ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำเสีย

1. ซีโอดี (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2550)

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ

- ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องควบแน่น
- เตาให้ความร้อน

2. บิวเรต

1.2 สารเคมี

1. สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.25 นอร์มอล ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) 0.12 กรัม แล้วเจือจางปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2. Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ในอัตรา 5.5 กรัม Ag_2SO_4/kg H_2SO_4 บรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัล เฟตละลายยากมากอาจต้องใช้เวลา 1-2 วันจึงละลายหมด

3. สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.10 นอร์มอล

3.1 การเตรียมสารละลาย

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.25 นอร์มอล จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_20$) จำนวน 0.695 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธ์ หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์ (Cl) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl = 10:1

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีกำจัดไนไตรต์เท่านั้น

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1. เติมเมอร์คิวรีซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดก้นกลม

2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass beads) 3-5 เม็ด

4. ค่อยๆเติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรีซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)

5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับ ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น

6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่มากเกินพอด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง

7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-6

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1{,}000}{\text{ml. sample}}$$

A คือ ปริมาณสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

2. ของแข็งทั้งหมด (Total solid) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2550)

2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด

2.2 วิธีการวิเคราะห์

1. นำถ้วยกระเบื้องล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ตวงตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่าใส่ลงในถ้วยกระเบื้องระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ

4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 นาที

6. ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{weight.solid (mg)} \times 1{,}000}{\text{ml.sample}}$$

3. ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total suspended solids) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2550)

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. Glass fiber filter disk (Whatman GF/C, 5.5 cm.)
2. filter holder อาจจะใช้ Membrane filter holder หรือ gooch crucible
3. เครื่องดูดสุญญากาศ
4. ตู้อบไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
5. โถดูดความชื้น
6. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด

3.2 วิธีการวิเคราะห์

1. วางกระดาษกรองลงใน gooch crucible ผ่านน้ำกลั่นลงไปแล้วใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดให้แห้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

2. สำหรับตัวอย่างที่มีสารแขวนลอยมากทำให้กรองได้ช้าให้เลือกปริมาณของตัวอย่างที่จะใช้ซึ่งจะต้องเท่ากับ 14 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตรของกระดาษกรอง

3. เอา gooch crucible ซึ่งเตรียมใส่ในที่สำหรับดูดอากาศ ทำกระดาษกรองให้เปียกด้วยน้ำกลั่น เปิดเครื่องดูดอากาศ วัดปริมาตรตัวอย่างโดยใช้ปิเปตปลายกว้างหรือกระบอกตวงหรือ volumetric flask แล้วกรองล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดจนแห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น

4. นำไปชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

$$\text{ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{mg.solid.suspended x 1,000}}{\text{ml.sample}}$$

4. น้ำมันและกรีส (มุทิตา มีนุ่น , เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์ และเสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล , 2549)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

1. ชุดที่ใช้สำหรับสกัด (Soxhelt)
2. เครื่องดูดสุญญากาศ
3. Buchner funnel
4. ขวดสกัด ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด
6. โถดูดความชื้น
7. ตู้อบไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
8. กระดาษกรองเบอร์ 40
9. ผ้าขาวบาง

4.2 สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการ

1. ใส่ตัวอย่างน้ำทิ้งในถ้วยกระเบื้องเคลือบนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ห่อตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งแล้วด้วยผ้าขาวบาง นำห่อผ้าขาวบางใส่ใน thimble ของชุดสกัด แล้วนำไปใส่ในซอคเลต

3. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัดไขมันที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ววางบนเตา ประกอบอุปกรณ์สกัดพร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที ใช้เวลาในการสกัด 14 ชั่วโมง

4. เมื่อครบแล้วกลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำขวดสกัดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

5. นำไปชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

$$\text{ปริมาณกรีสและน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้ x 1,000}}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

5.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1954 อ้างโดยหัสลินดา บินมะแอ, 2547)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิด molybdenum blue ดังปฏิกิริยา

1. $2Cu^{2+}$ + reducing sugar $\longrightarrow$ CuO_2
2. Cu_2O + H_2SO_4 $\longrightarrow$ $2Cu^{+}$
3. $2Cu$ + MoO_2^{+} $\longrightarrow$ $2Cu^{+}$ + molybdenum blue

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมีที่ใช้

1. Somogyi Reagent

Solution I : ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate	12	กรัม
Na_2CO_3 (anhydrous)	24	กรัม
$NaHCO_3$	16	กรัม
Na_2SO_4 (anhydrous)	144	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร)

Solution II : ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	4	กรัม
Na_2SO_4 (anhydrous)	36	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Somogyi Reagent โดยผสม Solution I 4 ส่วน กับ Solution II 1 ส่วน

2. Nelson Reagent

2.1 สารละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo7O_{24}.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 42 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน

2.2 ละลาย Sodium arsenate (Na_2NAsO_4) 3.5762 กรัม (หรือ $Na_2NAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.3 เติมสารละลายข้อ 2.2 ลงในสารละลายข้อ 2.1 ผสมเข้ากันดี แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในขวดสีชา

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารละลายกลูโคส ไซโลส หรือ α, D-galacturonic acid ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ไซโลส หรือ α,D-galacturonic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดกลาง

2. เติม Somogyi Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที

3. เติม Nelson Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล

5. เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-4 เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (กลูโส, ไซโลส หรือ α,D-galacturonic acid)

การเตรียมสารละลายกลูโคส, ไซโลส หรือ α, D-galacturonic acid

ชั่งน้ำตาลกลูโคส ไซโลส ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายดีแล้วดูดมา 2 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคส, ไซโลส หรือ α, D-galacturonic acid ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

กราฟมาตรฐานจากการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

จากผลการทดสอบการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์กลูโคส น้ำตาลรีดิวซ์ไซโลส และกาแลคทูโลนิคแอซิต แสดงในตารางภาคผนวกที่ 1, 2 และ 3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน (ภาพภาคผนวกที่ 1) และทำกราฟที่ได้มาหากิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

ตารางภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส(µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
50	0.086
100	0.162
150	0.253
200	0.337

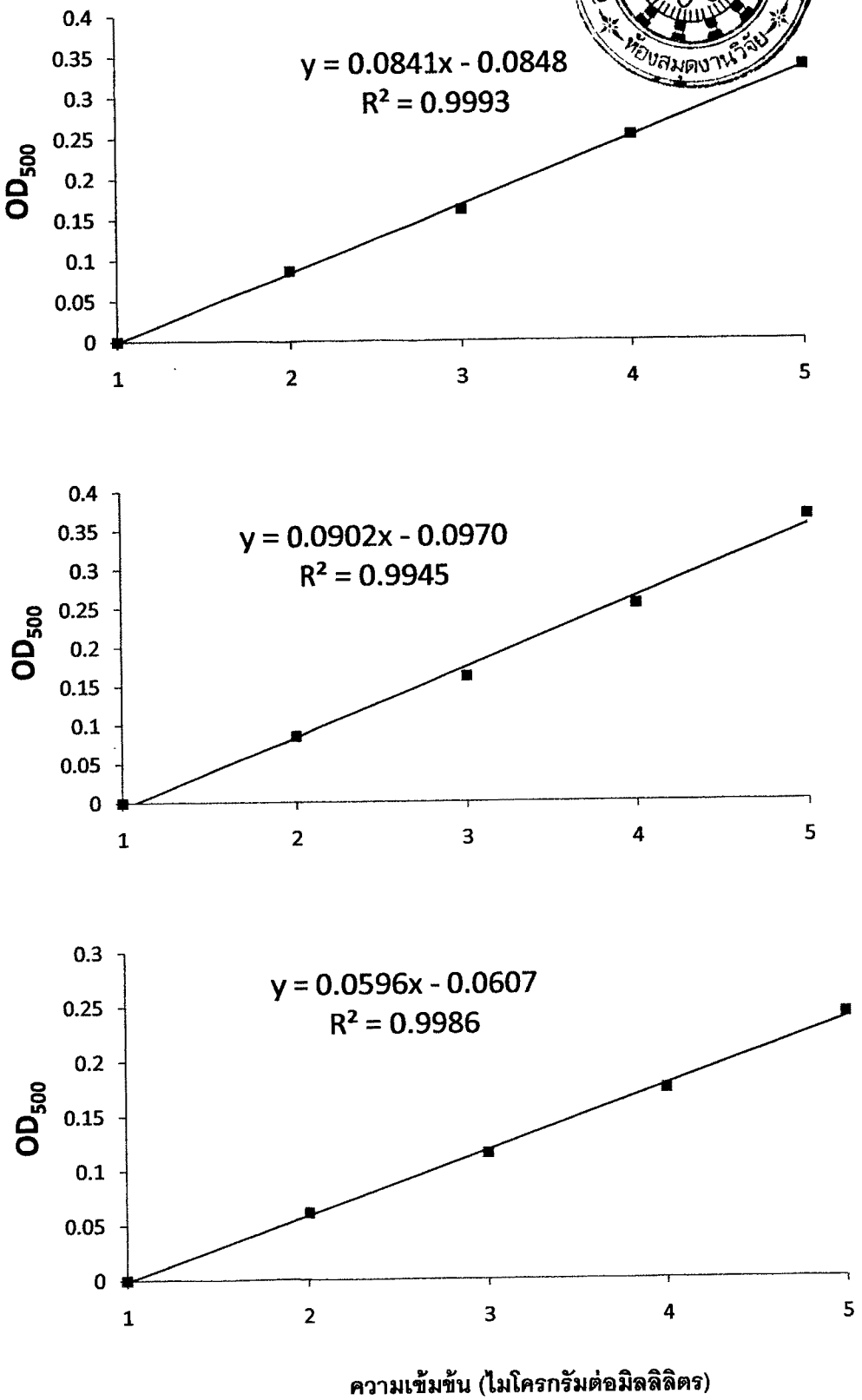
ตารางภาคผนวกที่ 2 ความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส(µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
50	0.086
100	0.162
150	0.254
200	0.367

ตารางภาคผนวกที่ 3 ความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณกาแลคทูโลนิคแอซิตกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาลกาแลคทูโลนิคแอซิต (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
50	0.061
100	0.115
150	0.174
200	0.242

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส สารละลายไซโลส และสารละลายกาแลคทูโลนิกแอซิด วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson