บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การทดสอบปริมาณไนโตรเจน

2.1.1 วิธี Semi-micro Kjeldahl

2.1.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดอ่านได้ละเอียด 0.0001 กรัม

2.1.1.1.2 micro Kjeldahl flask ขนาด 30 ml

2.1.1.1.3 micro Kjeldahl distillation apparatus

2.1.1.1.4 เตา digestion แบบ 40 หลุม

2.1.1.1.5 เครื่องกรองและกลั่นน้ำ

2.1.1.1.6 burette

2.1.1.1.7 คีมโลหะ

2.1.1.1.8 สายยาง

2.1.1.1.9 ขวดปริมาตรขนาด 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml

2.1.1.1.10 กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 ml

2.1.1.1.11 pipette ขนาด 1, 5, 10 และ 25 ml

2.1.1.1.12 conical flask ขนาด 100 ml

2.1.1.1.13 ลูกยางสำหรับดูด

2.1.1.1.14 beaker ขนาด 600 ml

2.1.1.1.15 แท่งแก้วคน

2.1.1.1.16 ช้อนตักสาร

2.1.1.1.17 boiling flask ขนาด 2 l พร้อมจุกยาง

2.1.1.1.18 ขวดใส่อินดิเคเตอร์ชนิดมีที่หยด

2.1.1.1.19 ขวดปากกว้างขนาด 500 ml พร้อมจุก

2.1.1.1.20 กรวยแก้ว

2.1.1.1.21 จีกดูดความชื้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 cm

2.1.1.2 สารเคมีและวิธีเตรียม

2.1.1.2.1 สารเร่งปฏิกิริยาผสม

ผสม potassium sulphate (anh.) 15 ส่วน copper sulphate pentahydrate 2 ส่วน และ selenium (powder) 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้ากัน

2.1.1.2.2 sodium hydroxide 67% w/v

ชั่ง NaOH 67 กรัม ละลายด้วยน้ำให้หมด ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยกระบอกตวง

2.1.1.2.3 Boric acid 2% w/v

ชั่งกรดบริก 20 กรัม ละลายด้วยน้ำ อุ่นและคนจนละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 l

2.1.1.2.4 screened methyl red indicator 0.15% w/v

ชั่ง methyl red 0.1 กรัม และ methylene blue 0.05 กรัม ละลายใน ethanol ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

2.1.1.2.5 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.83 g/ml

2.1.1.2.6 methyl orange indicator 0.1%

ชั่ง methyl orange 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 ml

2.1.1.2.7 standard sodium carbonate 0.1 N

ชั่ง Na_2CO_3 (anh.) ชนิด M.W. 105.99 ซึ่งได้อบที่ 100°C นาน 3 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในเทอมปริมาณ 5.2990 กรัมละลายด้วยน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 l ด้วยขวดปริมาตร

2.1.1.2.8 standard sulphuric acid 0.1 N

ตวงกรด H_2SO_4 ชนิด d 1.83 g/ml มา 2.8 ml เติมน้ำทีละน้อย (หยุดเติมเมื่อร้อนมาก) ค่อย ๆ คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 l

คำนวณความเข้มข้นที่แท้จริงของกรด โดยนำไป titrate กับสารละลาย Na_2CO_3 ชนิด 0.1 N ใช้ methyl orange เป็น indicator โดยการ pipette Na_2CO_3 มา 25 ml หยด indicator 1-2 หยด จุดยุติคือจุดที่เปลี่ยนสีของ Na_2CO_3 จากเหลืองส้มไปเป็นชมพู การคำนวณใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = normality ของ Na_2CO_3 (0.1 N)

N_2 = normality ของ H_2SO_4

V_1 = ปริมาตรของ Na_2CO_3 (25 ml)

V_2 = ปริมาตรของ H_2SO_4

2.1.1.2.9 กรดซัลฟิวริก 0.01 N

ใช้ขวดปริมาตรตวง H_2SO_4 0.1 N ปริมาณ 100 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำปรับปริมาตรให้เป็น 1 l

