

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่อง HPLC ประกอบขึ้นด้วยส่วนต่าง ๆ คือ

- Water™ 600s Controller ( Waters Corp., Milford, USA . )
- Water™ 616 Pump ( Waters Corp., Milford, USA . )
- Water™ 486 MS Tunable Absorbance Detector ( Waters Corp., Milford, USA . )
- Column :  $\mu$ Bondapak™ C18, 3.9 x 300 mm., 10  $\mu$ , Irregular.

3.1.2 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น HS 500 จากบริษัท Janke and Kunkel

3.1.3 พีเอชมิเตอร์

3.1.4 เครื่องชั่ง

3.1.5 ขวดแก้ว (serum bottle) ขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาอลูมิเนียม

3.1.6 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5, 10, 25, 100, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร

3.1.7 Volumetric Pipette ขนาด 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 มิลลิลิตร

3.1.8 Measuring Pipette ขนาด 0.1, 0.5, 1, 5, 10 มิลลิลิตร

3.1.9 Beaker ขนาด 25, 50, 150, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร

3.1.10 Flask ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร

3.1.11 ขวด vial ขนาด 2.5 dram

3.1.12 หลอดหยด

3.1.13 แท่งแก้วคน

3.1.14 ลูกลาย

3.1.15 กระจกนาฬิกา

3.1.16 กระดาษกรอง Whatman no.1

3.1.17 กรวยกรอง

### 3.2 สารเคมีสำหรับการวิจัย

#### 3.2.1 สารมาตรฐาน

- 2-chlorophenol (98%(HPLC)- practical grade,Fluka)
- 2,4-dichlorophenol (95%(HPLC)- practical grade,Fluka)
- 2,4,6-trichlorophenol (97%(GC)- practical grade,Fluka)

#### 3.2.2 ตัวทำละลาย

- Methanol HPLC grade (BDH Laboratory Supplies, Poole, BH15 1TD, England )

3.2.3  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (99% AR-grade, AJAX chemicals, Auburn, N.S.W.2144, Australia)

3.2.4 Citric acid (99% AR-grade, AJAX chemicals, Auburn, N.S.W.2144, Australia)

3.2.5 Hydrochloric acid, solution 37% (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

3.2.6 พวงเหล็กขนาด 10, 150  $\mu$  (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)

### 3.3 การเตรียมรีเอเจนต์

3.3.1  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M จำนวน 1000 มิลลิลิตร : ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  28.392 กรัม ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.2 Citric acid 0.1 M จำนวน 1000 มิลลิลิตร : ชั่ง Citric acid 21.014 กรัม ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.3 HCl 5% จำนวน 1000 มิลลิลิตร : เทกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.4 ความเข้มข้นของ 2-chlorophenol 1000 ส่วนในล้านส่วน (v/v) : ปิเปต 2-chlorophenol 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.5 ความเข้มข้นของ 2,4-dichlorophenol 1000 ส่วนในล้านส่วน (w/v) : ชั่ง 2,4-dichlorophenol 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.6 ความเข้มข้นของ 2,4,6-trichlorophenol 1000 ส่วนในล้านส่วน (w/v) : ชั่ง 2,4,6-trichlorophenol 1 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร



3.3.17 ความเข้มข้นของ 2,4-dichlorophenol 40 ส่วนในล้านส่วน : ปิเปตน้ำที่เตรียมจาก 2,4-dichlorophenol เข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วน ด้วย measuring pipet จำนวน 7 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.18 ความเข้มข้นของ 2,4,6-trichlorophenol 40 ส่วนในล้านส่วน : ปิเปตน้ำที่เตรียมจาก 2,4,6-trichlorophenol เข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วน ด้วย measuring pipet จำนวน 7 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.19 ความเข้มข้นของ 2-chlorophenol 50 ส่วนในล้านส่วน : ปิเปตน้ำที่เตรียมจาก 2-chlorophenol เข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วน ด้วย volumetric pipet จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.20 ความเข้มข้นของ 2,4-dichlorophenol 50 ส่วนในล้านส่วน : ปิเปตน้ำที่เตรียมจาก 2,4-dichlorophenol เข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วน ด้วย volumetric pipet จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.21 ความเข้มข้นของ 2,4,6-trichlorophenol 50 ส่วนในล้านส่วน : ปิเปตน้ำที่เตรียมจาก 2,4,6-trichlorophenol เข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วน ด้วย volumetric pipet จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

### 3.4 แผนและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.4.1 ขั้นตอนเตรียมการวิจัย

3.4.1.1 เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้ 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 50, 70, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.1.2 เตรียมผงเหล็ก เพื่อกำจัดออกไซด์และสารเคลือบผิวออกจากผงเหล็ก โดยล้างผงเหล็กด้วย 5% HCl 1 ชั่วโมง ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (deionized-water) ที่ไล่อากาศแล้ว 2-3 ครั้ง นำไปใส่ใน desiccator แล้วดูดอากาศภายใน desiccator ออกให้หมดโดยใช้ปั๊มดูดอากาศ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

