บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

Standard Analytical grade

- β- Carotene (Fluka)

สารเคมีประเภท, HPLC grade

- *n*-Hexane (J.T. Baker)
- Acetonitrile (Lab scan)
- Methanol (J.T. Baker)

สารเคมีประเภท Laboratory grade

- Potassium hydroxide
- Sodium chloride
- Sodium sulphate (RANKEM)
- Potassium dichlomate
- Sulfuric acid
- Silver sulphate
- Mercuric sulphate
- Ammonium ferrous sulphate
- 1,10-Phenanthroline monohydrate
- Ferric sulphate

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่อง Liquid-Liquid Extraction (QVF, CTS7)
- เครื่อง Rotary evaporator (BÜCHI, Rotavapor R-200)
- เครื่อง UV-Vis spectrometer (LIBRA, S22)
- เครื่อง HPLC (Agilent, HP 1100)

- เครื่อง GC (Shimadzu, GC-14A)
- เครื่อง FTIR (Nicolet, Magna 560)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Denver Instrument, TR-6101)
- เครื่อง Viscometer (HAAKE, viscotester 6R)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสกัดในระดับห้องปฏิบัติการและการสร้างกราฟมาตรฐาน

ก. เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันพืชบริสุทธิ์ ต.บ้านพรุ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลาและตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานตรังน้ำมันปาล์ม ต.นาเมืองเพชร อ.สิเกา จ.ตรัง
เก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 10 ครั้ง ช่วงเวลาตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2552-เมษายน 2553 (กำหนดตัวอย่าง POME คือ C1-C4, S1-S6 โดย C1-C4 และ S1-S5 เป็นการเก็บตัวอย่าง POME จากโรงงานน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จ.สงขลา และ S6 เป็นการเก็บตัวอย่าง POME จากโรงงานตรังน้ำมันปาล์ม จ.ตรัง

ข. การศึกษาสมบัติโดยทั่วไปของ POME การทดลองทำ 3 ซ้ำ
การศึกษาสมบัติโดยทั่วไปของ POME ประกอบด้วย

- การหาความหนาแน่น ทำโดยการตวง POME จำนวน 5.0 mL ด้วยกระบอกตวงขนาด 10 mL ชั่งหาน้ำหนักที่อุณหภูมิห้อง รายงานความหนาแน่นในหน่วย g/mL

- การหาความหนืด ทำโดยการตวง POME จำนวน 100 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 mL วัดด้วยเครื่องวัดความหนืดที่ 100 rpm, %sp = 2.0 รายงานค่าในหน่วย centriPoint (cP)

- การหา solid suspension ทำโดยการตวง POME จำนวน 20 mL กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Watman) ที่อบแห้งแล้ว กรองแบบลดความดัน และอบของแข็งที่กรองได้ในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งให้เย็นในเดสซิเคเตอร์แล้วจึงชั่วน้ำหนัก

ค. การสกัดหาปริมาณไขมันทั้งหมดใน POME การทดลองทำ 3 ซ้ำ

- ใช้ POME 100 mL ใส่ในกรวยแยก สกัดตัวทำละลายเฮกเซนครั้งละ 100 mL จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำการสกัดเป็นเวลา 5 นาที
- แยกส่วนของเฮกเซนออก ดูดน้ำออกจาก ด้วย Na_2SO_4 เป็นเวลา 30 นาที
- ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator
- นำไปชั่งน้ำหนักน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณไขมันและแคโรทีนทั้งหมด

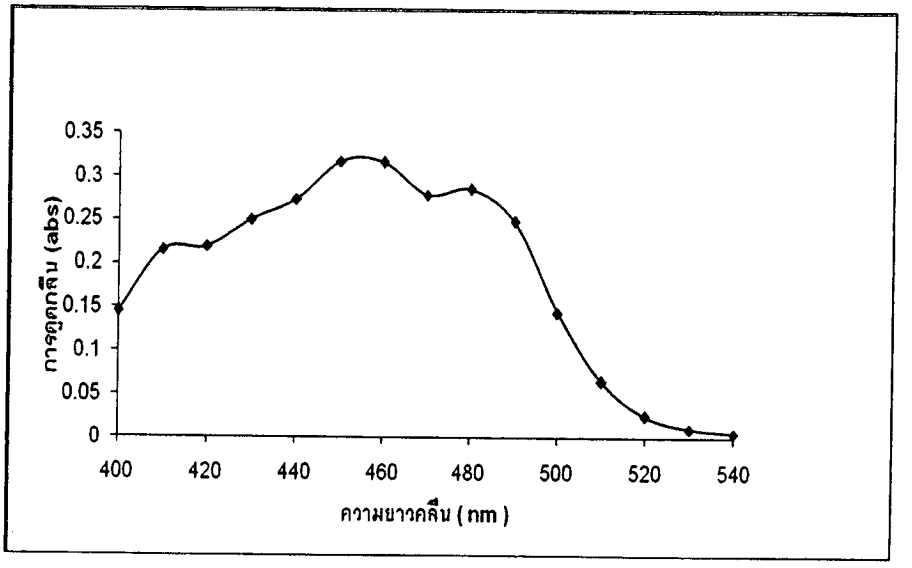
ง. การสกัดเพื่อแยกไตรกลีเซอไรด์ออกจากไขมันโดยการทำ Saponification เพื่อวิเคราะห์หาแคโรทีน

- ชั่งไขมัน 0.1 g ละลายด้วยเฮกเซน 30 mL
- สกัดด้วย 10% KOH in methanol 30 mL
- นำชั้นเฮกเซนที่สกัดได้ไปล้างด้วยสารละลาย 10% NaCl 2 ครั้งๆ ละ 20 mL
- ไขชั้นของเฮกเซนออกแล้วนำไปดูดน้ำออกด้วย Na_2SO_4 เป็นเวลา 30 นาที
- กรองเอาชั้นของเฮกเซนไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ crude carotene นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแคโรทีนและเบต้า-แคโรทีนต่อไป

จ. วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนจากไขมันที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer

การดูดกลืนแสงของแคโรทีนช่วงความยาวคลื่น 400-540 nm ดังรูปที่ 3.1

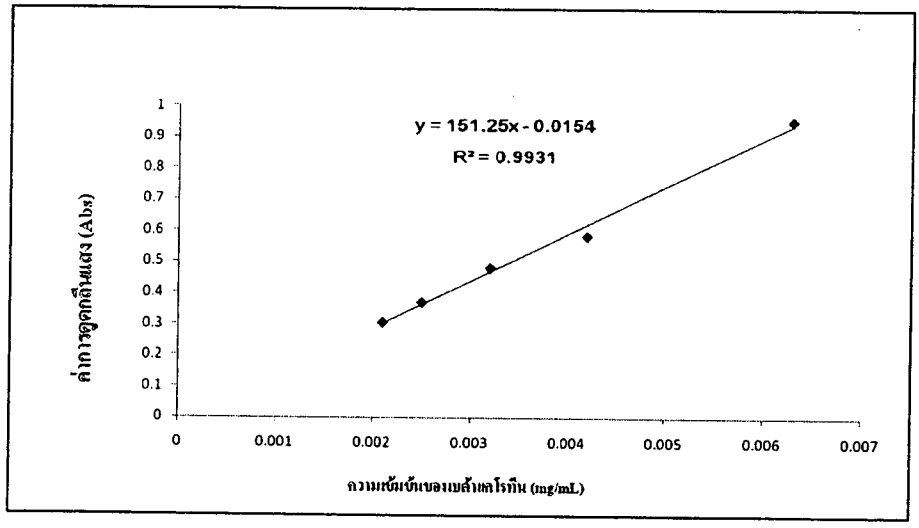
- ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุดที่ 450 nm



รูปที่ 3.1 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆของแคโรทีน

สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความเข้มข้นของแคโรทีนใช้ค่าความยาวคลื่น 450 nm

- เตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนให้มีความเข้มข้น 0.332 mg/mL
- นำสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนที่มีความเข้มข้น 0.332 mg/mL มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0013, 0.0016, 0.0019, 0.0027, 0.0033 mg/mL วัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrometer