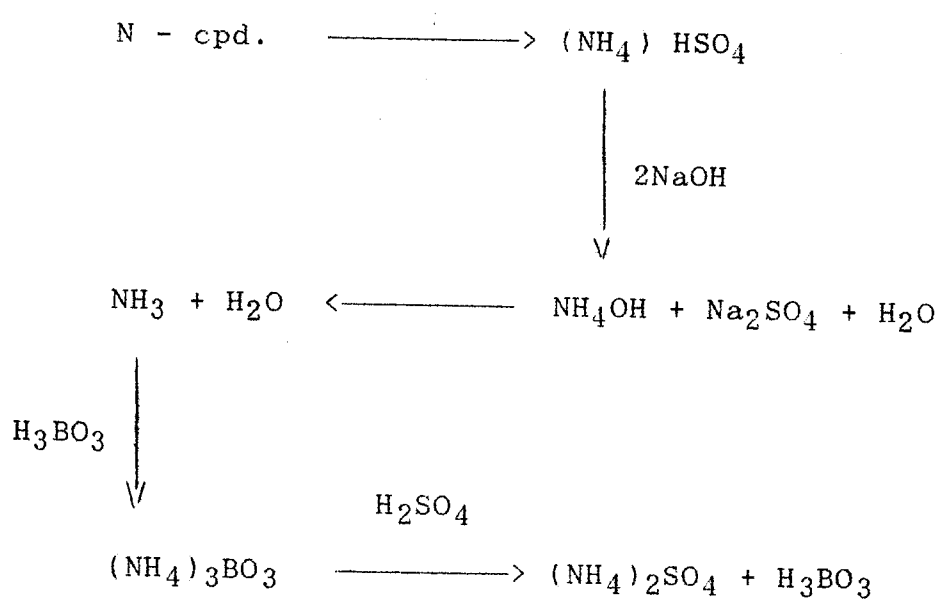
หมายเหตุ น้ำที่ใช้ตลอดการทดลองคือน้ำกลั่น

ทฤษฎี ไนโตรเจนในยางดิบมักอยู่ในรูปของโปรตีน ปริมาณไนโตรเจนจึงเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณโปรตีน การที่ปริมาณไนโตรเจนต่างกันไปจึงน่าจะเป็นเพราะชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปอนุโลมให้ปริมาณของโปรตีน = ปริมาณของไนโตรเจน x 6.25 (co factor) ปกติปริมาณโปรตีนมัก = 1-1.5% โดยในหางน้ำยางอาจมีโปรตีนสูง 2-3%

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนนิยมใช้วิธี Semi-micro Kjeldahl โดยการทำให้ยางย่อยสลายด้วยการเผากับสารเร่งปฏิกิริยาผสมและกรดซัลฟิวริกเข้มข้น เพื่อเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนไปเป็น ammonium hydrogen sulphate แล้วเปลี่ยน

สารนั้นไปเป็น ammonium hydroxide โดยการใส่ด่าง (NaOH) ซึ่งพอคลั่นลงในกรดโบริกที่ทราบปริมาณก็จะเกิดเป็น ammonium borate ขึ้น เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปทำ back titration เพื่อหาปริมาณของ ammonium borate ที่เกิดขึ้นด้วยกรดซัลฟิวริกมาตรฐาน ก็สามารถคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนได้

สมการของการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้ คือ



จุดยุติคือสีของสารละลายเปลี่ยนจากเขียวเป็นม่วงอ่อน

วิธีการทดสอบ

1. ชั่งยางที่ได้จากการตัดถุงมือ 1 คู่ ให้ละเอียดและคนให้เข้ากันดีแล้วให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.1 กรัม บรรจุลงใน Micro-Kjeldahl flask แล้วเติมสารเร่งปฏิกิริยาผสม 0.65 g และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ml

