราน	60
TRL 13	หน้าอำเภอนครชัยศรี จ.นครปฐม	82
TRL 15	สะพานบางเลน อ.บางเลน	118
TRL 17	ใต้ปากคลองพระยาบรรลือ อ.ล่องท้าย	140
TRL 19	ปากคลองลำสี บ้านลำสี อ.บางปลาม้า	160
TRL 23	ปตร. โพธิ์พระยา อ.เมืองสุพรรณบุรี	202
TRL 25	สะพานข้ามแม่น้ำ บ้านตลาดลำชุก	237
TRL 28	สะพานมะขามเฒ่า อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท	318

(ดังแสดงในแผนที่ประกอบรูปที่ 3.3 และ 3.4)





รูปที่ 3. 3 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีนตอนล่าง

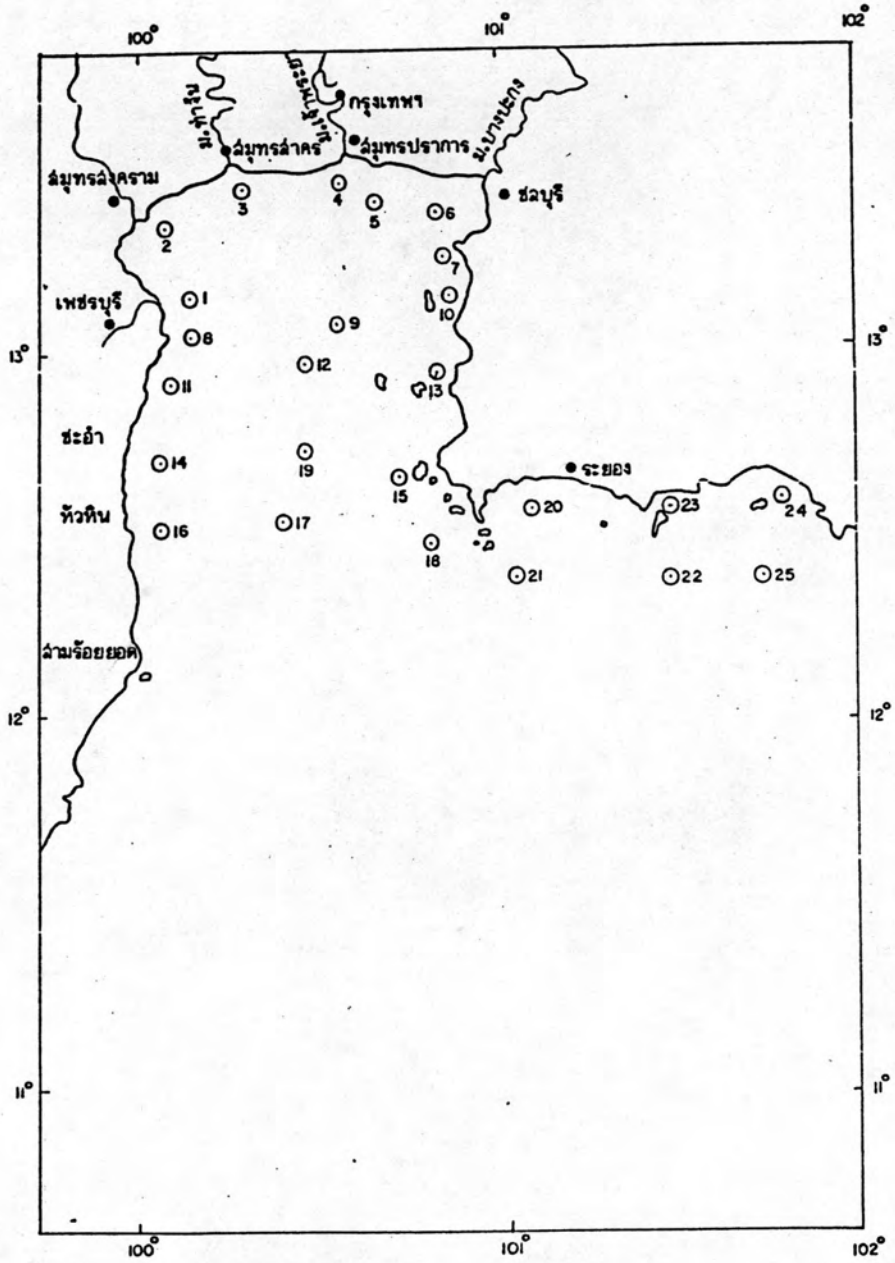


รูปที่ 3.4 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำในแม่น้ำท่าจีนตอนบน