การวิเคราะห์ตัวอย่าง การทดลองทำ 3 ซ้ำ

- นำไขมันและแคโรทีนที่สกัดได้จากน้ำทิ้ง (POME) มา 3 mL
- ปรับปริมาตรให้ได้ค่าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน (ปรับปริมาตรเป็น 15 mL ด้วย hexane)
- นำสารละลายที่เจือจางให้ความเข้มข้นลดลงไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแคโรทีนต่อไป

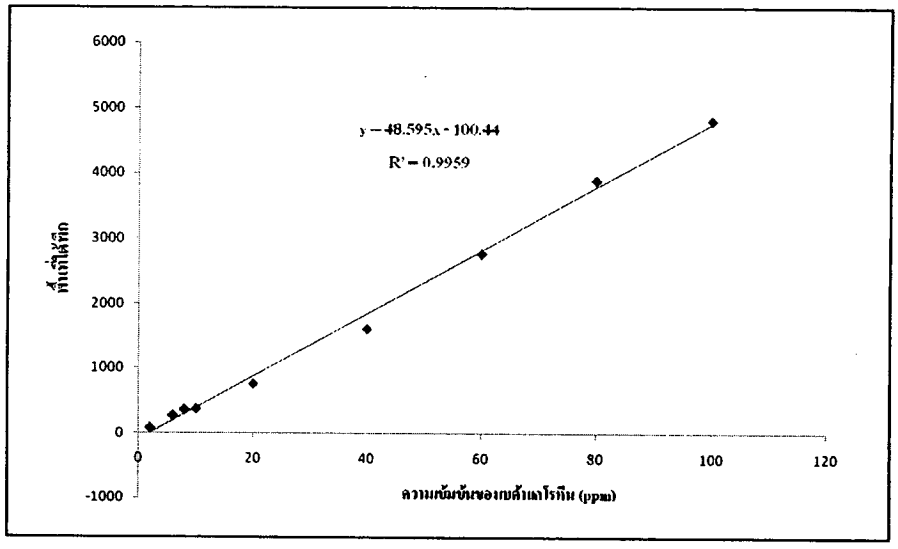
ฉ. วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนจากไขมันที่สกัดได้ด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC

- อัตราส่วนของตัวทำละลายใช้ Acetonitrile : Methanol (70:30, vol/vol)
- Flow rate ที่ใช้ คือ 1.5 mL/min
- Injection volume เท่ากับ 10 μL
- ความยาวคลื่นที่ใช้ คือ 450 nm, UV-Vis detector

สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณ β-carotene ในไขมันที่สกัดได้จากน้ำทิ้ง

- เตรียมความเข้มข้นของ standard β-carotene ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 455 ppm
- นำ standard β-carotene ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 455 ppm มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm สร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ตัวอย่าง การทดลองทำ 3 ซ้ำ

- นำสารละลายที่ผ่านการสกัดไตรกลีเซอไรด์ออกด้วยปฏิกิริยา saponification ใส่ในขวด vial และไล่ตัวทำละลายออกโดยการ flow แก๊สไนโตรเจนเข้าไปใน vial จนตัวทำละลายระเหยออกไปหมด
- นำแคโรทีนที่แห้งติดข้างขวด vial มาละลายด้วย 100% Methanol ให้มีความเข้มข้นประมาณ 100 ppm หรือปรับปริมาตรให้ได้ค่าที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งต้องมีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

3.2.2 การหาค่าการละลายของสาร 3 ชนิด ใน 2 วัฏภาค

ก. การเตรียม POME ที่ปราศจากไขมัน

- POME จากการทดลองสกัดไขมันแล้ว นำมาสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนจนไม่มีไขมันเหลือ นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อไล่เฮกเซนออกจนหมด (POME-UO)
- ชั่งไขมันที่สกัดได้จาก POME ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 50 mL ปริมาณรวมดังตารางที่ ข5
- เติม POME-UO ปริมาตร 20 mL และเฮกเซน 20 mL ลงในขวด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที
- ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนให้แยกชั้น
- นำส่วนบนซึ่งเป็นส่วนเฮกเซนไปวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยการตวงปริมาตร 2.0 mL ใส่ลงในอะลูมิเนียมแผ่นบางรูปถ้วย อบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ แล้วจึงชั่งน้ำหนักหาปริมาณไขมันที่อยู่ในชั้นเฮกเซน