2. เผาให้เดือดเบา ๆ แล้วเผาต่อไปจนได้สารละลายใส โดยต้องไม่มีสีเหลืองอ่อนๆเหลืออยู่ (ประมาณ 1 ชั่วโมง)

3. ทิ้งให้เย็น เจือจางด้วยน้ำเป็น 10 ml

4. ถ่ายสารละลายลงในเครื่องกลั่นซึ่งได้ผ่านไอน้ำให้ร้อนไว้แล้วราว 30 นาที และล้างภาชนะที่บรรจุสารละลายด้วยน้ำกลั่น 2-3 ml

5. เติมสารละลาย NaOH 67% ปริมาณ 10 ml ลงในเครื่องกลั่นและล้างด้วยน้ำไม่เกิน 5 ml

6. นำ conical flask ขนาด 100 ml ที่มีสารละลายกรดโบริก 2% ปริมาณ 10 ml และ screened methyl red indicator 1-2 หยด มารองรับสิ่งที่กลั่นได้ โดยให้ปลายเครื่องควบแน่นจุ่มอยู่ใต้ผิวของสารละลาย

7. กลั่นด้วยไอน้ำประมาณ 5 นาที

8. เลื่อน flask รองรับสิ่งกลั่นได้ให้ต่ำลง เพื่อให้ปลายเครื่องควบแน่นอยู่เหนือระดับสารละลาย กลั่นต่ออีก 1 นาที ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างปลายเครื่องควบแน่นแล้วจึงหยุดกลั่น

9. นำสิ่งที่กลั่นได้ไปไตเตรตกับกรดซัลฟิวริก 0.01 N

10. ทำ blank ตามวิธีเดิม

การคำนวณ สามารถคำนวณปริมาณไนโตรเจนได้จากสูตร

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(V_1-V_2)N \times 0.014 \times 100}{(W)}$$

V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไตเตรตยาง (ml)

V_2 = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ไตเตรต blank (ml)

N = normality ของกรดซัลฟิวริก

W = น้ำหนักของยาง (g)

ปริมาณของไนโตรเจนในถุงมือยางที่ใช้แล้วทั้ง 30 คู่ แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

2.1.2 วิธี Auto Analyzer (AA)

2.1.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ใช้ร่วมกับ Semi-micro Kjeldahl method ได้โดยมี Auto Analyzer, Kjeldahl catalyst tablet หรือใช้สารเร่งผสมแทน

2.1.2.2 สารเคมีและวิธีเตรียม

2.1.2.2.1 เตรียม 2.5 M NaOH

ชั่ง NaOH 200 g ละลายด้วยน้ำกรอง ตั้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้เป็น 2 l

2.1.2.2.1 เตรียม sodium phenate

ชั่ง NaOH 200 g ละลายในน้ำกรอง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองเป็น 1 l ตั้งไว้ให้เย็น เติม phenol 250 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองเป็น 4 l เก็บไว้ในขวดสีชาที่มีจุกปิด

2.1.2.2.3 เตรียม 25% ethanol

เติม ethanol 250 ml ลงในน้ำกรองแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกรอง ให้เป็น 1 l

2.1.2.2.4 เตรียมสารละลาย sodium hypochlorite

ชั่ง NaOH 50 g ละลายในน้ำกรอง 250 ml ปล่อยให้เย็น เติมโซเดียม ไฮโปคลอไรต์, NaOCl (12% available chlorine)

2.1.2.2.5 เตรียม stock nitrogen standard ชนิด 1000 mgN/ml โดยมีวิธีคิดดังนี้

M.W. ของ $(NH_4)_2SO_4$ = 132.17

standard 1000 ml N/ml = 1 gN/l

= (132.17x1)/2x14.01 g$(NH_4)_2SO_4$/l

= 4.7170 g $(NH_4)_2SO_4$/l

ชั่ง $(NH_4)_2SO_4$ ที่อบแห้งมา 4.717 g ละลายด้วยน้ำกลั่น เติม 1.25 M H_2SO_4 5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 l