## 1.4 สถานีเก็บตัวอย่างน้ำในอำเภอเวียงทอง

เลขที่สถานี	ชื่อสถานี
D 1	ชายฝั่งทะเล จ.เพชรบุรี
D 2	ปากแม่น้ำลุ่มทรสงคราม
D 3	ปากแม่น้ำลุ่มทรสาคร
D 4	ปากแม่น้ำลุ่มทรปราการ
D 5	ชายฝั่งทะเล อ.บางปู ลุ่มทรปราการ
D 6	ปากแม่น้ำบางปะกง ชลบุรี
D 7	ชายฝั่งทะเล อ่าวบางแสน จ.ชลบุรี
D 8	ปากแม่น้ำเพชรบุรี อ.บ้านแหลม
D 9	บริเวณกลางอ่าวไทย (เกาะสีชัง)
D 10	ชายฝั่งทะเล ศรีราชา ชลบุรี
D 11	ชายฝั่งทะเล หาดเจ้าสำราญ เพชรบุรี
D 12	บริเวณกลางอ่าวไทย
D 13	ชายฝั่งทะเล พัทยา ชลบุรี
D 14	ชายฝั่งทะเล ยะอำ เพชรบุรี
D 15	เกาะคราม สัตหีบ ชลบุรี
D 16	ชายฝั่งทะเล หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
D 17	บริเวณกลางอ่าวไทย
D 18	บริเวณเกาะจาน สัตหีบ
D 19	บริเวณกลางอ่าวไทย
D 20	ชายฝั่งทะเล อ่าวระยอง
D 21	บริเวณชายฝั่งทะเล อ่าวระยอง
D 22	ห่างชายฝั่งทะเล บ้านเพ ระยอง
D 23	ชายฝั่งทะเล บ้านเพ ระยอง
D 24	ชายฝั่งทะเล แหลมสิงห์ จันทบุรี
D 25	บริเวณห่างจากชายฝั่งทะเล แหลมสิงห์ จันทบุรี

(ตั้งแสดงในแผนที่ประกอบรูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างน้ำในอ่าวไทยตอนบน

## 2. การเก็บตัวอย่างน้ำ

### 2.1 กลุ่มตัวอย่างที่ไ้ศึกษา

เป็นตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยา 20 ตัวอย่างต่อ 1 ถู จากแม่น้ำบางปะกง 12 ตัวอย่างต่อ 1 ถู จากแม่น้ำท่าจีน 12 ตัวอย่างต่อ 1 ถู และจากอ่าวไทยตอนบน 25 ตัวอย่าง (ซึ่งมีเฉพาะถูน้ำหลากเนื่องจากค่าใช้จ่ายในการออกเก็บตัวอย่างในอ่าวไทยสูงมาก)

### 2.2 การกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง

กำหนดสถานีเก็บตัวอย่างตามสถานีเก็บตัวอย่างของสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติที่ศึกษาตรวจสอบคุณภาพแม่น้ำ เพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่างและข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเปรียบเทียบได้ดังนี้

- ก. แม่น้ำเจ้าพระยา จากกิโลเมตรที่ 0 ถึงกิโลเมตรที่ 145  
จำนวน 20 สถานี
  - ข. แม่น้ำบางปะกง จากกิโลเมตรที่ 0 ถึงกิโลเมตรที่ 122  
จำนวน 12 สถานี
  - ค. แม่น้ำท่าจีน จากกิโลเมตรที่ 0 ถึงกิโลเมตรที่ 138  
จำนวน 12 สถานี
  - ง. อ่าวไทยตอนบน 25 สถานี
- (ผังแผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างนี้ รูปที่ 3.1-3.5)

### 2.3 ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

การกำหนดระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำ จะแบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ

ช่วงที่ 1 (ถูน้ำหลาก) อยู่ระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม พ.ศ. 2526

