บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

เรือสำรวจประมง 2 ของกรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ตัวอย่างน้ำเก็บโดยใช้ขวดแก้วจุประมาณ 2.5 ลิตร ตัวอย่างตะกอนใช้เครื่องตักดิน Peterson Grab

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด

2.1.1 กรวยแยก (separating funnel) ขนาด 1,000 ml.

2.1.2 ตะแกรงสำหรับร่อนดินขนาด 40 เมช

2.1.3 Thimble

2.1.4 เครื่องมือสกัดสาร (Soxhlet extraction apparatus)

2.1.5 เตาอบที่อบอุณหภูมิสูงถึง 400^{0} ซ.

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการ clean up และเครื่อง Gas chromatograph

2.2.1 Chromatographic column with teflon stopcock 10 mm inner diameter

2.2.2 Glass wool

2.2.3 Hyperdemic syringe 10 ul

2.2.4 เครื่อง Gas chromatograph ที่ใช้คือ Varian aerograph Model 2700 (FID) ซึ่งประกอบด้วย flame ionization detector 350^{0} C, column $5' \times \frac{1}{8}''$ 1.5 ·/. OV 101 on Chrom.G., programmed from 70-350^{0} at 8^{0}C/min., Carrier gas N_2 20 ml/min.

ในการศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์ปริมาณนอร์มัล-พาราฟิน ในน้ำและตะกอนตามวิธีการของ Keizer et al. (1977) และ Wakeham, S.G. and Carpenter, R. (1976)

หลักของวิธีนี้คือสกัดสารไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดที่มีอยู่โดยใช้ n - hexane เป็นตัวสกัด ขั้นต่อไปแยกสาร non - polar hydrocarbon ออกจากไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด โดยใช้ column chromatograph แล้วจึงนำสารที่แยกออกมาได้นี้ไปหาปริมาณพาราฟินโดยเครื่องมือ Gas chromatograph เทียบกับนอร์มัล-พาราฟินบริสุทธิ์เป็น external standards

ค่าความแม่นยำ (precision) ที่หาได้ ± 10.24 °/.

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด
   - 1.1 Mercuric chloride or sodium azide
   - 1.2 n - hexane
   - 1.3 Anhydrous sodium sulfate
   - 1.4 conc. HCl
2. สารเคมีที่ใช้ในการ clean up และเครื่อง GLC
   - 2.1 Petroleum ether
   - 2.2 Alumina (neutral)
   - 2.3 Silica gel
   - 2.4 Standard solutions n-paraffins C_{10} - C_{30}

วิธีดำเนินงาน

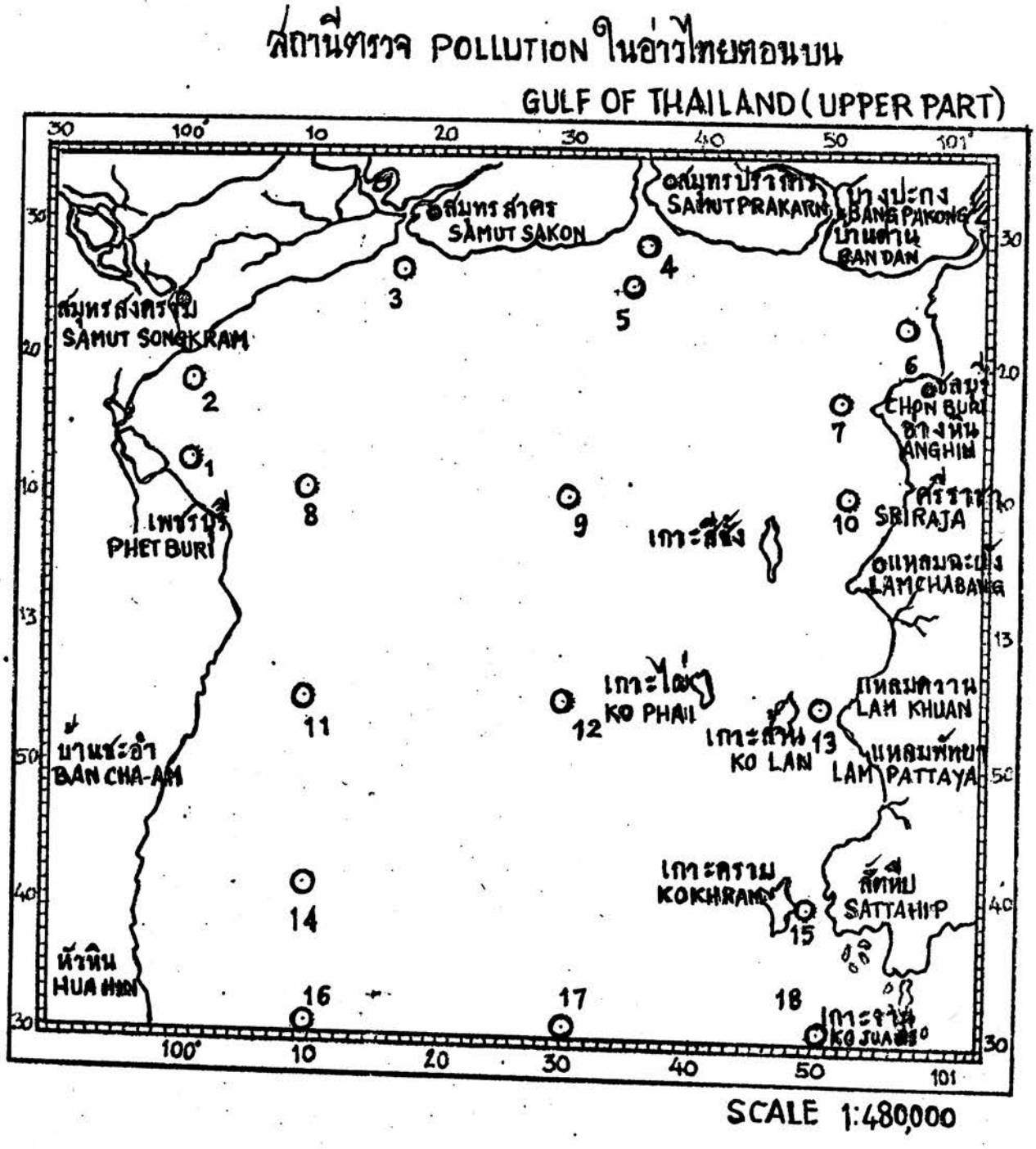
1. การกำหนดสถานี

การเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและตะกอนในอ่าวไทยแบ่งเป็น 2 ตอน คือตอนบนและตอนล่าง การกำหนดสถานีเป็นไปตามสถานีที่ใช้ตรวจน้ำเสียในอ่าวไทยดังนี้