3.4.1.3 เตรียมบัฟเฟอร์ โดยผสม 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  กับ 0.1M citric acid ดังตารางที่ 3.1 และวัดระดับพีเอชที่ได้ด้วยพีเอชมิเตอร์

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนของ 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  กับ 0.1M citric acid ที่ระดับพีเอช 4-8

pH	0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (ml)	0.1M citric acid (ml)
4	38.55	61.45
5	51.50	48.50
6	63.15	36.85
7	82.35	17.65
8	97.25	2.75

ที่มา : Lange's Handbook of Chemistry.

### 3.4.2 ชั้นวางแผนการทดลอง

กำหนดแผนการทดลองในการกำจัดสารประกอบคลอรีเนเตดฟีนอลออกจากน้ำเสียโดยออกแบบการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง คือชุดศึกษาระดับพีเอช, ชุดศึกษาขนาดอนุภาคของผงเหล็ก และชุดที่ศึกษาระยะเวลาสัมผัส

3.4.2.1 ชุดศึกษาระดับพีเอช ที่มีผลต่อการกำจัด 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol โดยระดับพีเอชที่ใช้ศึกษามี 5 ระดับ คือ 4, 5, 6, 7, 8

3.4.2.2 ชุดศึกษาขนาดอนุภาคของผงเหล็กที่มีผลต่อการกำจัด 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol โดยขนาดอนุภาคของผงเหล็กที่ใช้ศึกษามี 2 ขนาด คือ 10, 150 ไมครอน

3.4.2.3 ชุดศึกษาระยะเวลาสัมผัสที่มีผลต่อการกำจัด 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol โดยระยะเวลาสัมผัสที่ใช้ศึกษามี 8 เวลา คือ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 วัน  
(โดยแผนการทดลองทั้งหมดนี้ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละหน่วยการทดลอง )

### 3.4.3 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการออกแบบการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการกำจัดสารประกอบคลอรีเนเตดฟีนอล 3 ชนิด คือ 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol ซึ่งหมายความว่าถึงน้ำเสียที่สังเคราะห์จะมีเพียงองค์ประกอบเดียว ซึ่งจะไม่ใช้น้ำเสียที่มีไอออนตั้งแต่ 2 ชนิด

- 3.4.3.1 ใส่ผงเหล็ก 1 กรัม และ glass bead ลงในขวดซีรัม
- 3.4.3.2 เติมน้ำเสียที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แล้วลงไปขวดซีรัม ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาทันทีด้วย hycar septa
- 3.4.3.3 นำขวดซีรัมทั้งหมดไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) โดยเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาสัมผัสที่กำหนด เพื่อให้ผงเหล็กและน้ำเสียสัมผัสกันตลอดเวลา
- 3.4.3.4 เมื่อครบระยะเวลาสัมผัสที่กำหนดกรองของเหลวผ่านกระดาษกรองใส่ในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial bottle)
- 3.4.3.5 นำของเหลวที่กรองได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบคลอรีเนเตตฟีนอลโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ภายใต้สภาวะในตารางที่ 3.2 โดยวิธีสร้าง calibration curve ของพื้นที่ใต้พีกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, และ 2,4,6-trichlorophenol
- 3.4.3.6 นำพื้นที่ใต้พีกที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบคลอรีเนเตตฟีนอลที่ลดลงจาก calibration curve
- 3.4.3.7 ค่าความหาประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบคลอรีเนเตตฟีนอล
- 3.4.3.8 การทดลองในชุดควบคุมทำตามขั้นตอนที่ 3.4.3.1-3.4.3.7 แต่ไม่ใส่ผงเหล็ก

**ตารางที่ 3.2** แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Column	$\mu$ Bondapak <sup>TM</sup> C18, 3.9 x 300 mm., 10 $\mu$ , Irregular
Mobile Phase	Methanol / H <sub>2</sub> O
Flow Rate	1 ml/min.
Detector Wavelength	280 nm.
Injection Volume	20 $\mu$ l
Temperature	Ambient

ที่มา : NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), 1994

3.4.4 เลือกระดับพีเอช ระยะเวลาสัมพัทธ์ และขนาดอนุภาคของผงเหล็ก จากขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบคลอรีนเตตฟีนอลโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษแทนน้ำเสียสังเคราะห์

3.4.5. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบคลอรีนเตตฟีนอล โดยใช้

3.4.5.1 ANOVA ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบคลอรีนเตตฟีนอลที่ระดับพีเอช ขนาดอนุภาคของผงเหล็ก และระยะเวลาสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน

3.4.5.2 Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบคลอรีนเตตฟีนอลจากน้ำเสีย