ช่วงที่ 2 (ถูน้ำแล้ง) อยู่ระหว่างเดือนมีนาคม - เมษายน พ.ศ. 2527

## 3. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณกลางแม่น้ำซึ่ง เป็นจุดที่จะเก็บตัวแทนตัวอย่างน้ำได้ดีที่สุด (4) เก็บที่ระดับความลึก 1 เมตรจากผิวน้ำโดยประมาณ เก็บในช่วงน้ำลงซึ่งเป็นช่วงที่น้ำตามลำคลองต่าง ๆ จะไหลสู่แม่น้ำ โดยใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างน้ำ

#### 4. รายละเอียดในการเก็บ, การเตรียมและการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเทคนิค สเปกโตรฟลูออโรเมตรี

##### 4.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างน้ำ

ขวดเก็บตัวอย่าง ใช้ขวดแก้วสีอำพันขนาด 3.00 ลิ.ตม ทำความสะอาดด้วยสารละลายทำความสะอาด (โปตัสเซียมไดโครเมตในกรดซัลฟริกเข้มข้น -  $K_2Cr_2O_7$ , conc  $H_2SO_4$ ) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด อบให้แห้ง ฆ่าด้วยคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ ทั้งสารละลายที่ใช้ล้าง เดิมคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ใหม่อีก 50.00 ลิ.ตม.เพื่อใช้สกัดตัวอย่างน้ำทันทีที่เก็บ ปิดปากขวดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมปิดฝาเทฟลอน (teflon) ให้แน่น

##### 4.2 การเตรียมสารเคมีที่จะใช้

คาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ที่จะใช้ ต้องเป็นชนิดปราศจากสารประกอบอะโรมาติกซึ่งเตรียมได้โดยรีฟลักซ์กับแอคติเวตชาร์โคล (activated charcoal) 2 ชั่วโมง และทำการกลั่นเก็บสารที่กลั่นออกมาที่อุณหภูมิ  $78^{\circ}C$  ซึ่งเป็นจุดเดือดของคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้อีกครั้งด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

##### 4.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ขณะที่เรือกำลังแล่นช้า ๆ ณ บริเวณจุดเก็บตัวอย่าง ใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างน้ำเหวี่ยงให้ออกไปไกลจากตัวเรือลงตรงจุดกลางแม่น้ำ ที่ระดับความลึกประมาณ 1 เมตรจากผิวน้ำ (4) ทำการเก็บตัวอย่างใส่ในขวดที่เตรียมไว้ปริมาณ 2.80 ลิ.ตม. ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมบางและฝาให้แน่นทำการเขย่าอย่างแรง 10 นาทีเพื่อให้คาร์บอนแท่งอะคลอไรต์กระจายไปทั่วตัวอย่างน้ำ แล้วแช่ไว้ในถังบรรจุน้ำแข็ง

##### 4.4 การเก็บรักษาตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำจะถูกนำมาสกัดในห้องปฏิบัติการ โดยถ่ายตัวอย่างน้ำทั้งหมดในกรวยแยก ทำการเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 15 นาที แยกเอาชั้นคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ออกไว้ในขวดสีอำพันขนาด 150.00 ลิ.ตม. ที่เตรียมไว้ ทำการสกัดน้ำตัวอย่างอีก 1 ครั้งโดยเดิมคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์อีก 50.00 ลิ.ตม. ทำการสกัดเหมือนครั้งแรกแล้วแยกชั้นคาร์บอนแท่งอะคลอไรต์ออกมา รวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ ปิดฝาขวดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมและฝาขวดให้แน่น นำไปแช่ไว้ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิไว้ประมาณ 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการระเหย



## 5. การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อมาวิเคราะห์

### 5.1 Extraction Concentration

ถึงแม้ว่าคาร์บอนเพอร์คลอไรด์จะเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับขบวนการสกัด แต่ก็ เป็นตัวกลางที่ไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นนอร์มัลเฮกเซน ซึ่งไม่ดูดกลืนคลื่นแสงที่ใช้ในการทดลอง คือช่วงความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร จะทำการแยกคาร์บอนเพอร์คลอไรด์ออกได้โดยใช้เครื่องมือระเหยสารแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง ละลายส่วนที่เหลืออยู่ (residue) ด้วยนอร์มัลเฮกเซน 2.00-3.00 ลบ.ซม.