2.1.2.2.6 เตรียม 2.5 M H_2SO_4

ละลาย conc-H_2SO_4 139 ml ในน้ำกลั่นเป็น 1 l

2.1.2.2.7 เตรียมสารละลาย Brij

ละลายสารละลาย Brij. ปริมาณ 1 ml ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 l

เตรียม standard solution

เตรียม standard set ที่มี 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg N/ml ในปริมาตร 100 ml โดย

1. pipette 2.5 M H_2SO_4 50 ml แล้วใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 ml ทั้งหมด 11 ใบ

2. pipette 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18 และ 20 ml **ของ** standard 1000 mg N/ml ลงในขวดปริมาตรแต่ละใบ

3. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

การย่อยสลายยาง

1. ชั่งยางจากถุงมือยาง 1 คู่ ที่ตัดละเอียดและคลุกให้เข้ากันดีแล้วมา 0.5 กรัม บรรจุลงใน Kjeldalel digestion tube

2. ใส่สารเร่งปฏิกิริยาผสม ซึ่งประกอบด้วย K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se ในอัตราส่วน 15:2:1 ปริมาณ 50 mg

3. เติม conc. H_2SO_4 5 ml เขย่าให้เข้ากัน

4. ยก rack ที่มี digestion tube ใส่ลงใน digestion block

5. ย่อยสารที่อุณหภูมิ 80°C ก่อนแล้วค่อย ๆ เพิ่มเป็น 110°C จึงย่อยที่อุณหภูมินี้นาน $1^1/_2$ ชั่วโมง

6. ย่อยสารต่อไปที่อุณหภูมิ 380°C นานตั้งแต่ 4 ชั่วโมงขึ้นไป จนกระทั่งได้สารละลายใส

7. ยก digestion tube ลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นทีละน้อย เขย่าให้เข้ากัน (ระหว่างเติมน้ำกลั่นให้ระวังสารกระเด็น) ควรเติมน้ำสูงประมาณครึ่งหนึ่งของ tube ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 75 ml

8. ใช้จุกยางหรือ parafilm ปิดปาก tube แล้วเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

9. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วจึงรินสารละลายที่ใสใส่ขวดเก็บไว้ในตู้เย็นโดยปิดฝาเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การทำ recovery สำหรับเช็คผลการทดลอง

ในการทำ digestion ตัวอย่างชุดหนึ่งควรประกอบด้วย

1. digest standand sample ที่ทราบค่าแน่นอน

2. blank + 3 ml 1000 ppm N (2 หลอด)

3. blank (1 หลอด)

ทำ calibration curve โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับความสูงของแท่งกราฟ (แผนภาพที่ 3.1) ก็ทำให้สามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้

ปริมาณไนโตรเจนที่หาด้วย AA แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 เพื่อแสดงค่าเปรียบเทียบเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Semi-micro Kjeldahl

2.2 การทดสอบปริมาณเถ้าและโลหะ

2.2.1 ปริมาณเถ้า

เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1.1 เครื่องชั่งชนิดอ่านได้ละเอียด 0.0001 g

2.2.1.2 เตาเผาอุณหภูมิสูงถึง 1000°C

2.2.1.3 โถดูดความชื้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 cm

2.2.1.4 silica crucible ขนาด 50 ml

2.2.1.5 คีมโลหะ

2.2.1.6 กระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.0 cm

2.2.1.7 ถุงมือยาง 30 คู่ ตัดจนละเอียดเป็นคู่ๆ แยกจากกันรดยคลุกเคล้าให้เข้ากัน ชั่งรดยละเอียดถึง 0.0001 g แล้วใส่ถุงพลาสติกที่รัดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่นเพื่อเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป

ทฤษฎี เถ้าของยางมักประกอบด้วยออกไซด์ คาร์บอเนตฟอสเฟตและซิลิเกตของโซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม หรือแมกนีเซียม รวมทั้งทราย ซึ่งจัดเป็นสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในยาง ปริมาณเถ้าจึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของธาตุที่ยางดิบมีอยู่ รดยสิ่งเจือปนเหล่านี้มักละลายได้ในน้ำ (Stern, 1967)