1.1 สถานีตรวจน้ำเสียในอ่าวไทยตอนบน มีทั้งหมด 18 สถานี

เลขที่สถานี	ตำแหน่งสถานี	
1	จ. เพชรบุรี	(ใกล้ฝั่ง)
2	จ. สมุทรสงคราม	
3	จ. สมุทรสาคร	
4	จ. สมุทรปราการ	(ใกล้ฝั่ง)
5	จ. สมุทรปราการ	(ไกลฝั่ง)
6	จ. ชลบุรี	
7	อ่างหิน	
8	จ. เพชรบุรี	(ไกลฝั่ง)
9	เกาะสีชัง	(กลางอ่าว)
10	ศรีราชา	
11	บ้านชะอำ	
12	เกาะไผ่	
13	เกาะล้าน	
14	ใกล้หัวหิน	
15	เกาะกราม	
16	ใกล้หัวหิน	
17	กลางอ่าว	
18	เกาะจาน	

ดังแสดงในแผนที่ประกอบ รูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนที่สถานีตรวจน้ำเสียในอ่าวไทยตอนบน

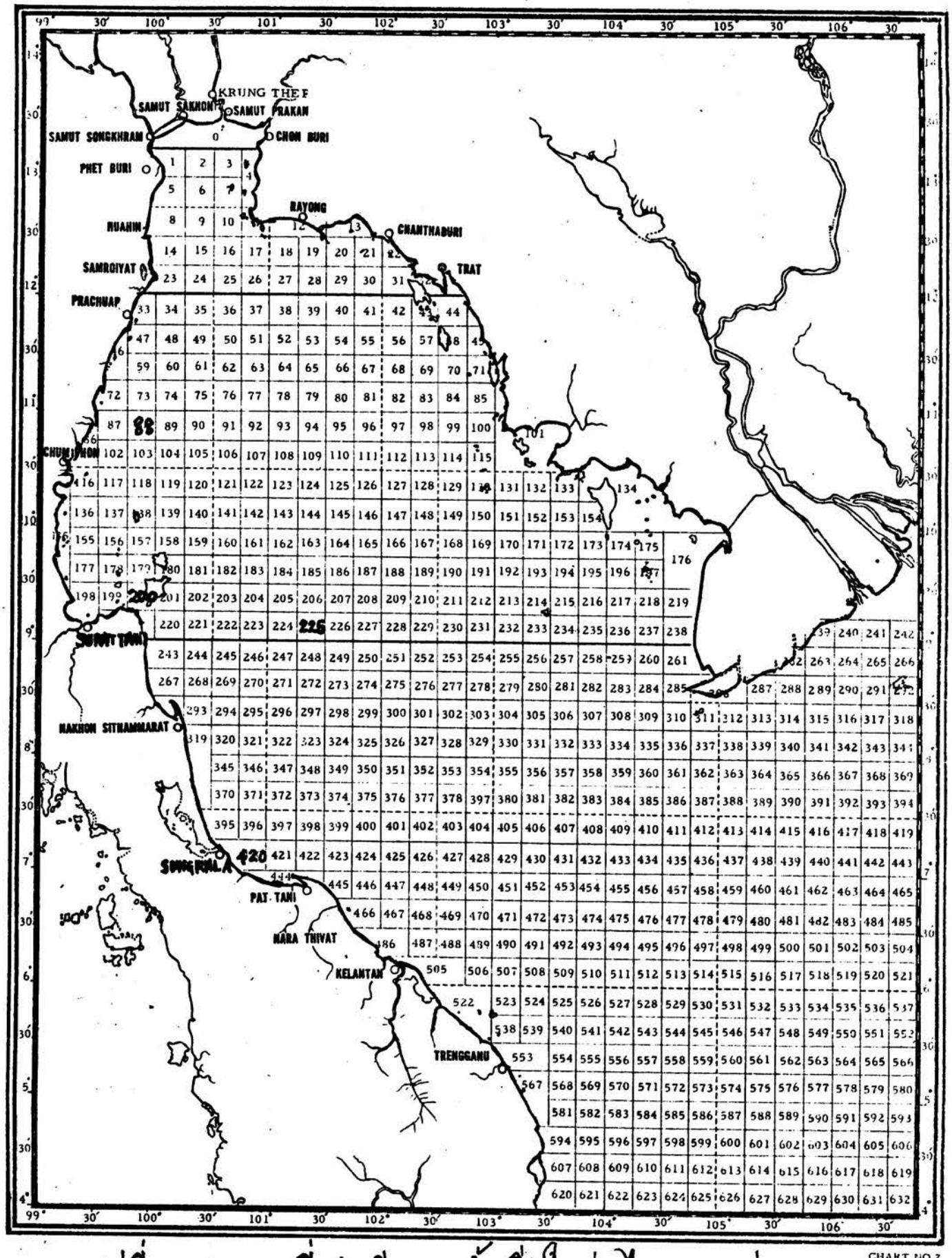
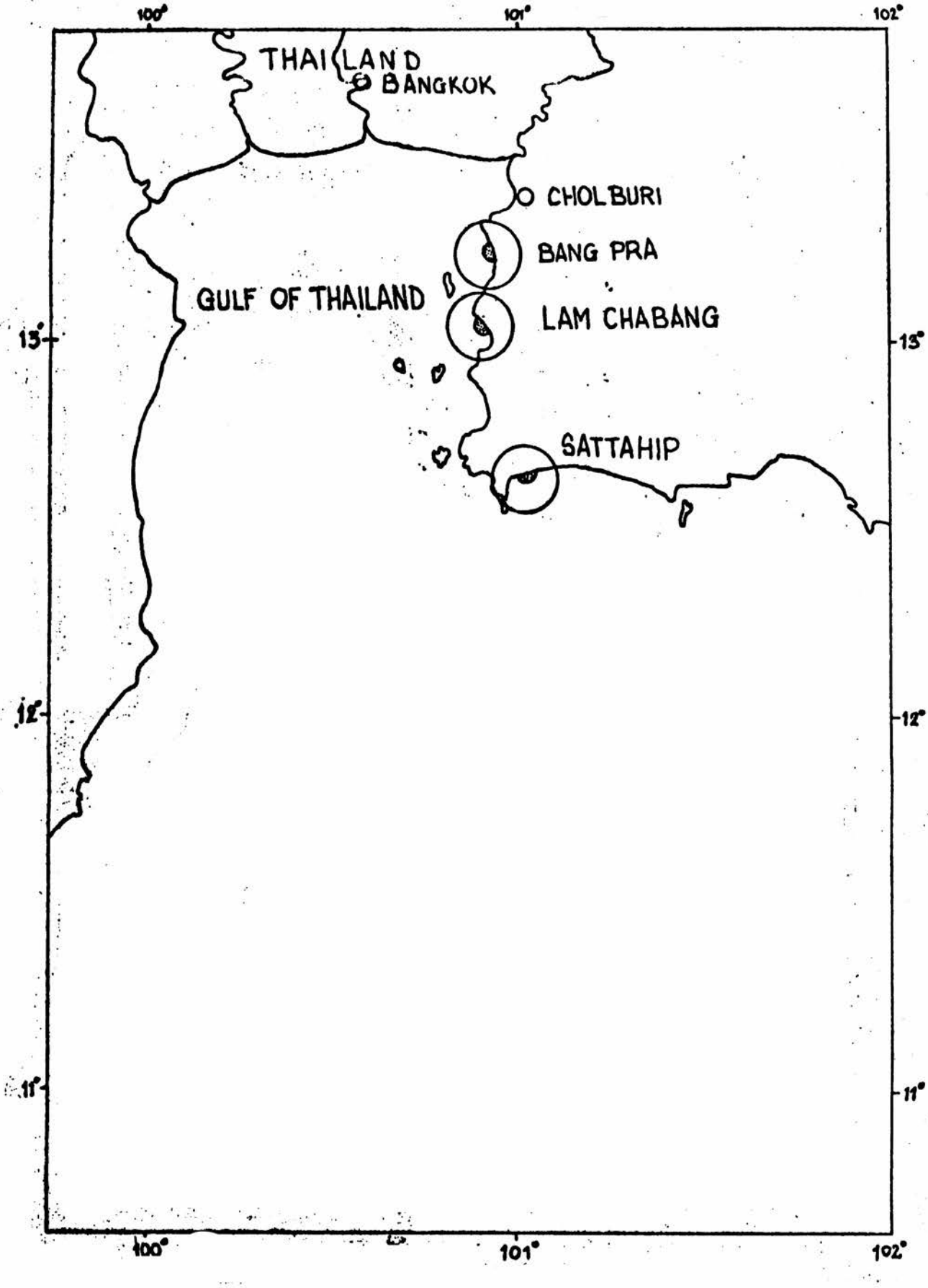


