บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องแก้ว ได้แก่ Volumetric flask, erlenmeyer flask, beaker, cylinder, watch glass, stirring rod, dropper, vial, column glass size 2 cm × 20 cm
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 และเมมเบรนไนลอน 66 ขนาด 0.20 ไมครอน
3. ขวดพลาสติกพร้อมฝา ขนาด 30 และ 1,000 มิลลิลิตร
4. ถุงพลาสติกซิปล็อค
5. ถังพลาสติกพร้อมฝา ขนาด 11 ลิตร
6. แกลลอนพร้อมฝา ขนาด 20 ลิตร
7. ตะแกรงร่อน ขนาด 10-20 เมช
8. Crucible
9. Desiccator
10. Micropipet; Rainin: G 0304887A
11. อ่าง Ultra Sonik™; NDI: 136H
12. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance); Denver Instrument Company
13. เครื่องวัดพีเอช (pH meter); Mettler Toledo: MP 225
14. เครื่องเขย่า (Shaker); IKA Labortechnik STAUFEN: KS 125B
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); Centurion: 1040
16. เครื่องร่อนตัวอย่าง; STS Soil Testing Siam Company Limited: TBSY-315
17. Rotary Evaporator; BUCHI Labortechnik AG
18. ตู้อบ (Hotair oven); Memmert: Model 600
19. เตาเผาอุณหภูมิสูง; NEY 6-525
20. เครื่องกลั่น (Distillation Apparatus); Gerhardt
21. เครื่องย่อย (Kjedatherm); Gerhardt
22. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extractor); Gerhardt
23. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย; Scientific Promotion: Fibramatic
24. เครื่อง Vis - Spectrophotometer; Spectronic instruments: GENESYS™

Prince of Songkla University Pattani Campus

25. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC); Hewlett-Packard: Agilent HP 1100
26. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR); MAGNA-IR 560 Spectrometer
27. เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM); JEOL: JSM-6480LV

3.2 ตัวอย่างและสารเคมี

1. ตัวอย่างสาหร่ายผักกาด *Ulva reticulata* เก็บจากแหลมตาชี อ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี
2. Phenol (C_6H_6O); Analytical Reagent Grade: Panrec Quimica SA
3. 4-Chlorophenol (C_6H_5ClO); Analytical Reagent Grade: Fluka
4. 2,4-Dichlorophenol ($C_6H_4Cl_2O$); Analytical Reagent Grade: Fluka
5. 4-Aminoantipyrine ($C_{11}H_{13}ON_3$); Analytical Reagent Grade: Fluka
6. Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$); Analytical Reagent Grade: Merck
7. Ammonium hydroxide (NH_4OH); Analytical Reagent Grade: J.T. Baker
8. Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4); Analytical Reagent Grade: APS Ajax Finechem
9. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4); Analytical Reagent Grade: Merck
10. Nitric acid (HNO_3); Analytical Reagent Grade: Lab-Scan Analytical Science
11. Sulfuric acid (H_2SO_4); Analytical Reagent Grade: Merck
12. Phosphoric acid (H_3PO_4); Analytical Reagent Grade: APS Ajax Finechem
13. Boric acid (H_3BO_3); Analytical Reagent Grade: Fisher Scientific
14. Hydrochloric acid (HCl); Analytical Reagent Grade: J.T. Baker
15. Gallic acid ($C_7H_6O_5$); HPLC Grade: Fluka
16. Sodium hydroxide (NaOH); Analytical Reagent Grade: Merck
17. Folin-Ciocalteu's reagent; Analytical Reagent Grade: BDH
18. Sodium carbonate (Na_2CO_3); Laboratory Reagent Grade: Fisher Scientific
19. Copper (II) sulphate ($CuSO_4$); Analytical Reagent Grade: APS Ajax Finechem
20. Methanol (CH_3OH); HPLC Gradient Grade: J.T. Baker
21. Methanol (CH_3OH); Analytical Reagent Grade: J.T. Baker
22. Acetonitrile (CH_3CN); HPLC Gradient Grade: Fisher Scientific
23. Acetone (CH_3COCH_3); Analytical Reagent Grade: Merck