### 5.2 การกำจัดสิ่งแปลกปลอมในสารตัวอย่าง (Clean up)

ก่อนที่จะนำสารละลายที่สกัดออกมาได้ไปหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน จะต้องทำการกำจัดสารอื่น ๆ ที่มีปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน เช่นพวกสารประกอบที่โพลาร์

#### ก. การเตรียมซิลิกาเจล (silica gel) ขนาด 20-40 mesh

เพื่อใช้ในคอลัมน์สำหรับทำโครมาโทกราฟี

- 1) นำซิลิกาเจลมาฟลักซ์ด้วยนอร์มัลเฮกเซนโดยใช้เครื่องมือสกัด (soxhlet extractor) 6 ชั่วโมง
- 2) นำมาทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นขั้นตอนแยกดีเวตสาร
- 3) ขณะเย็นลง สัมผัสด้วยน้ำกลั่นในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก
- 4) ซิลิกาเจลที่เตรียมได้จากข้อ 1, 2, 3 มีอายุการใช้งานไม่เกิน 4 สัปดาห์

#### ข. วิธีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในสารตัวอย่าง

- 1) การเตรียมคอลัมน์ ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.9 ซม. บรรจุซิลิกาเจลที่เตรียมไว้สูง 14 ซม. ผ่านนอร์มัลเฮกเซนจนอิ่มตัว
- 2) นำสารละลายจากข้อ 4.1 ใสลงในคอลัมน์ ไล่ล้างด้วยนอร์มัลเฮกเซน สารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ 6 ลบ.ซม.แรกทิ้งไป (หลังจากการตรวจสอบแล้ว)

เก็บสารละลาย 30 ลบ.ซม. ต่อมาทำให้เข้มข้นโดยการระเหยด้วยความร้อนน้อย ๆ ปรับปริมาณให้เหลือเพียง 5 ลบ.ซม. นำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณและชนิดต่อไป

#### 6. การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

เครื่องมือที่ใช้ : Shimadzu Different Spectrofluorophotometer  
Model. RF-520 ชนิด Double beam และระบบอ่านเป็น  
แบบ Integrated Circuit

##### 6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโครซิน

ก. ชั่งโครซิน 1.000 กรัมละลายด้วยนอร์มัลเฮกเซนในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลบ.ซม. จะได้สารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock standard solution) ที่มีความเข้มข้น 1.0000 กรัมต่อ ลบ.ซม. (หรือ 1000 ส่วนในล้านส่วนหรือ 1000.00 ppm.)

ข. นำสารมาตรฐานจากข้อ ก. มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยกำหนดอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.10-1.00 ppm. เป็นสารละลายมาตรฐานในการทำการกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ค. ใช้เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ เลือกสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นใดก็ได้ไปสแกนหาความยาวคลื่นเอกไซเตชัน (Excitation Wavelength) และอีมิชชัน (Emission Wavelength) พร้อมทั้งสำรวจอย่าง

ง. กำหนดความยาวคลื่นที่ได้จากข้อ ค. จากนั้นทำการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ (Relative Fluorescence Intensity) ของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ นำค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์กับค่าความเข้มขมมาพล็อตกราฟจะได้กราฟมาตรฐาน

จ. นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ ทำการวัดค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ในภาวะเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ที่วัดได้นำไปคำนวณหาปริมาณปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนในตัวอย่างน้ำได้ดังนี้

##### 6.2 ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้น

ตัวอย่างน้ำเริ่มต้น 2.80 ลบ.ซม. นำมาลึกลงเอาปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนให้อยู่ในตัวทำละลายเฮกเซน 5.00 ลบ.ซม.