CHART NO 2

รูปที่ 2 แผนที่สถานีตรวจน้ำเสียในอ่าวไทยตอนล่าง

รูปที่ 3 Location of the collecting stations, on the east coast of The Gulf of Thailand.



2.2 สถานีตรวจน้ำเสียในอ่าวไทยตอนล่าง มี 13 สถานี ในการทดลอง 4 สถานี ดังนี้

เลขที่สถานี	ตำแหน่งสถานี
88	ใกล้ จ.ชุมพร
200	จ. สุราษฎร์ธานี
225	กลางอ่าว
420	จ. สงขลา

ดังแสดงในแผนที่ประกอบ รูปที่ 2

2.3 ณ บริเวณชายฝั่งทะเล 3 สถานีคือที่ แหลมฉะบัง, บางพระ และ ก 10 สัตหีบ ดังแสดงในแผนที่ประกอบรูปที่ 3

2. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดังนี้

2.1 อ่าวไทยตอนบน

ระยะที่ 1 เดือน มิถุนายน 2520

ระยะที่ 2 เดือน กันยายน 2520

2.2 อ่าวไทยตอนล่าง เดือน พฤศจิกายน 2520

2.3 บริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก

ระยะที่ 1 เดือน พฤษภาคม 2520

ระยะที่ 2 เดือน กันยายน 2520

2.4 การเก็บและรักษาตัวอย่างน้ำ

ตัวอย่างน้ำเก็บที่ระดับผิวน้ำ บรรจุในขวดแก้วขนาด 2 ลิตร การเก็บรักษาตัวอย่างใช้ 1.5 ml $HgCl_2$ อิ่มตัว หรือ NaN_3 1 $g/_1$ ต่อตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บรักษาด้วยวิธีนี้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้

2.5 การเก็บและรักษาตัวอย่างตะกอน

ตัวอย่างตะกอนเก็บที่ผิวหน้าเช่นกันโดยใช้ Peterson Grab เก็บบรรจุไว้ในขวดแก้ว การเก็บรักษาตัวอย่างแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ – 20° ซ.

3. การวิเคราะห์หาปริมาณอร์มัล–พาราฟินจากน้ำมันในตัวอย่าง

3.1 การหาปริมาณอร์มัล–พาราฟินในตัวอย่างน้ำ

การสกัด

1. นำตัวอย่าง 2 ลิตร ปรับให้มีความเป็นกรด (pH) ประมาณ 2 หรือน้อยกว่านี้โดยใช้กรดเกลือ ปกติจะใช้ไม่เกิน 5 ml เพียงพอสำหรับตัวอย่างหนึ่ง ๆ

2. เทตัวอย่างน้ำใส่ในกรวยแยก (separating funnel) สกัดด้วย 100 ml n - hexane ต่อไปตามด้วย 50 ml n-hexane อีก 3 ครั้ง ทั้งหมดรวมเป็นสกัดด้วย n-hexane 250 ml 4 ครั้ง ในการสกัดแต่ละครั้งเขย่าอย่างแรงอย่างน้อย 3 นาที

3. ใส่โซเดียมซัลเฟตที่แห้ง ประมาณ 40 กรัม ในสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมด เพื่อดูดความชื้นแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

4. กรองสารละลายที่สกัดได้ แล้วนำมาลดปริมาตรโดยปล่อยให้ระเหยในอากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 ml