- นำชั้นเฮกเซนไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR เพื่อหาปริมาณน้ำ
- นำชั้นน้ำวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC เพื่อหาปริมาณเฮกเซน
- ปริมาณไขมันมันในชั้นน้ำหาได้จากปริมาณไขมันที่เติมลงไปลบด้วยไขมันในชั้นเฮกเซน

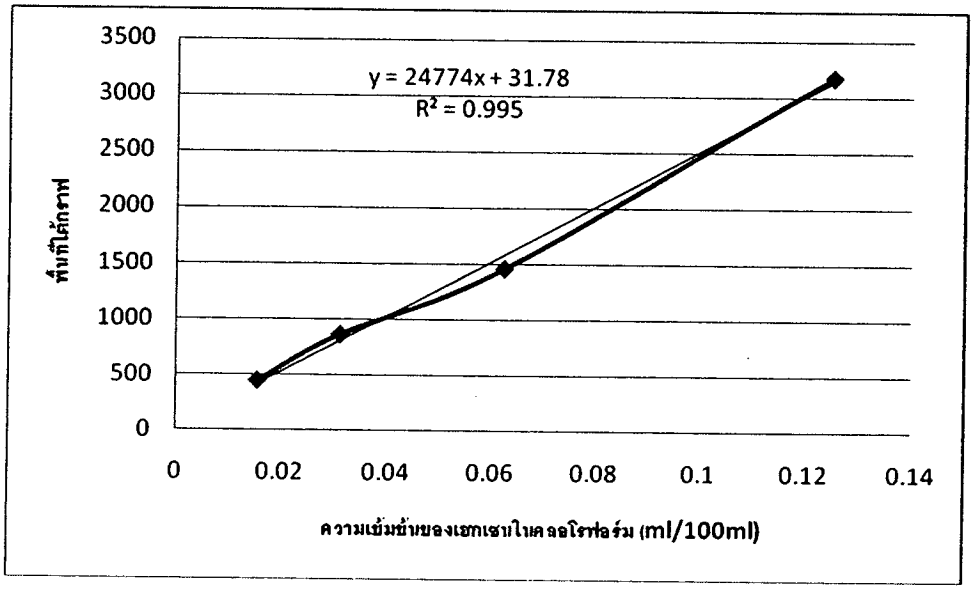
ข. การวิเคราะห์เฮกเซนด้วยเครื่อง GC

สภาวะของการวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเซนด้วยเครื่อง GC

- Column ชนิด capillary HP-5 (100 °C)
- ไนโตรเจนเป็นแก๊สพา ความดัน 0.2 psi
- Injection volume เท่ากับ 2 µL สำหรับ standard และ 3 µL สำหรับตัวอย่าง
- Injector (140 °C)
- FID เป็นตัวตรวจวัด (140 °C)

สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณเฮกเซนในชั้นน้ำ

- เตรียมความเข้มข้นของเฮกเซนในคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 0.125, 0.0625, 0.03125 และ 0.015625 mL ต่อ 100 mL ของสารละลาย สร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 3.4
- Inject ตัวอย่าง 3 µL เทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐาน

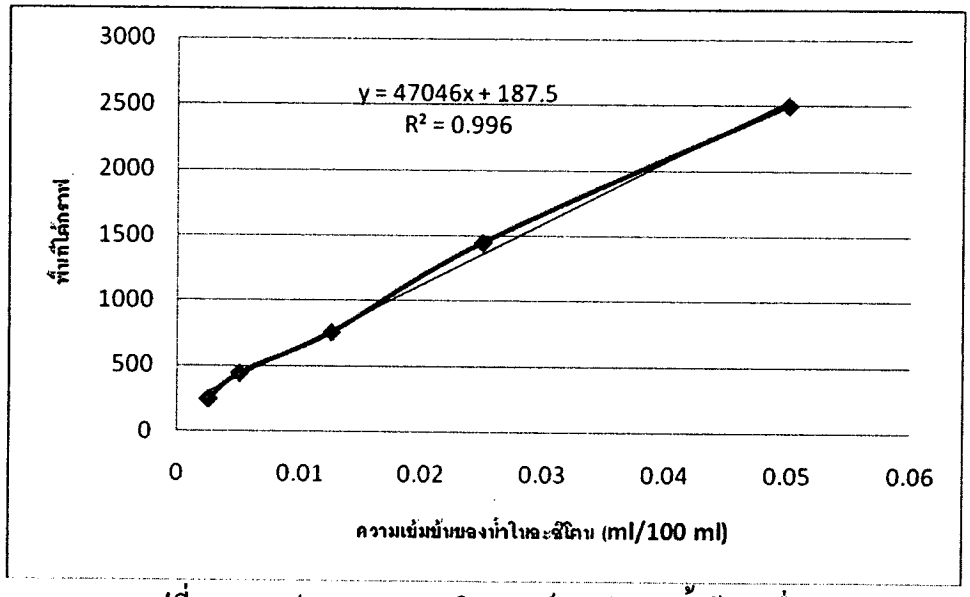


รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเซนด้วยเครื่อง GC

ค. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำด้วยเครื่อง FTIR

สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำในชั้นเฮกเซน

- เตรียมความเข้มข้นของน้ำในอะซีโตนความเข้มข้น 0.05, 0.025, 0.0125, 0.005 และ 0.0025 mL ต่อ 100 mL ของสารละลาย บรรจุในเซลล์ KBr ความกว้างของช่อง 0.5 mm วัดการดูดกลืนแสงและคำนวณพื้นที่ใต้กราฟช่วงเลขคลื่น 3100-4000 cm^{-1} สร้างกราฟมาตรฐานได้ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำด้วยเครื่อง FTIR

3.2.3 การแยกแคโรทีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography)

ก. ต่อชุด Quick Column Chromatography เข้ากับปั๊มสุญญากาศ จากนั้นบรรจุซิลิกาเจลชนิด TLC grade โดยบรรจุให้ผิวหน้าแน่นและเรียบเสมอกันมีความสูงประมาณ 4-5 cm ใน sinter glass ขนาด 60 mL

ข. นำ crude oil ที่มี carotene มาละลายด้วย hexane เล็กน้อยบรรจุลงในคอลัมน์ให้เรียบบนผิวหน้าของซิลิกา

ค. ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย hexane ต่อเนื่องกันตลอดการทดลอง

ง. รองรับสารถูกชะออกมาแต่ละส่วนด้วยขวดก้นกลมครั้งละ 15 mL

จ. เมื่อสารสีเหลืองถูกชะจนหมด ตรวจสอบด้วย TLC เพื่อทำการรวมส่วนของ carotene ที่แยกออกจาก column เมื่อรวมส่วนของสารที่มีแคโรทีน แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

ฉ. วิเคราะห์แคโรทีนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer เทียบกับสารมาตรฐาน

3.2.4 การสกัดในระดับกึ่งอุตสาหกรรมด้วยเครื่อง Liquid-Liquid Extraction รุ่น CTS7

วิธีดำเนินการ

การสกัดไขมันและแคโรทีนจาก POME ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม โดยใช้เครื่อง Liquid-Liquid Extraction QVF (CTS7)

- บรรจุ POME จำนวน 40 L ลงใน Feed vassel ชนิด Heavy phase

- บรรจุ Hexane จำนวน 40 L ลงใน Feed vassel ชนิด Light phase

- ปิดปั๊ม Feed hexane และเปิดปั๊มสำหรับ Feed POME เข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการ Feed = 15 L/hr จนกระทั่ง POME อยู่ต่ำกว่าระดับจุดปล่อย Hexane เข้าสู่คอลัมน์ประมาณ 10 cm จึงปิดปั๊ม

- ปิดปั๊ม Feed POME และเปิดปั๊มสำหรับ Feed Hexane เข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการ Feed = 15 L/hr จนกระทั่ง Hexane เริ่มไหลออกจากคอลัมน์ลงสู่ Collecting vassel จึงปิดปั๊ม

