

ภาคผนวก ก

1. วิธีการวิเคราะห์หาค่าซีโอดี (COD: Determination of chemical Oxygen Demand)

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ซีโอดีใช้วิธีการรีฟลักซ์แบบปิด (Closed reflux) ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจุกด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 50 ก่อนนำมาใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์ แล้วเลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างและสารเคมีที่เหมาะสมตามตารางที่ ก1 โดยนำตัวอย่างน้ำมาใส่ในหลอดย่อยสลายแล้วเติมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลาย ซึ่งได้แก่ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเรเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว (ชั้นของกรดจะอยู่ใต้ชั้นของตัวอย่างน้ำและสารย่อยสลาย) ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่น แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลายๆ ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน และไม่ให้มีการสะสมความร้อนอยู่เฉพาะที่ก้นหลอด เพราะอาจทำให้ระเบิดได้เมื่อนำไปรีฟลักซ์ เมื่อสารละลายผสมเข้ากันดีแล้ว นำหลอดแก้วเหล่านี้ไปใส่ในตู้อบ ซึ่งได้ตั้งให้อุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส ใช้เวลารีฟลักซ์ 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เปิดฝาจุก เทของผสมลงในขวดรูปชมพู่เพื่อสะดวกในการนำไปไทเทรต เติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 0.05-0.1 mL (1-2 หยด) ทำการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.1 โมลาร์ จนถึงจุดยุติคือสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง Blank ให้ดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมของออกซิเจนต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times M \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (mL)}}$$

กำหนดให้

A = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (mL)

B = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำ (mL)

M = ความเข้มข้นของ FAS (Molar)

ตารางที่ ก1 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย สำหรับการวิเคราะห์ซีไอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด

หลอดย่อยสลาย (ขนาดของ หลอดแก้ว)	ปริมาตร น้ำตัวอย่าง (mL)	ปริมาตรสารละลาย มาตรฐานโทแทสเซียมได โครเมต สำหรับย่อยสลาย (mL)	กรดซัลฟูริก รีเอเจนต์ (mL)	ปริมาตร ทั้งหมด (mL)
16x100 มม.	2.5	1.5	3.5	7.5
20x150 มม.	5.0	3.0	7.0	15.0
25x150 มม.	10.0	6.0	14.0	30.0

2. การสกัดแยกไตรกลีเซอไรด์ออกด้วยวิธี Saponification และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ แครโทีนด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrometer

ชั่งไขมันตัวอย่างมา 0.140 g ละลายด้วย hexane 30 mL ทำการสกัดแยกเอาไขมันออกโดยใช้วิธีการ Saponification สารละลายที่ผ่านการสกัดมีปริมาตรเท่ากับ 25 mL นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแคโรทีน ทำได้โดยการนำสารละลายที่ผ่านการสกัดมา 3 mL ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 mL ด้วยเฮกเซนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3. การสกัดแยกไตรกลีเซอไรด์ออกด้วยวิธี Saponification เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ เบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง HPLC

ชั่งไขมันตัวอย่างมา 0.140 g ละลายด้วย hexane 30 mL ทำการสกัดแยกเอาไตรกลีเซอไรด์ออกโดยใช้วิธีการ Saponification สารละลายที่ผ่านการสกัดมีปริมาตรเท่ากับ 25 mL นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนทำได้โดย นำสารละลายที่ผ่านการสกัดมา 1 mL ใส่ใน vial ระเหยตัวทำละลายออกจนหมด นำส่วนแคโรทีนที่แห้งติดข้างขวด vial ไปละลายด้วย methanol ทำการกรองสารใน vial และนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนด้วย HPLC เทียบกับกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

1. วิธีการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนจากเครื่อง UV-Vis spectrometer

ลักษณะทางกายภาพของ Standard β -carotene

เป็นผงสีแดง แห้ง บรรจุอยู่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีน

ชั่ง Std. Carotene 0.0105 g (10.5 mg) ละลายในคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 50 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.21 mg/mL เตรียมเป็น stock solution นำมาเจือจางและวัดการดูดกลืนแสงดังตาราง ข1

ตารางที่ ข1 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrometer

ความเข้มข้นแคโรทีน (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (Abs)
0.0016	0.144
0.0019	0.176
0.0021	0.305
0.0025	0.370
0.0032	0.481
0.0042	0.583
0.0053	0.669
0.0063	0.952

2. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนจากเครื่อง HPLC

ชั่ง Std. Carotene 0.0105 g = 10.5 mg ละลายในคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 50 mL จะได้สารละลายมาตรฐานเบต้าแคโรทีนเข้มข้น 210 ppm เตรียมเป็น stock solution นำมาเจือจางและวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังตาราง ข2

ตารางที่ ข2 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีนด้วยเครื่อง

HPLC

ความเข้มข้นเบต้าแคโรทีน (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ (mAU)
2	87
6	273
8	361
10	376
20	761
40	1,613
60	2,771
80	3,890
100	4,806

3. การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณเฮกเซนในชั้นน้ำด้วยเครื่อง GC

- เตรียมความเข้มข้นของเฮกเซนในคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 2.5 mL ต่อ 100 mL ของสารละลาย และเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วย GC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังตารางที่ ข3

ตารางที่ ข3 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเฮกเซนด้วยเครื่อง GC

ความเข้มข้นเฮกเซน (mL/100mL)	พื้นที่ใต้กราฟ (mAU)
0.125	3174
0.0625	1456.5
0.03125	858.5
0.015625	444.5

4. การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำในชั้นเอกเซนด้วยเครื่อง FTIR

- เตรียมความเข้มข้นของน้ำกลั่นในอะซีโตนความเข้มข้น 0.5 mL ต่อ 100 mL ของสารละลาย และเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยคูคกิ้งรีนังส์อินฟราเรด กำหนดพื้นที่ใต้กราฟช่วงเลขคลื่น $3100-4000\text{ cm}^{-1}$ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังตารางที่ ข4

ตารางที่ ข4 ข้อมูลการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำด้วยเครื่อง FTIR

ความเข้มข้นของน้ำ (mL/100 mL)	พื้นที่ใต้กราฟ (mAU)
0.05	2501
0.025	1450
0.0125	760
0.005	446
0.0025	250

5. ข้อมูลการละลายของไขมันในชั้นเอกเซนและในชั้นน้ำ

ตารางที่ ข5 ค่าการละลายของสาร Oil-Hexane-Water ในเฟสทั้งสองที่สมดุลกัน

Hexane (g)	Oil (g)	Water (g)	Water (g)	Oil (g)	Hexane (g)
65.88463	8.185	0.0022736	99.9977264	1.827	0.015372
65.87661	6.365	0.003484	99.996516	1.139	0.023391
65.86879	4.285	0.004102	99.995898	0.729	0.031208
65.86509	3.485	0.004445	99.995555	0.5305	0.034915
65.86035	2.64	0.004862	99.995138	0.382	0.039653
65.85691	1.785	0.005163	99.994837	0.2285	0.04309
65.8533	0.91	0.005355	99.994645	0.091	0.046699
65.85125	0.46	0.005762	99.994238	0.0545	0.048751
65.84867	0.3	0.006148	99.993852	0.01	0.051327
65.84716	0.205	0.006741	99.993259	0.0055	0.052838

6. ค่าคงที่การละลายของไขมันในเฮกเซนและน้ำ

ตารางที่ ๖ ค่าคงที่การละลายของไขมันในเฮกเซนและน้ำ

ไขมันในชั้นเฮกเซน	ไขมันในชั้นน้ำ	ค่าคงที่การละลาย
1.794	11.050	6.16
1.126	8.810	7.82
0.723	6.108	8.45
0.528	5.025	9.52
0.38	3.854	10.14
0.228	2.639	11.57
0.0908	1.363	15.01
0.0544	0.694	12.76
0.002	0.453	226.50
0.0011	0.310	281.82

7. อัตราการไหลจริงของ Raffinate และ Extract

ตารางที่ ๗ การเปรียบเทียบอัตราการไหลของจากเครื่อง CTS7 กับค่าการไหลจริง

Raffinate (L/hr)	Extract (L/hr)	Time (s)	Volume (mL)	Flow rate (L/hr)
0	5	80.85	200	8.90
0	15	48.60	400	29.63
0	20	35.08	400	41.00
15	0	44.45	300	24.30
10	0	56.73	300	19.00
5	0	83.18	200	8.70