5. เก็บสารละลายนี้ไว้พร้อมปิดฝาด้วยแผ่นอลูมิเนียม เพื่อนำไปทำ clean up ต่อไป

3.2 การหาปริมาณอร์มัล–พาราฟินในตัวอย่างตะกอน

การสกัด

1. นำตัวอย่างตะกอนที่ทำให้แห้งแล้วบดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช

2. ชั่งดินที่ร่อนแล้ว 100 กรัม บรรจุใน extraction thimble สกัดด้วย n-hexane 250 ml ในเครื่องสกัดสาร

3. สกัดที่ 70° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. เก็บสารละลายที่สกัดได้ นำไประเหยโดยตั้งทิ้งไว้ในอากาศ ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 ml

5. เก็บสารละลายนี้ไว้พร้อมปิดฝาด้วยแผ่นอลูมิเนียม เพื่อนำไปทำ clean up ต่อไป

การทำ clean up ด้วย Column chromatography

1. นำคอลัมน์ บรรจุด้วย silica gel (อบที่ 250° ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำให้ชื้นด้วย 5 % น้ำ) ติดตามด้วย alumina (ซึ่งอบที่ 400°ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำให้ชื้นด้วย 5 % น้ำ เช่นกัน)

2. ก่อนจะผ่านตัวอย่างที่ได้ระเหยไว้แล้ว ทำคอลัมน์ให้เปียกเสียก่อนด้วย n-hexane แล้วจึงผ่านตัวอย่างลงไป

3. เมื่อระดับของ n-hexane ลดลงมาถึงชั้นของ alumina แล้ว ใช้ n - hexane เป็นตัวชะสารในสารละลายตัวอย่าง

4. เก็บสารสะลายที่ผ่านคอลัมน์ 100 ml แรก

5. นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไประเหยให้แห้งโดยปล่อยทิ้งไว้ในอากาศ แล้วทำให้มีปริมาตร 100 ul พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง GLC

4. การตรวจหาปริมาณสารนอร์มัล-พาราฟินโดยใช้เครื่อง GLC

4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน นอร์มัล-พาราฟิน (Standard n-paraffins solution) เป็น 2 ชุดดังนี้

4.1.1 สารละลายมาตรฐานนอร์มัล-พาราฟิน C_{10}-C_{18} เป็นสารละลายมาตรฐานผสม โดยทำสารละลายมาตรฐานให้เจือจางลง 500 เท่า จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นใน 1 ul ดังนี้

C_{10}	=	1.4601	µg
C_{11}	=	1.4803	µg
C_{12}	=	1.4974	µg
C_{13}	=	1.5130	µg
C_{14}	=	1.5256	µg
C_{15}	=	1.5370	µg
C_{16}	=	1.5469	µg
C_{17}	=	1.5560	µg
C_{18}	=	1.5638	µg

4.1.2 สารละลายมาตรฐานนอร์มัล-พาราฟิน $C_{19} - C_{30}$ เป็นสารละลายมาตรฐานผสม ทำให้เจือจาง 100 เท่า จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นใน 1 µl ดังนี้

C_{19}	=	0.8580	µg
C_{20}	=	0.8583	µg
C_{21}	=	0.8585	µg
C_{22}	=	0.8590	µg
C_{23}	=	0.8595	µg
C_{24}	=	0.8595	µg
C_{25}	=	0.8598	µg
C_{26}	=	0.8600	µg
C_{28}	=	0.8605	µg
C_{30}	=	0.4305	µg

4.2 การหาค่า retention time

ฉีดสารละลายมาตรฐานผสม $C_{10} - C_{30}$ เข้าเครื่อง GLC วัดค่า retention time คือระยะเวลาของสารแต่ละชนิดที่ออกมาจากเครื่อง เปรียบเทียบกับค่า retention time ที่ได้จากตัวอย่าง ถ้าค่าที่ได้เท่ากันจะเป็นสารชนิดเดียวกัน

4.3 การคำนวณผลจาก chromatogram

4.3.1 การตรวจ peak ที่ต้องการ เพื่อหาสารแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบค่า retention time ของ peak จาก chromatogram ของมาตรฐาน ตรงกับของตัวอย่าง ดังแสดงภาพประกอบดังรูปที่ 4, รูปที่ 5, รูปที่ 6 และรูปที่ 7