สารละลายเฮกเซน 1 มล. มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน x ไมโครกรัม  
 สารละลายเฮกเซน 5 มล. มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 5x ไมโครกรัม  
 ตัวอย่างน้ำ 2.8 ลบ.ม.มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน 5x ไมโครกรัม  
 ตัวอย่างน้ำ 1ลบ.ตม.มีความเข้มข้นของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน  $\frac{5x}{2.8}$  ไมโครกรัม  
 x คือความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

## 7. การวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

### เครื่องมือที่ใช้

1) Shimadzu GC-6A gas Chromatograph ประกอบด้วย flame-  
 -ionization detector และ model Chromatopac 1A Data System, carrier  
 gas คือ nitrogen มี coiled glass column (2mx0.3 cm.I.D.) 2 ชนิดที่ใช้ คือ  
 ชนิดแรกบรรจุด้วย 10% Apiezon L on Chromosorb W (60-80 mesh) programed  
 from 180<sup>o</sup>-280<sup>o</sup>C at 5<sup>o</sup>C/min และชนิดที่ 2 บรรจุด้วย 2% Silicone OV-1 on  
 Uniport HP (60-80 mesh) programmed from 120<sup>o</sup>-250<sup>o</sup>C at 5<sup>o</sup>C/min.

2) Hitachi M-80 combined mass spectrometer-gas chromato-  
 graph ประกอบด้วย Hitach M-003 data processing system เป็นชนิด EI-source  
 electron energy 70 eV, glass column (1mx1.3 cm. I.D.) 2% Silicone OV-1  
 on Uniport HP (60-80 mesh) programmed from 120<sup>o</sup>-230<sup>o</sup> at 5<sup>o</sup>C/min.

(วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบโดยการเปรียบเทียบค่า retention time และ mass  
 spectra เทียบกับสารมาตรฐาน)

## 8. รายละเอียดในการเก็บ, การเตรียมและการวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างน้ำโดย

### เทคนิคการย้งน้ำหนัก

เทคนิคนี้ทำโดยการสกัดเอาน้ำมันและไขมันส่วนที่ละลาย (Dissolved) และ  
 เป็นอิมัลชัน (Emulsion) อยู่ในน้ำด้วยฟร็อน จากตัวอย่างน้ำที่ถูกปรับสภาพให้เป็นกรด แล้ว  
 นำไประเหยฟร็อน สารที่ตกไปย้งน้ำหนักหาปริมาณน้ำมันและไขมัน

### 8.1 การเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึก 1 เมตรจากระดับผิวน้ำใส่ในขวดเก็บ.

สารตัวอย่างที่เตรียมมีวัปริมาณ 1 ลบ.ตม. เติมกรดซัลฟูริก (1+1) 5 ลบ.ซม. เพื่อป้องกันการย่อย

ละลายโดยแบคทีเรีย เก็บตัวอย่างไว้ในถังบรรจุน้ำแข็ง

### 8.2 การเตรียมสารตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณ

ก. เทตัวอย่างน้ำ 1.00 ลบ.ตม. จากขวดเก็บตัวอย่างลงในกรวยแยกเพื่อ  
ทำการสกัดแยกเอาน้ำมันและไขมัน

ข. ล้างขวดเก็บตัวอย่างอีก 2 ครั้งด้วยฟร็อน ครั้งละ 15.00 ลบ.ซม.  
เทสารละลายทั้งหมดรวมลงในกรวยแยก

ค. เติมฟร็อนอีก 15.00 ลบ.ซม. ลงในกรวยแยก ทำการเขย่าอย่างแรง  
ประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น

ง. แยกเอาชั้นฟร็อนออกไปไว้ในขวดแก้วกันกลม แล้วเติมฟร็อนลง  
ในชั้นน้ำอีก 25.00 ลบ.ซม. ทำการสกัดอีกครั้งหนึ่ง

จ. รวมชั้นฟร็อนทั้งหมดไว้ในขวดแก้วกันกลม นำไปทำการระเหยเอา  
ตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องมือระเหยสารแบบลดความดันใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส  
จนกระทั่งมีปริมาตรเหลือเพียง 2.00 - 3.00 ลบ.ซม. ถ่ายสารที่เหลือในหลอดเช่นดีฟิวล์

ฉ. นำหลอดเช่นดีฟิวล์ที่บรรจุสารตัวอย่างจากข้อ จ. ทำให้แห้งโดย  
การผ่านกาซไนโตรเจน