- ตั้งอัตรา Feed POME, Feed Hexane, Stroke และ Frequency (ตารางที่ 3.1 ตัวอย่าง S2, ตารางที่ 3.2 ตัวอย่าง S5 และตารางที่ 3.4 ตัวอย่าง S6)

- เมื่อเปิดปั๊มและการกระแทก (Stroke) ให้ปรับระดับการไหลออกของ POME (Raffinate) โดยการปรับเลื่อนขึ้น-ลงของจุดปล่อยออกเพื่อรักษาระดับที่จุดรอยต่อ (interface) ของ POME และ Hexane ให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าจุดปล่อยเข้าของ Hexane ระหว่าง 5-10 cm

- เมื่อปรับอัตราการไหลของราฟฟีแนตและเอกซ์แทรคจนระดับรอยต่อของสารคงที่แล้ว จึงปล่อยให้การสกัดดำเนินไปเป็นเวลาประมาณ 10 นาที ซึ่งการสกัดต้องดำเนินไปอย่างต่อเนื่องและคงที่

- สังเกตลักษณะของสารระหว่างที่ทำการสกัด โดยสังเกตจากขนาดของ droplet ของ POME ที่ไหลผ่าน plate การตกค้างที่ plate ลักษณะการเคลื่อนที่และการเกิด emulsion ที่รอยต่อ (interface) ระหว่างสารทั้งสอง

- เมื่อการสกัดผ่านไปเป็นเวลาประมาณ 10 นาที จึงทำการเก็บตัวอย่าง Hexane (Extract) จากจุดไหลออก เก็บตัวอย่างในปริมาณ 125 mL และ POME (Raffinate) เก็บตัวอย่างในปริมาณ 125 mL จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 4 นาที แล้วจึงปรับเปลี่ยนอัตราการ Feed, Pulse และ Frequency เป็นสภาวะอื่นต่อไป

- เมื่อการดำเนินไปของการสกัดคงที่สม่ำเสมอเป็นเวลา 10 นาที จึงเก็บตัวอย่างในทำนองเดียวกันกับการทดลองข้างต้น

3.2.4.1 การศึกษาลักษณะสารผสมระหว่างการสกัดโดยการสังเกตขนาด droplet ของPOME บน sieve plate (ตัวอย่าง S2)

ตารางที่ 3.1 สภาวะการสกัด POME ด้วยเครื่อง CTS7 เพื่อศึกษาลักษณะ droplet ของ POME บน sieve plate

สภาวะการทดลองที่	Feed-POME (L/hr)	Solvent-Hexane (L/hr)	Pulse (mm)	Frequency (%)
1	5	10	5	30
2	15	10	5	30
3	10	10	5	30
4	12	10	5	30
5	5	10	20	90
6	12	10	20	90
7	12	10	10	90
8	12	10	10	15
9	12	10	10	45
10	12	10	5	90
11	12	10	5	30

3.2.4.2 การศึกษาปริมาณไขมันที่สกัดได้และที่เหลือในน้ำทิ้ง (ตัวอย่าง S5)

ตารางที่ 3.2 สภาวะการสกัด POME เพื่อเปรียบเทียบการสกัดตามทฤษฎี

Condition	POME (L/hr)	Hexane (L/hr)	Pulse (mm)	Frequency (%)
1	12	10	5	30
2	15	15	10	30
3	15	20	10	30
4	10	15	5	30
5	10	15	10	30

ตาราง 3.3 การเปรียบเทียบค่าต่างๆ ของสภาวะเครื่อง CTS7

Feed-POME (L/hr)*	Flow-POME (kg/hr)*	Feed-Hexane (L/hr)**	Flow-Hexane (kg/hr)**	Frequency (%)***	Frequency*** (strokes/min)
5	8.48	5	5.83	20	30
10	18.53	10	19.4	40	60
15	23.69	15	26.85	60	90
				80	120
				100	150

***, **, *** ค่าที่ตั้งตามตัวเลขจากเครื่องเปรียบเทียบเป็นค่าจริงตามหน่วยนั้นๆ**

3.2.4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างการสกัดของ POME (ตัวอย่าง S6)