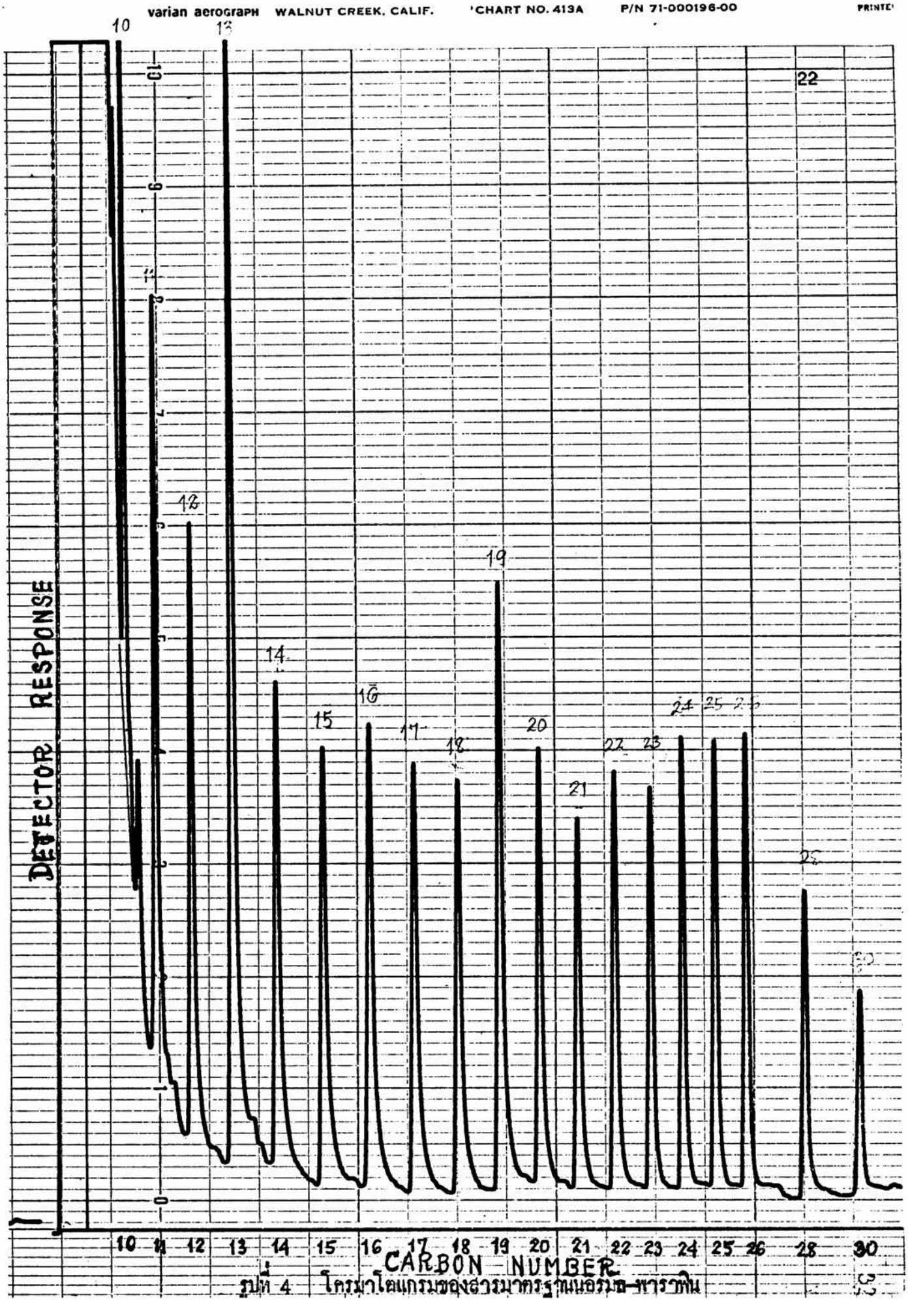
4.3.2 การหาพื้นที่ peak

ในกรณี peak มีความสูงมาก ความกว้างของ peak มีน้อยใช้วิธี

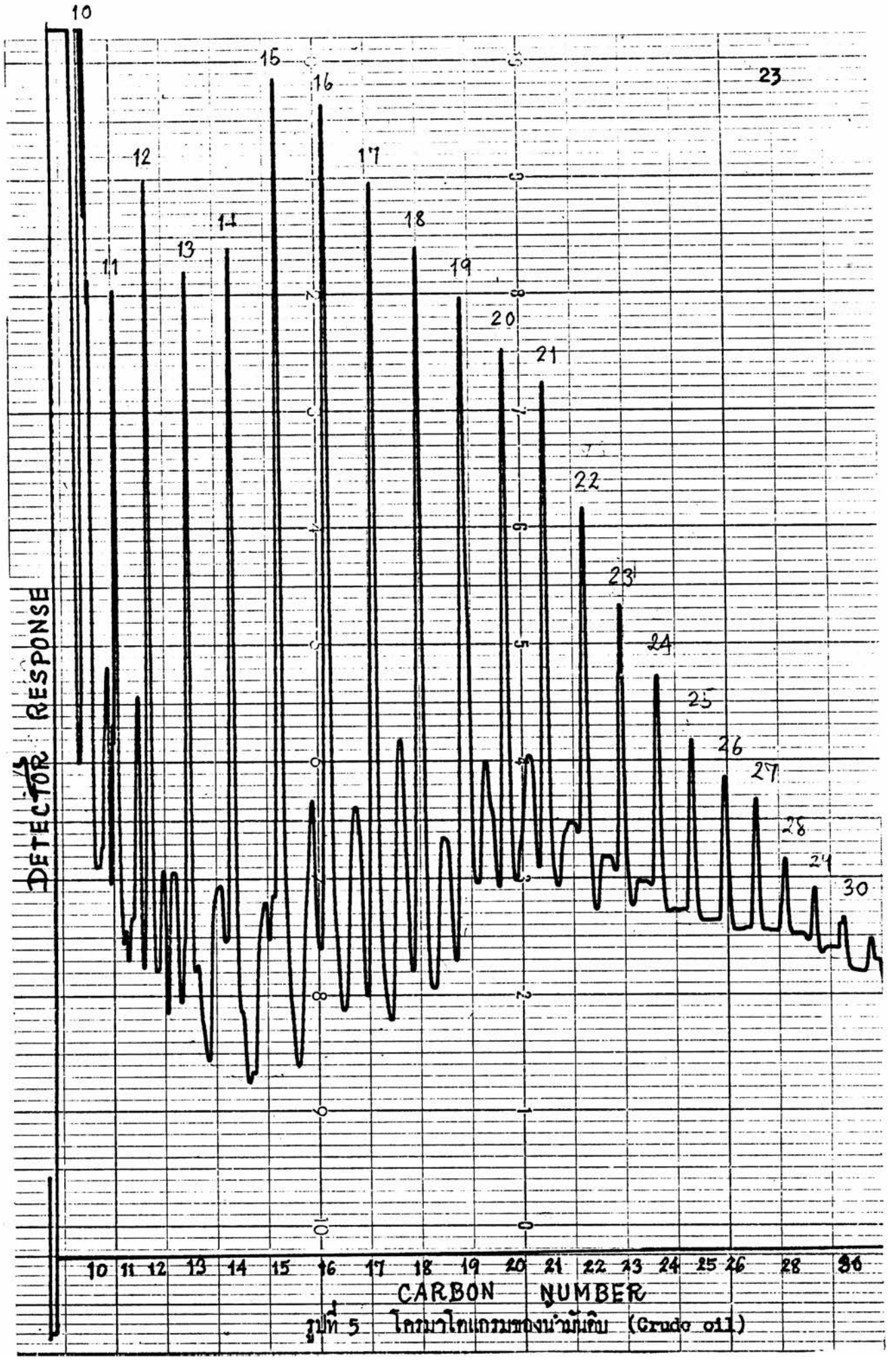
ก) วัดความสูง (Peak height measurement)