การทดสอบหาปริมาณเถ้าก็เพื่อต้องการทราบปริมาณของเกลืออินทรีย์ในยาง เช่น ถ้ามี alum ปริมาณสูงจะทำให้ยางดูดความชื้นได้มาก ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาในการผลิตผลิตภัณฑ์ยาง และยังสามารถใช้ปริมาณเถ้าเป็นเครื่องบ่งชี้ว่ามีการเติมสารเพิ่ม (filler) เพื่อเพิ่มน้ำหนักยางหรือไม่อีกด้วย

วิธีทดสอบ

1. ชั่ง crucible ที่สะอาดและอบจนแห้งรดยละเอียดถึง 0.0001 g แล้วบันทึกน้ำหนักไว้ (A g)

2. ชั่งยางให้ได้น้ำหนัก 0.5 g รดยละเอียด แล้วห่อด้วยกระดาษกรองบรรจุลงใน crucible (B g)

3. นำ crucible พร้อมทั้งยางที่บรรจุอยู่ไปเผาที่อุณหภูมิ 530°C จนกลายเป็นเถ้าสมบูรณ์ (ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง)

4. ทิ้ง crucible ให้เย็นในรถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักรดยละเอียดอีกครั้ง (C g)

คำนวณปริมาณเถ้าได้รดยใช้สูตร

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักยาง}} \times 100$$

$$= \frac{C-A}{B} \times 100$$

A = น้ำหนัก crucible (g)

B = น้ำหนักยาง (g)

C = น้ำหนัก crucible และเถ้า (g)

ปริมาณเถ้าในถุงมือยางทั้ง 30 คู่ แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

2.2.2 ปริมาณโลหะ

โลหะที่หาปริมาณได้แก่ Na, K, Ca, Cu และ Mg

เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.2.1 เครื่องชั่งชนิดอ่านได้ละเอียด 0.0001 g

2.2.2.2 บีกเกอร์ขนาด 50 ml

2.2.2.3 โถดูดความชื้น

2.2.2.4 เตาเผาอุณหภูมิสูงถึง 1000°C

2.2.2.5 Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) ของ Shimadzu รุ่น 640-12

2.2.2.6 Atomic Emission Spectrophotometer (AES) รุ่น UNICAM SP 90 A Series 2

2.2.2.7 กระบอกตวงขนาด 1 l

2.2.2.8 ขวดปริมาตรขนาด 50, 100 และ 1000 ml

2.2.2.9 pipette ขนาด 1, 5, 10 และ 25 ml

2.2.2.10 เครื่องมือสำหรับทำ digestion

2.2.2.11 ถุงมือที่ตัดละเอียดและผสมให้เข้ากันดีแล้ว

2.2.2.12 sand bath

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. 1% HNO_3

น้ำ conc. HNO_3 มา 10 ml ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 1 l

ท 58925

หอสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. 1% HCl เตรียมเช่นเดียวกับ 1% HNO_3
3. conc. HNO_3
4. conc. HCl
5. perchloric acid
6. sodium chloride
7. potassium chloride
8. copper sulphate
9. magnesium sulphate
10. calcium carbonate
11. double distillated water

ท
TS
2160
W532
2.4

วิธีการทดสอบ

Digestion ยาง

ชั่งถุงมือยาง 0.5 g โดยละเอียดถึง 0.0001 g เติมกรดผสมของ conc. HNO_3 : perchloric acid 6:1 (v/v) จำนวน 40 ml ลงใน beaker ขนาด 100 ml digest บน sand bath ที่อุณหภูมิ 380°C จนหมดควันสีขาว ทิ้งให้เย็น กรองปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 50 ml