ตารางที่ 3.4 สภาวะการสกัด POME เพื่อศึกษาสภาวะเหมาะสมของการสกัด

สภาวะการทดลองที่	Feed-POME (L/hr)	Solvent-Hexane (L/hr)	Pulse (mm)	Frequency (%)
1	5	5	10	90
2	5	5	10	60
3	5	5	10	30
4	5	10	10	30
5	5	10	10	60
6	5	10	10	90
7	5	10	5	90

3.2.4.4 การศึกษาสภาวะการปรับอัตราการไหลออกของเฮกเซนและราฟฟิเนต (ตัวอย่าง C2)

การศึกษาเพื่อวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของไขมันที่สกัดได้ตลอดช่วงการสกัดที่สภาวะเครื่องเดียวกันตลอดการทดลองคือสภาวะของเครื่องดังนี้ อัตราการ feed POME 12 L/hr อัตราการ feed เฮกเซน 10 L/hr การ Pulse 10 mm และความถี่ 90% เก็บตัวอย่างทุก 6 นาที วัดความเข้มข้นของไขมันใน extract

3.2.5 การวิเคราะห์หาค่า Chemical Oxygen Demand (COD)

สารเคมีและอุปกรณ์

- Potassium dichromate
- Mercuric sulphate
- Silver sulphate
- Ammonium ferrous sulphate
- Ferric sulphate
- Sulfuric acid
- 1,10-Phenanthroline monohydrate
- น้ำกลั่น
- หลอดทดลองมีฝาปิด ขนาด 16 mm × 100 mm
- เตาอบ

วิธีการเตรียมสาร

ก. Standard potassium dichromate digestion solution 0.0167 M

- อบสาร Potassium dichromate 2.457 g ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- เติมน้ำกลั่น 250 mLคนจนสารละลาย
- ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริก 83.5 mL
- เติม Mercuric sulphate 16.65 g
- คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- ปรับปริมาตรให้ได้ 500 mL ด้วยน้ำกลั่น

ข. Sulfuric acid reagent

- ชั่งสาร Silver sulphate 4.4 g เติมลงกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 500 mL
- ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง กวนสารละลาย จึงนำไปใช้

ค.. Ferroin indicator

- ละลาย 1,10-Phenanthroline monohydrate 1.485 g และ Ferric sulphate 0.695 g ด้วยน้ำกลั่น 50 mL
- ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

ง. Standard ferrous ammonium sulphate (FAS) 0.05 N

- ชั่งสาร Ferrous ammonium sulphate 19.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 400 mL
- ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกลงไป 20 mL คนสารละลายให้เข้ากัน
- ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 1000 mLด้วยน้ำกลั่น

วิธีการทดลองหาค่า COD การทดลองทำ 3 ซ้ำ

- ไปเปตน้ำตัวอย่าง POME 1 mL เจือจาง 50 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

- ไปเปตน้ำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 2.5 mL ปิเปต Standard potassium dichromate digestion solution 1.5 mL และค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 3.5 mL ลงในหลอดทดลองขนาด 16 × 100 mm
- ปิดฝาให้แน่น เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำหลอดทดลองเข้าเตาอบทำการรีฟลักซ์แบบปิด ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเทสารลงในขวดรูปชมพู่พร้อมหยด Ferroin indicator ลงไป
- ไทเทรตด้วย Standard ferrous ammonium sulphate จนถึงจุดยุติ (สีของสารละลายค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเหลือง > สีเขียวอมเหลือง > สีฟ้า > สีน้ำตาลแดง ซึ่งแสดงถึงจุดยุติ)
- บันทึกปริมาตรและวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณหาค่า COD

$$\text{COD, mg/mL} = \frac{(a-b) \times N \times 8,000}{\text{mL sample}}$$

a = mL of FAS in blank

b = mL of FAS in POME

N = ความเข้มข้นของสาร FAS ที่ใช้

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณของตัวอย่างน้ำและ Reagent ต่าง ๆ ในหลอดทดลองหาค่า COD

Digestion vessel	**Sample (mL)**	**Digestion solution (mL)**	**H_2SO_4 reagent (mL)**	**Total final volume (mL)**
Culture Tube :				
16 x 100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 mm	10.0	14.0	14.0	30.0
Standard 10 mL				
Sample	2.5	1.5	3.5	7.5