การวัดความสูงของ peak คือระยะทางจาก baseline ถึงจุดสูงสุดของ peak ดังรูป

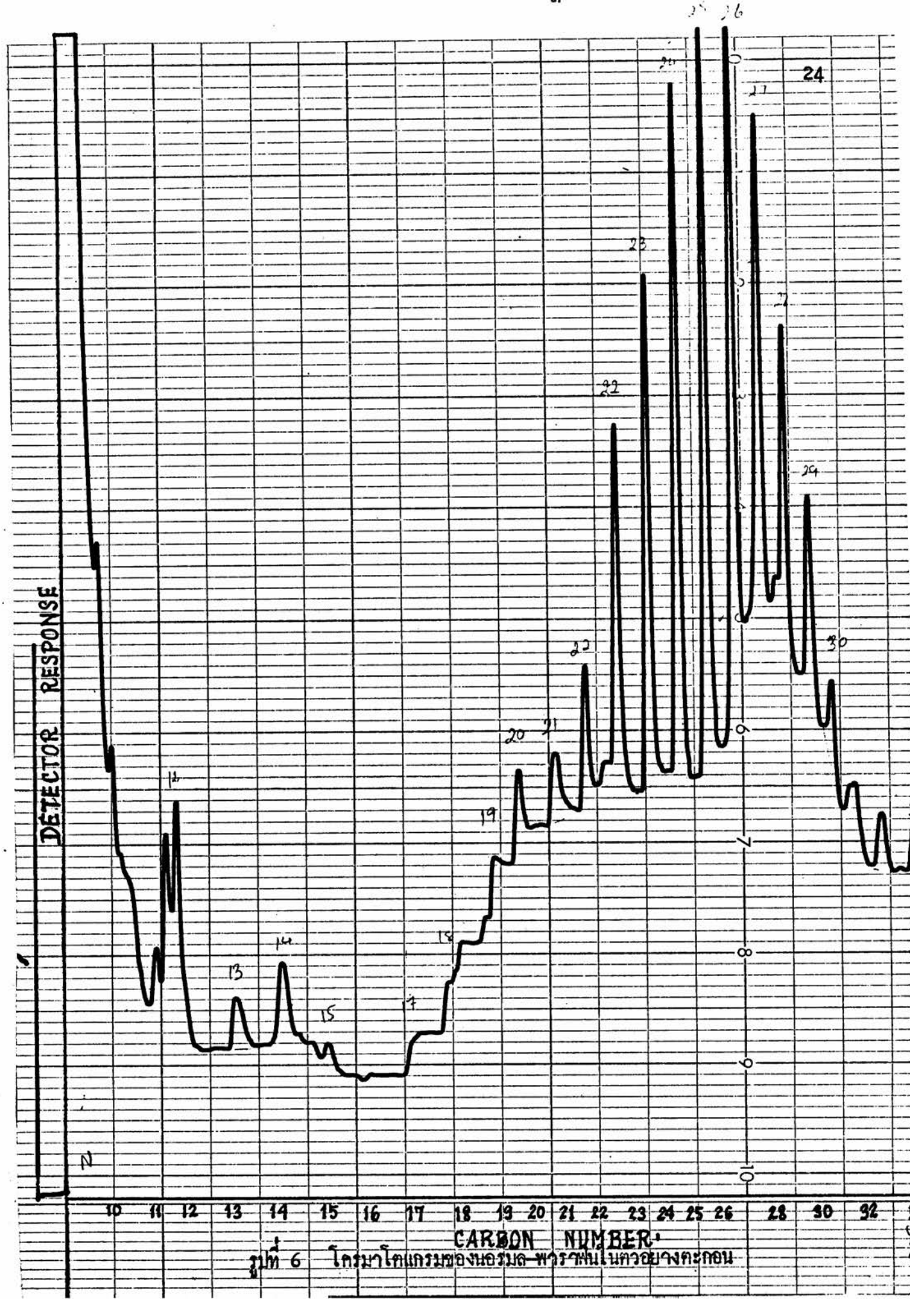
ความสูงของ peak จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่าง



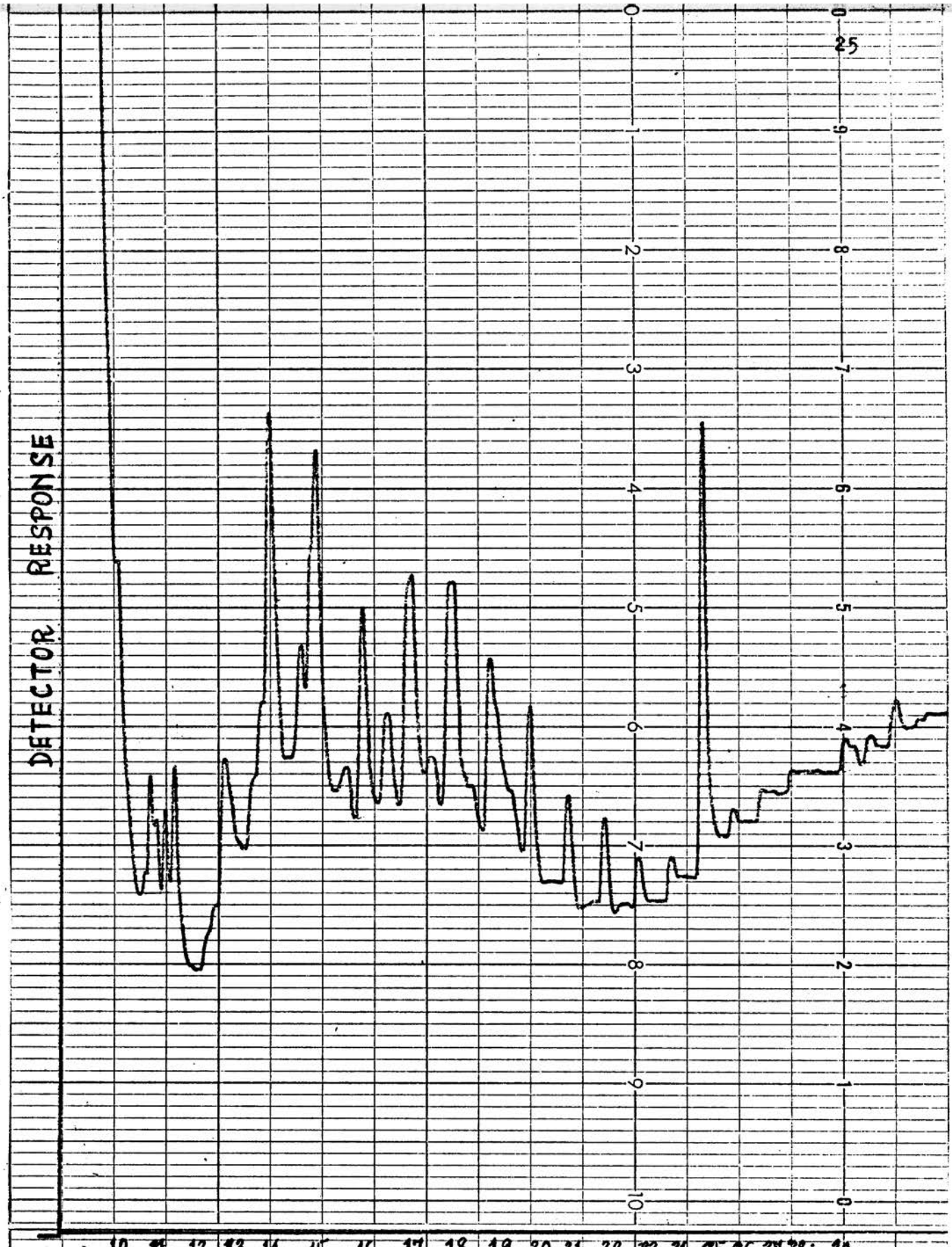
รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานนอร์มอล-พาราฟิน