นำสารละลายที่ได้นี้ไปทดสอบธาตุด้วย AAS และ AES

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. สารละลายมาตรฐาน Na

ชั่ง NaCl 2.543 g ละลายใน double distillated water ปรับปริมาตรให้เป็น 1 l จะได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางให้เป็น 2,4,6,8 และ 10 ppm เพื่อวัด AES

2. สารละลายมาตรฐาน K

ชั่ง KCl 1.907 g ละลายใน double distillated water ปรับปริมาตรเป็น 1 l จะได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางให้เป็น 2,4, 6, 8 และ 10 ppm เพื่อวัด AES

3. สารละลายมาตรฐาน Ca

ชั่ง $CaCO_3$ 1.429 g ละลายใน double distillated water เติม conc. HCl 10 ml เพื่อช่วยการละลายให้เกิดสมบูรณ์ ปรับปริมาตรเป็น 1 l ด้วย double distillated water จะได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางให้เป็น 10,20,30,40 และ 10 ppm เพื่อวัด AAS

4. สารละลายมาตรฐาน Mg

ชั่ง $MgSO_4$ 1.00 g ละลายในน้ำ : conc HCl ในอัตราส่วน 1:1 ปรับปริมาตรด้วย 1% HCl ให้เป็น 1 l จะได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางให้เป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm เพื่อวัด AAS

5. สารละลายมาตรฐาน Cu

ชั่ง $CuSO_4$ 1.00 g ละลายในน้ำ : conc. HNO_3 ในอัตราส่วน 1:1 ปรับปริมาตรด้วย 1% HNO_3 ให้เป็น 1 l จะได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางให้เป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm เพื่อวัด AAS

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำหนักถุงมือ 1 คู่ = 17.7041 g

ชั่งมา digest = 0.5033 g

อ่านปริมาณ Na ได้จาก AES = 4.3 ppm

ปริมาตรสารละลาย = 50 ml

คำนวณปริมาณ Na ได้ดังนี้

สารละลาย 10^6 ml มี Na = 4.3 g

สารละลาย 50 ml มี Na = $\frac{4.3 \times 50}{106}$ g

ถุงมือ 1 คู่มี Na = $\frac{4.3 \times 50}{106} \times \frac{17.7041}{0.5033}$ g

ถุงมือหนัก 17.7041 g มี Na = $\frac{4.3 \times 50}{106} \times \frac{17.7041}{0.5033}$ g

ถุงมือหนัก 100 g มี Na $= \frac{4.3 \times 50}{106} \times \frac{17.7041}{0.5033} \times \frac{100}{17.7041}$ g

$= 0.043$

ppm $= \% \times 10^{-4}$

ปริมาณธาตุ Na, K, Ca, Mg และ Cu ที่อ่านได้และที่คำนวณได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

2.3 การทดสอบสารรักษาสภาพทุติยภูมิ

2.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.3.1.1 soxhlet extractor

2.3.1.2 แผ่นแก้วขนาด 20x20 cm

2.3.1.3 chromatographic tank

2.3.1.4 rotary evaporator

2.3.1.5 เครื่องพ่นสาร

2.3.1.6 UV lamp

2.3.1.7 UV Spectrophotometer (Hitachi Model 330)

2.3.1.8 AAS

2.3.1.9 AES

2.3.2 สารเคมี

2.3.2.1 acetic acid

2.3.2.2 acetone

2.3.2.3 benzene

2.3.2.4 butanol

2.3.2.5 carmine

2.3.2.6 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chlorimine

2.3.2.7 dithizone

2.3.2.8 ethanol

2.3.2.9 ether

2.3.2.10 heptane

2.3.2.11 methanol

2.3.2.12 silica gel 60 HF_{254} for TLC

2.3.2.13 sodium chloride

2.3.2.14 tetramethyl thiuram disulphide

2.3.2.15 toluene

2.3.2.16 zinc acetate dihydrate

2.3.2.17 zinc diethyl dithiocarbamate

2.3.2.18 zinc oxide

2.3.3 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

สุ่มหยิบถุงมือยางมาทีละข้างเพื่อใช้เป็นตัวแทนของถุงมือแต่ละคู่ชั่งละเอียดถึง 0.0001 g นำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ soxhlet extractor ต่อจากนั้นนำสิ่งที่สกัดได้ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกภายใต้ความดันด้วย rotary evaporator