Prince of Songkla University Pattani Campus

24. Ethanol (C_2H_5OH); Analytical Reagent Grade: Merck

25. Dichloromethane (CH_2Cl_2); Analytical Reagent Grade: Fisher Scientific

26. Petroleum ether; Analytical Reagent Grade: Lab-Scan Analytical Science

27. Potassium bromide (KBr); Analytical Reagent Grade: Merck

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายผักกาด *Ulva reticulata* ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 จากแหลมตาชี อ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี นำมาล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง ตามด้วยล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง ก่อนนำไปผึ่งให้แห้ง

3.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างสาหร่ายผักกาด *U. reticulata*

วิเคราะห์ปริมาณเถ้า ความชื้น ปริมาณโปรตีนและไนโตรเจน (Kjeldahl method) เยื่อใย (Digestion method) ไขมัน (Soxhlet extraction) ตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของ AOAC (2000) และสารประกอบฟีนอลรวม โดยวิธีสเปกโตรโฟโตมิตรี (Spectrophotometry) ตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของ APHA (1992)

3.3.3 ศึกษาการดูดซับสารประกอบฟีนอล โดยชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata* ในห้องปฏิบัติการแบบระบบกะ (Batch system)

3.3.3.1 การเตรียมสาหร่าย

นำตัวอย่างสาหร่ายที่ได้จากข้อ 3.3.1 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงในตู้อบ แล้วนำมาบดให้ละเอียด ก่อนนำไปร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 20 และ 10 เมช เก็บตัวอย่างสาหร่ายที่ร่อนแล้วในถุงพลาสติกซิปล็อค และเก็บใน desiccator

3.3.3.2 การเตรียมสารละลายฟีนอลมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้คือ ฟีนอล 4-คลอโรฟีนอล (4-CP) และ 2,4-ไดคลอโรฟีนอล (2,4-DCP) โดยเตรียมเป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution) ความเข้มข้น 1,000 mg/L (ในน้ำกลั่น) เก็บที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการศึกษาต่อไป

3.3.3.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล

1) ฟีนอล (Phenol) โดยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (ตามวิธีของ APHA, 1992)

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนอล โดยละลายฟีนอลในน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 mg/L นำสารละลายที่เตรียมได้ไปเติมสารละลาย 0.5

Prince of Songkla University Pattani Campus

N NH_4OH 0.65 mL ปรับ pH ให้เป็น 7.9 ± 0.1 ด้วย Phosphate buffer pH 6.8 แล้วเติมสารละลาย 4-Aminoantipyrine 0.25 mL เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นรีบเติมสารละลาย Potassium ferricyanide 0.25 mL ทันทีแล้วเขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 nm โดยใช้สารละลายแบลงค์ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ สารละลายแบลงค์คือ น้ำกลั่น 25 mL ซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน

สารละลายตัวอย่างทำการทดลองในทำนองเดียวกับสารละลายมาตรฐานแต่ใช้สารละลายตัวอย่างแทนฟีนอล นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณฟีนอลจากกราฟมาตรฐานที่พลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm กับความเข้มข้นของฟีนอล

2) 4-คลอโรฟีนอล (4-CP) และ 2,4-ไดคลอโรฟีนอล (2,4-DCP) โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

วิธีการวิเคราะห์ 4-CP และ 2,4-DCP ดัดแปลงจากวิธีของนินนาท์ (2539) เตรียมสารละลาย 4-CP และ 2,4-DCP เข้มข้น 1000 mg/L โดยละลาย 4-CP และ 2,4-DCP ใน 50 % methanol ปรับปริมาตรด้วย 50% methanol จนครบ 1 L แล้วเตรียมสารละลายมาตรฐาน 4-CP และ 2,4-DCP ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 mg/L นำสารละลายที่เตรียมได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C_{18} reverse phase Pinnacle II C_{18} (5 μm 250 × 4.6 mm) ตัวทำละลายคือ methanol : acetonitrile : DI water (30 : 30 : 40) อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 mL/min และใช้ Photodiode array (DAD) เป็นตัวตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 280 nm