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของน้ำมันดิบ (Crude oil)



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของเอสเทล-พาราฟินในตัวอย่างตะกอน

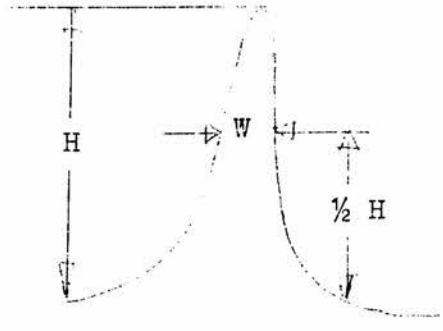


รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของนอรมัล–พาราฟินในตัวอย่างน้ำ

ในกรณี peak มีความกว้างการหาพื้นที่ใช้วิธี

ข) ความสูงคูณด้วยความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

(Height times width at half height)



พื้นที่ peak = H × W

4.3.3 การเทียบพื้นที่มาเป็นปริมาณสาร

สมมติพื้นที่ของสารมาตรฐาน = X cm^2

สารมาตรฐานมีปริมาณสาร = Y ug

พื้นที่ peak ของ ตัวอย่าง = Z cm^2

∴ ug ในตัวอย่าง = $\frac{Y}{X} \cdot Z$

5. การหาเปอร์เซ็นต์ recovery

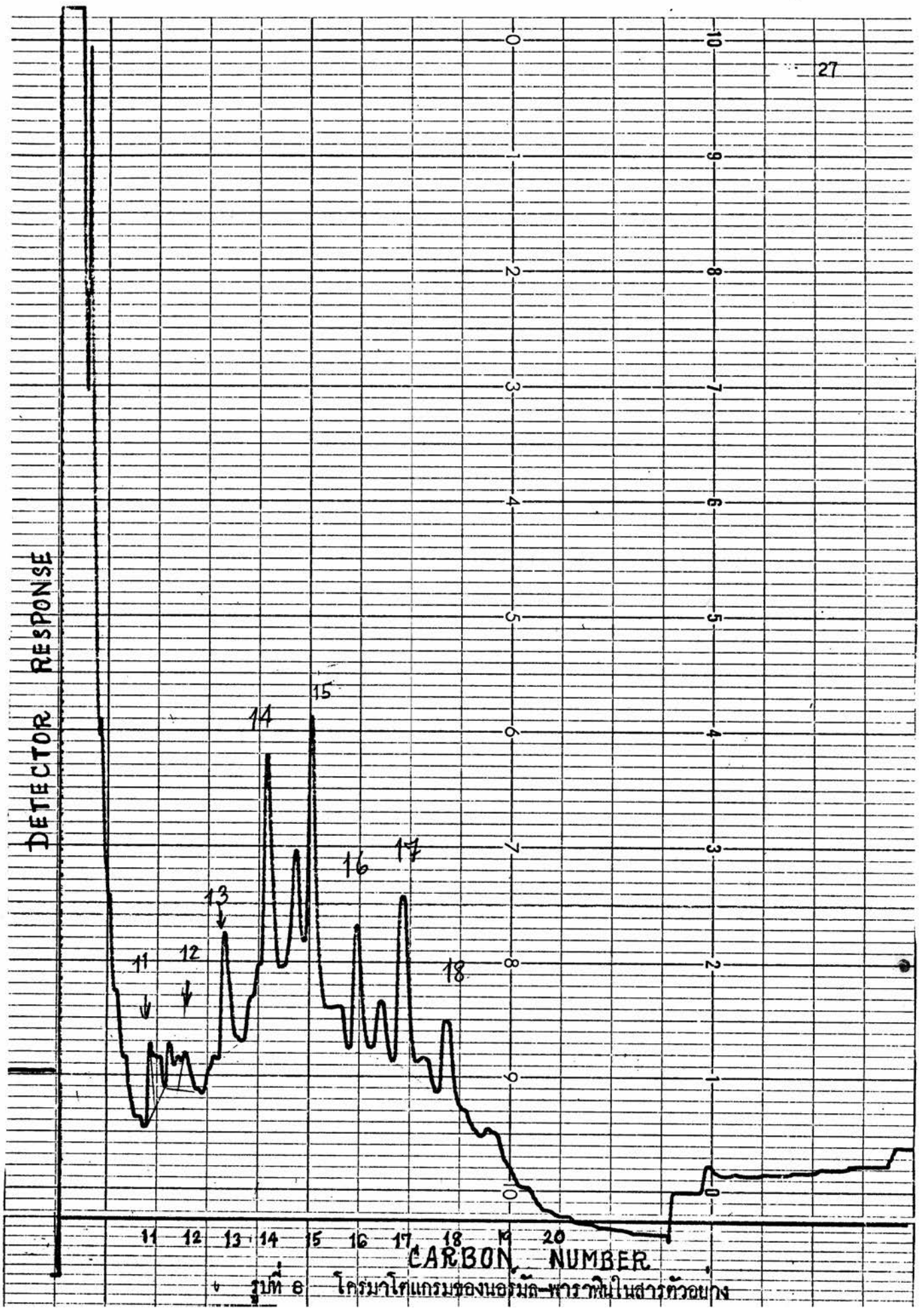
โดยเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปในตัวอย่าง ทำการทดลองเช่นเดียวกับเมื่อมีตัวอย่างเพียงอย่างเดียว แล้วคำนวณหาผลที่ทำได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยเทียบพื้นที่ได้ peak