ช. เก็บหลอดบรรจุสารตัวอย่างจากข้อ ฉ. ไว้ในโถบรรจุสารดูดความชื้น  
เป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปชั่งน้ำหนัก

หมายเหตุ การทดลองทำ blank เทียบกับตัวอย่างน้ำ

### 8.3 การคำนวณ (Calculation)

การคำนวณเพื่อหาปริมาณน้ำมันและไขมันทั้งหมดโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมันและไขมันทั้งหมด} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่าง}}$$

(มิลลิกรัมต่อลิตร)

A คือน้ำหนักของหลอดใส่สารตัวอย่าง + สารที่เหลืออยู่

B คือน้ำหนักของหลอดใส่สารตัวอย่าง + blank

## 9. การเก็บ, การเตรียมและการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำโดยเทคนิค

### อินฟราเรดสเปกโตรเมตรี

เทคนิคนี้จะใช้การสกัดน้ำมันและไขมันจากตัวอย่างน้ำด้วยฟรอนเช่นเดียวกับเทคนิคการชั่งโดยน้ำหนัก หลังจากการสกัดจะรวมชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ในขวดวัดปริมาตรและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เทียบกับสารละลายน้ำมันมาตรฐาน

#### 9.1 การเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ

วิธีการเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำทำเช่นเดียวกับเทคนิคการชั่งน้ำหนัก

#### 9.2 การเตรียมสารตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณ

ก. ทำการสกัดสารตัวอย่างเช่นเดียวกับเทคนิคการชั่งน้ำหนักข้อ ก-ง

ข. รวมชั้นของฟรอนที่สกัดทั้งหมดไว้ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 ลบ.ซม. และปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100.00 ลบ.ซม. ด้วยฟรอน

ค. เตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดออกเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ

โดยใช้ฟรอนเป็นตัวทำละลายสำหรับทำกราฟมาตรฐาน

ง. นำสารมาตรฐานและสารตัวอย่างมาวัดด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดในช่วงความยาวคลื่น  $3200\text{ cm}^{-1} - 2700\text{ cm}^{-1}$  บันทึกค่าการดูดกลืนคลื่นแสงและความยาวคลื่น (ตั้งรูปที่ 5 ถึง 10 ในภาคผนวก)

จ. เลือกความยาวคลื่นที่สารมาตรฐานและสารตัวอย่างให้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมากที่สุด ในการวิเคราะห์นี้ความยาวคลื่นคือ  $2930\text{ cm}^{-1}$  (เป็นความถี่ของ C-H stretching) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำมันเป็นสารมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปสร้างกราฟมาตรฐานจากนั้นนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่นเดียวกันไปหาความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน

#### 9.3 การคำนวณ

การคำนวณหาปริมาณของน้ำมันและไขมันโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมันและไขมันทั้งหมด} = \frac{A \times 1000}{\text{ปริมาตรของสารตัวอย่าง}}$$

(มิลลิกรัมต่อ ลบ.ซม.)

$A =$  น้ำหนักของน้ำมันและไขมันของสารที่สกัดได้เทียบจากกราฟมาตรฐาน



## 10. การศึกษา Elution Pattern

การศึกษาหัวข้อนี้เพื่อที่จะกำหนดการเก็บปริมาณของสารตัวอย่างที่จะทำการ  
 ะล้างออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อการกำจัดสารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน

10.1 สารตัวอย่างที่ใช้ศึกษา ใช้ตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยาจำนวน

3 ตัวอย่างคือ CHL 1, CHL 5, CHL 12

10.2 วิธีทดลอง

ก. เตรียมคอลัมน์สำหรับแยกสาร 4 คอลัมน์ (หัวข้อ 5.2)

(สำหรับทำแบลงค์ 1 ตัวอย่าง)

ข. ทุก ๆ คอลัมน์เติมสารละลายนอร์มัลเฮกเซนต้นจนอิ่มตัว

ค. นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ (รายละเอียดข้อ 5)

ใส่ลงในคอลัมน์

ง. ะล้างคอลัมน์ด้วยนอร์มัลเฮกเซน ทำการเก็บสารละลาย

ที่ออกมาจากคอลัมน์ปริมาตรต่าง ๆ นำแต่ละส่วนที่แยกออกมาไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง  
 สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์เทียบกับกราฟมาตรฐาน (ดังรายละเอียดในข้อ 6)