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยนำสารละลายตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 6 นาที โดยใช้กรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยโดยใช้ Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C แล้วละลายสารที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย 50% methanol 5 mL และวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC นำค่าที่ได้มาหาปริมาณจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งพลอตระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้น

3.3.3.4 จลนศาสตร์ของการดูดซับสารประกอบฟีนอล โดยชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata*

นำตัวอย่างสาหร่ายบดที่อบแห้ง มาเติมสารละลายสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้นชนิดละ 15 mg/L ในขวดรูปชมพู่ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่เหลือ ณ เวลาต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 360 นาที, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กรอง และนำสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.3.5 ผลของ pH ต่อความสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอล โดยชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata*

นำตัวอย่างสาหร่ายบดที่อบแห้ง 0.1 g มาเติมสารละลายสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 5 mg/L สำหรับฟีนอล และ 10 mg/L สำหรับ 4-CP และ 2,4-DCP ที่มีค่า pH ต่างๆ กัน คือ 2-8 นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) เมื่อครบเวลา กรองสาหร่ายออก นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำค่า pH ที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองหัวข้อต่อไป

3.3.3.6 ผลของปริมาณชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata*

นำตัวอย่างสาหร่ายบดที่อบแห้งปริมาณต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 g/L มาเติมสารละลายสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 10 mg/L นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) เมื่อครบเวลา กรองตัวอย่างสาหร่ายออก นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง นำค่าปริมาณชีวมวลสาหร่ายที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองหัวข้อต่อไป

3.3.3.7 ผลของความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล

นำตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้งปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.6 มาเติมสารละลายสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.5 ในความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5-30.0 mg/L นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) เมื่อครบเวลา กรองตัวอย่างสาหร่ายออก นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตร-โฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

จากข้อมูลที่ได้นำมาหาความสามารถสูงสุดในการดูดซับสารประกอบฟีนอลตามกลไกการดูดซับของ Langmuir และ Freundlich isotherms

3.3.3.8 ศึกษากระบวนการ Sorption-Desorption

ทำการทดลองกระบวนการดูดซับ (Adsorption) โดยนำตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้งปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.6 มาเติมสารละลายสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.5 ในความเข้มข้น 10 mg/L สำหรับฟีนอล และ 15 mg/L สำหรับ 4-CP และ 2,4-DCP นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) เมื่อครบเวลา กรอง นำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตัวอย่างชีวมวลสาหร่ายที่ผ่านกระบวนการดูดซับ หลังการกรองนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C ทำการชะ (Desorption process) สารประกอบฟีนอลที่ค้างอยู่ในสาหร่ายโดยแช่ในสารละลายชนิดต่างๆ คือ 30% methanol, 30% ethanol, 30% acetone, 1.0, 3.0 และ 6.0 M NaOH, 1.0, 3.0 และ 6.0 M NH_4OH, 1.0, 3.0 และ 6.0 M HNO_3, 1.0, 3.0 และ 6.0 M CH_3COOH และ H_2O ปริมาตร 3 mL นำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (29.0 ± 1.0°C) เมื่อครบเวลากรอง นำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.4 ศึกษาการดูดซับสารประกอบฟีนอล โดยชีวมวลสาหร่ายผักกาด *Ulva reticulata* ในห้องปฏิบัติการแบบระบบต่อเนื่อง (Continuous flow system)

บรรจุตัวอย่างสาหร่ายที่อบแห้งในคอลัมน์แก้วเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm ความยาว 20 cm ให้ได้ความสูงประมาณ 10-15 cm จากนั้นผ่านสารละลายสารประกอบฟีนอลความเข้มข้น 10 mg/L สำหรับฟีนอล และ 15 mg/L สำหรับ 4-CP และ 2,4-DCP ที่ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.5 ลงในคอลัมน์ ปรับอัตราการไหลของสารละลายประมาณ 1.5 mL/min และเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ทุกๆ 10 mL แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี และ 4-CP และ 2,4-DCP โดย HPLC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.3.5 ศึกษาสมบัติบางประการของชีวมวลสาหร่ายผักกาด *Ulva reticulata*