สมมติตัวอย่างทำ recovery ได้ผลดังรูปที่ 8 และรูปที่ 9

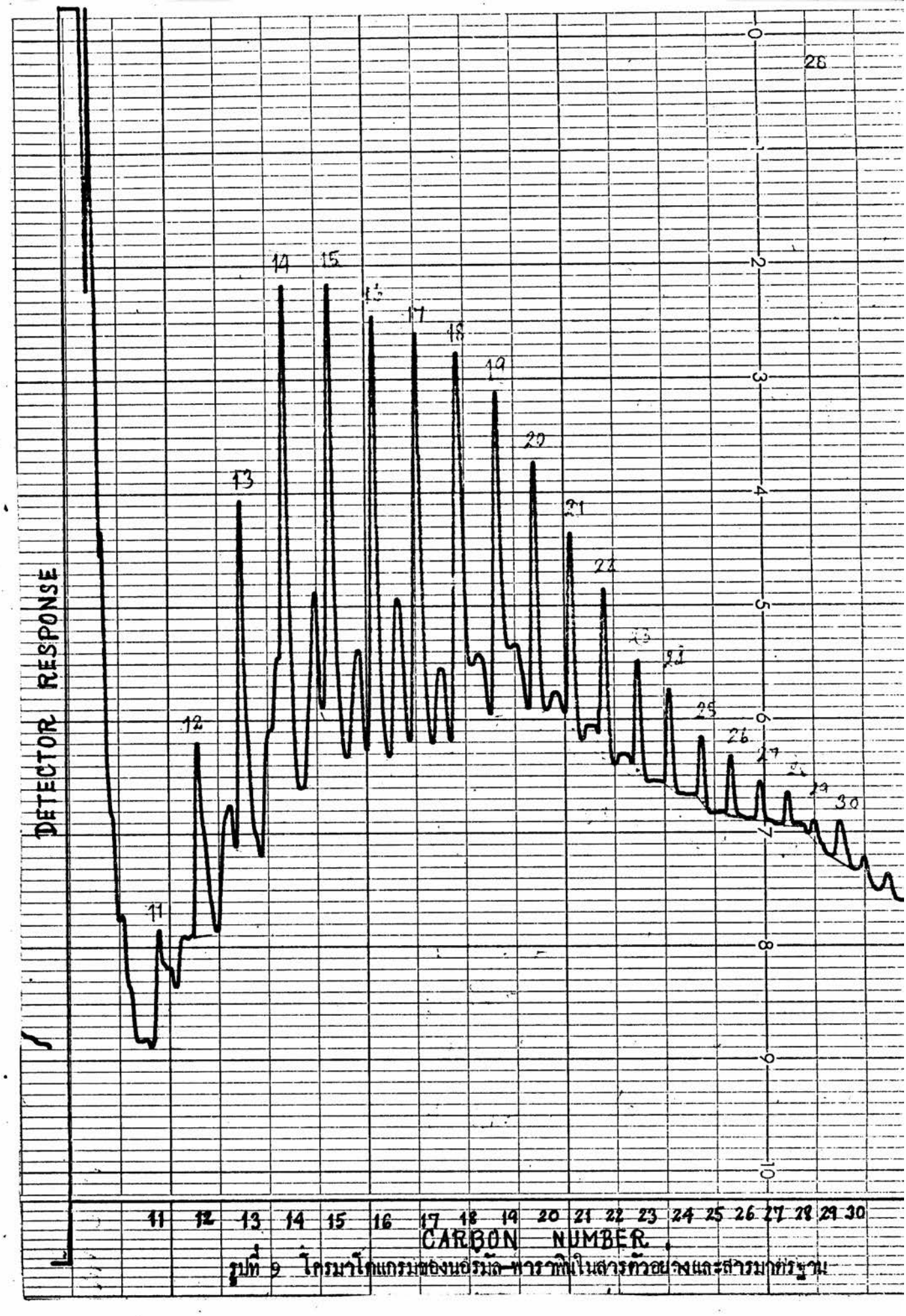
รูปที่ 8 สารตัวอย่างมีพื้นที่ได้ peak = A cm^2

รูปที่ 9 สารตัวอย่าง + สารมาตรฐาน มีพื้นที่ได้ peak = B cm^2

CHART NO. 413A P/N 71-000196-00 PRINTED IN U.S.A.



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของนอร์มัล-พาราฟินในสารตัวอย่าง



รูปที่ 9 โครมาโทแกรมของนอร์มัล-พาราฟินในสารทัวอย่างและสารมาตรฐาน

$\therefore$ สารมาตรฐานที่เติมลงไปมีพื้นที่ $= B-A \quad cm^2$

จากการทดลองหาสารมาตรฐาน พื้นที่ X cm^2 มีเนื้อสาร $= Y \quad \mu g$

$\therefore$ สารมาตรฐาน พื้นที่ B-A cm^2 มีเนื้อสาร $= \frac{Y}{X}(B-A) \ \mu g$

ถ้าปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป $= Z \quad \mu g$

$\therefore$ Z μg คิดเป็น % recovery $= 100$ %

$\therefore$ % recovery ที่ทำได้ $= \frac{100}{Z} \cdot \frac{Y}{X} \cdot (B-A)$

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ก) หาค่าเฉลี่ยของปริมาณสารในน้ำและตะกอน

$$\bar{X} = \frac{EX}{N}$$

$\bar{X}$ คือค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร

EX คือผลรวมของปริมาณสาร

N คือจำนวนตัวอย่าง

ข) หาความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

$$SD = \sqrt{\frac{NEX^2 - (EX)^2}{N(N-1)}}$$

SD คือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

EX คือผลรวมของปริมาณสาร

EX^2 คือผลรวมของปริมาณสารแต่ละตัวอย่างยกกำลังสอง

N คือจำนวนตัวอย่าง

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ค) ทดสอบความแตกต่างของปริมาณสารในแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตร

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)\, S_1^2 + (n_2 - 1)\, S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}\left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right]}}$$

$\bar{X}$ คือปริมาณเฉลี่ยของสาร

S_1^2 คือความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 1 $= (SD)^2$

S_2^2 คือความแปรปรวนของปริมาณสารกลุ่มที่ 2

n คือจำนวนตัวอย่างในกลุ่ม