## 11. การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% Recovery)

เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดปิโตรเลียมไฮโดรคาร์บอนจากตัวอย่าง  
 น้ำโดยใช้ตัวทำละลายคาร์บอนเททระคลอไรด์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานโครซินที่ทราบ  
 ปริมาณที่แน่นอนลงในตัวอย่างน้ำ และทำการทดลองเช่นเดียวกันกับเมื่อมีสารตัวอย่างแต่เพียงอย่าง  
 เดียว แล้วคำนวณผลที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยการเทียบค่า

11.1 วิธีการทดลอง

ก. ทำการเก็บตัวอย่าง (ดังรายละเอียดข้างต้น) ที่จุดเดียวกัน

5 ตัวอย่าง

ข. แยกออก 1 ตัวอย่างสำหรับเป็นแบลงค์ (blank) ที่เหลืออีก

4 ตัวอย่างทำการเติมสารมาตรฐานโครซินลงในปริมาณต่าง ๆ กันที่ทราบปริมาณที่แน่นอน

ค. ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการ

วิเคราะห์โดยเทคนิคการวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์



ง. นำสารตัวอย่างที่เตรียมพร้อม กับ แบลงค์ไปวัดหาปริมาณด้วย เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ เทียบกับสารละลายมาตรฐานโครซิน

จ. ทำการคำนวณผลที่ได้จากการทดลอง เปรียบเทียบกับปริมาณสาร มาตรฐานที่เติมลงไปจริง คิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์

### 11.2 การคำนวณ

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของสารตัวอย่าง เพียงอย่างเดียว =  $x$

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของสารตัวอย่าง + สารมาตรฐาน =  $y$

ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของสารมาตรฐานมีค่า =  $y-x$

เมื่อนำค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของสารมาตรฐานไปหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานได้ผล ออกมาเท่ากับ  $a$  ไมโครกรัม

แต่จากการทดลอง เติมสารมาตรฐานลงไปจริง  $b$  กรัม

$$\therefore \text{เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (\% Recovery)} = \frac{ax100}{b}$$

### 12. การศึกษาเปรียบเทียบตัวทำลายที่ใช้ในการสกัด

เป็นการศึกษาการสกัดด้วยตัวทำลายคาร์บอน เททระคลอไรด์และนอร์มัล เฮกเซนด้วยตัวอย่างเดียวกัน เพื่อเล่นแนวทางในการลดขั้นตอนการเตรียมสารและเนื่องจากตัวทำลายคาร์บอน เททระคลอไรด์แม้จะเป็นตัวทำลายที่ดีสำหรับสารปีโตรเลียมไฮโดรคาร์บอน แต่ก็เป็นตัวกลางที่ไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาหาปริมาณด้วย เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์และ เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงสามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้

#### 12.1 วิธีการทดลอง

ก. การเตรียมขวดสำหรับเก็บสารตัวอย่าง ก่อนนำไปบรรจุสาร ตัวอย่าง

ขวดที่ 1 เติมคาร์บอน เททระคลอไรด์ 50.00 ลบ.ซม.

ขวดที่ 2 เติม นอร์มัล เฮกเซน 50.00 ลบ.ซม.

ขวดที่ 3 ไม่ต้องเติมตัวทำลายใด ๆ

ข. ทำการเก็บ, เตรียมและวิเคราะห์สารตัวอย่างตามเทคนิคการ

วิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (ตามหัวข้อ 4)

หมายเหตุ เฉพาะขวดที่ 2 จะใช้ نرمัล เอกเซน เป็นตัวทำลายตั้งแต่เริ่มสกัดตัวอย่างน้ำ จนกระทั่งการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ ส่วนขวดแรกจะใช้วิธีของ IOC/WMO

### 13. การวิเคราะห์ทางสถิติ

#### 13.1 การหาค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร ( $\bar{X}$ )

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X}{n}$$

$\bar{X}$  คือค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร

$\Sigma X$  คือผลรวมของปริมาณสาร

$n$  คือจำนวนตัวอย่าง



#### 13.2 การหาความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{n\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{n(n-1)}}$$