3.3.5.1 หมู่ฟังก์ชันของสารองค์ประกอบบนพื้นผิวของชีวมวลสาหร่าย

ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสารองค์ประกอบบนพื้นผิวของตัวอย่างสาหร่าย โดย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) ด้วยเทคนิค KBr-pellet (แม้นและอมร, 2535) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1) นำ KBr (AR grade) มาอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บใน desiccator ที่ใส่ P_2O_5 หรือใส่ซิลิกาเจลไว้

2) นำชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata* ทั้งที่ไม่ผ่านกระบวนการดูดซับและผ่านการดูดซับสารประกอบฟีนอลทั้ง 3 ชนิด มาอบที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บใน desiccator จากนั้นใช้ตัวอย่างสาหร่ายผักกาด *U. reticulata* ปริมาณ 2 mg ที่อบแห้ง ผสมกับ KBr 100-200 mg ในโกร่งอะเกต แล้วบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องอัด (die) และควรอัดตัวอย่างประมาณ 3-4 นาที จึงนำตัวอย่างที่เป็น pellet ใสบางออกมาใส่ลงใน disc holder แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.5.2 สภาพพื้นผิวของชีวมวลสาหร่าย

ศึกษาสภาพพื้นผิวของตัวอย่างชีวมวลสาหร่าย โดย Scanning Electron Microscope (SEM) นำชีวมวลสาหร่ายผักกาด *U. reticulata* ทั้งที่ไม่ผ่านกระบวนการดูดซับและผ่านการดูดซับสารประกอบฟีนอลทั้ง 3 ชนิด มาอบที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บใน desiccator จากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยใช้หลักไฟฟ้าสถิตย์ โดยติดแผ่นคาร์บอนบน stub นำชิ้นตัวอย่างสาหร่ายผักกาด ที่อบไว้ ที่มีขนาดเล็กประมาณ 1 cm^3 มาวางบน stub ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปเคลือบทองเป็นเวลา 120 วินาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM

3.3.6 ศึกษาความสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลจากน้ำเสียโรงงานไม้ยางพารา โดยชีวมวลสาหร่ายผักกาด

ใช้ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานไม้ยางพารา “เอกสยามพาราวูด” อ. นาทวี จังหวัดสงขลา จากแทงก์ที่รองรับน้ำยาอบเนื้อไม้ยางพาราที่ใช้แล้ว เก็บรักษาตัวอย่างน้ำเสียด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ได้ pH เท่ากับ 4 แล้วเก็บในถังน้ำแข็งก่อนนำมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีในห้องปฏิบัติการ

3.3.6.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของน้ำเสีย

วิเคราะห์ สี กลิ่น อุณหภูมิ pH TSS และ COD ตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของ APHA (1992)

3.3.6.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียโรงงานไม้ยางพารา โดยวิธีสเปก-โตรโฟโตเมตรี (ตาม APHA, 1992)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยการเติม 4-Aminoantipyrine และ Potassium ferricyanide นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำเสีย

วิเคราะห์ปริมาณ 4-CP และ 2,4-DCP โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของนินนาท์ (2539)

3.3.6.4 ศึกษาความสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียโรงงานไม้ยางพาราโดยชีวมวลสาหร่าย *U. reticulata* แบบระบบกะและระบบต่อเนื่อง ตามวิธี APHA (1992) ดังอธิบายในข้อ 3.3.3.3 ข้อ 2)

ดำเนินการทดลองแบบระบบกะ ตามวิธีการในข้อ 3.3.3 และดำเนินการทดลองแบบระบบต่อเนื่อง ตามวิธีการในข้อ 3.3.4

Prince of Songkla University Pattani Campus