SD คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\Sigma X$  คือผลรวมของปริมาณ

$\Sigma X^2$  คือผลรวมของปริมาณสารแต่ละตัวยกกำลังสอง

$n$  คือจำนวนตัวอย่าง

#### 13.3 การทดสอบความแปรปรวนของปริมาณสารโดยวิธี ANOVA (F-test)

(การทดสอบความแตกต่างของตัวอย่างทั้งหมด)

ก. Grand Total (Correction factor), GT

$$GT = \frac{(\Sigma X)^2}{n}$$

$\Sigma X^2$  คือผลรวมของปริมาณสารทั้งหมดยกกำลังสอง

$n$  คือจำนวนตัวอย่าง

ข. Total Sum of Square,  $SS_{total}$

$$SS_{total} = \Sigma X^2 - GT$$

$\Sigma X^2$  คือผลรวมของปริมาณสารแต่ละตัวยกกำลังสอง

GT คือค่า Grand Total

ค. Between Groups Sum of Square,  $SS_{\text{between}}$

$$SS_{\text{between}} = \frac{(\sum X_1)^2}{n_1} + \frac{(\sum X_2)^2}{n_2} + \frac{(\sum X_3)^2}{n_3} + \dots$$

$n_1, n_2, n_3$  = คือจำนวนตัวอย่างของกลุ่มที่ 1, 2, 3 ---

ง. Within Groups Sum of Square,  $SS_{\text{within}}$

$$SS_{\text{within}} = SS_{w_1} + SS_{w_2} + SS_{w_3} + \dots$$

$$SS_w = \sum X_n^2 - \frac{(\sum X_n)^2}{n_n}$$

จ. Degree of freedom for each sum of square, df

$$\text{df ของ } SS_{\text{total}} = (n-1)$$

$$\text{df ของ } SS_{\text{between}} = (k-1)$$

$$\text{df ของ } SS_{\text{within}} = (n-k)$$

k คือจำนวนกลุ่มของสารตัวอย่าง

ฉ. Estimate of Variance of Mean Square (MS)

$$\text{Variance} = \frac{\text{Sum of Square}}{\text{df}}$$

Variance คือ Variance<sub>between</sub>, Variance<sub>within</sub>

ช. Compute F

$$= \frac{\text{Variance}_{\text{between}}}{\text{Variance}_{\text{within}}}$$

### 13.4 การทดสอบย่อยเพื่อดูว่ามีกลุ่มตัวอย่างคู่ใดที่แตกต่างกัน

โดยทั่ว ๆ ไปนิยมใช้ค่า LSD (Least Significant Different test) จะเหมาะกับกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่มมีจำนวนเท่ากัน แต่ในกรณีนี้จำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่มมีจำนวนไม่เท่ากัน และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานแตกต่างกันมาก R.E. Kirk (Experimental designed, Brooks/Cole Publishing Company, 1982 หน้า 115) แนะนำกรณีนี้ควรจะใช้ t-test ทดสอบข้อมูล 2 กลุ่มดังนี้

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}}$$

$$df = n_1 + n_2 - 2$$

$\bar{X}_1, \bar{X}_2$  คือค่าเฉลี่ยของปริมาณของกลุ่มที่ 1, 2 ตามลำดับ

$SD_1^2, SD_2^2$  คือค่าความแปรปรวนของตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 2 ตามลำดับ

$n_1, n_2$  คือจำนวนตัวอย่างของกลุ่มที่ 1, 2 ตามลำดับ

### 13.5 การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างในแม่น้ำเดียวกัน ใน 2 ช่วงฤดู โดยใช้ t-test

ในกรณีจะแตกต่างจากข้อ 13.4 จะใช้ทดสอบตัวอย่างจากแหล่งเดียวกันเปรียบเทียบในช่วงฤดูหน้าและฤดูหน้าแล้ง (Related Samples) โดยใช้สูตร

$$t = \frac{\Sigma D}{\sqrt{\frac{n\Sigma D^2 - (\Sigma D)^2}{n-1}}}$$

$\Sigma D$  = ผลรวมความแตกต่างระหว่างปริมาณใน 2 ช่วงฤดู

$n$  = จำนวนตัวอย่าง