2.3.4 การแยกสารด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟฟีชั้นบาง (Thin-layer chromatography, TLC)

ใช้ silica gel 60 HF_{254} ของบริษัท Merck สำหรับ TLC เป็นตัวดูดซับ 40 กรัมต่อน้ำ 78 cm^3 เขย่าแรงๆ ในขวดก้นกลม ซึ่งมีจุกปิดให้เข้ากันนาน 1-2 นาที นำไปเทลงใน spreader ของเครื่องเคลือบแผ่นแก้ว ที่ปรับความหนาได้ตามต้องการ หลังจากเคลือบเสร็จปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จึงนำไป activate โดยอบที่อุณหภูมิ 110°C ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ใน desiccator เพื่อใช้งาน

การแยกสารทำได้โดยละลายสารในตัวทำละลายแล้ว spot ลงที่ปลายด้านหนึ่งของ TLC plate ให้ห่างจากส่วนปลายประมาณ 1 cm แล้วจุ่มปลายด้านนี้ลงใน

ตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งบรรจุอยู่ใน chromatographic tank ที่มีฝาปิดสนิท ซึ่งได้ทำให้อิ่มตัวแล้วโดยมีตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่า 1 cm เล็กน้อย ตัวทำละลายจะซึมขึ้นมาตามตัวดูดซับด้วย capillary action ผ่านหยดสารและพาเอาสารขึ้นมาด้วย สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่บน TLC plate ด้วยอัตราเร็วต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตราการละลายของสารนั้นในตัวทำละลายที่ใช้และอัตราการยึดจับของเฟสนิ่งต่อสารนั้น ดังนั้นเมื่อปล่อยให้สารหลายๆชนิดเคลื่อนที่ไปบน TLC plate ชั่วระยะหนึ่งจะสามารถแยกสารต่างๆออกจากกันได้

สารชนิดหนึ่งจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วคงที่ในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ในการวิเคราะห์จำเป็นต้องทราบค่า R_f (Rate of flow) ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสารสามารถคำนวณค่า R_f ได้โดย

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2.5.5 การทดสอบปริมาณสารที่สกัดได้โดย AAS

การวิเคราะห์สารด้วยวิธีนี้มีสิ่งต่างๆที่เกี่ยวข้องคือ

1. การเปลี่ยนส่วนประกอบของสารตัวอย่างให้อยู่ในสถานะอะตอม
2. การฉายแสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดการดูดกลืนแสงได้
3. วัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืน โดยใช้ Beer's Law คือ

$$A = \log \frac{I}{I_o} = abc$$

เมื่อ A = absorbance

I_o = ความเข้มของแสงก่อนถูกดูดกลืน

I = ความเข้มของแสงหลังดูดกลืน

a = absorptivity ของสาร

b = ความหนาของ cell (cm)

c = ความเข้มข้นของสาร

เมื่อวัดการดูดกลืนของสารชนิดเดียวกัน ที่บรรจุอยู่ใน cell เดียวกัน

จะได้ $A = kc$

จึงสามารถ plot graph ระหว่าง A กับ c ได้

สารตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะตอม โดยการอัดสารละลายของสารนั้นๆ เข้าไปในเปลวไฟ ความร้อนจะทำให้สารตัวอย่างสลายเป็นอะตอมอยู่ที่ ground electronic state วิธีดังกล่าวอาจมีประสิทธิภาพไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจไม่เป็นไปตาม Beer's Law เท่าใดนัก เพราะจำนวนอะตอมที่ดูดกลืนแสงในเปลวไฟ อาจไม่ใช่จำนวนอะตอมที่มีอยู่ในสารละลาย แต่อย่างไรก็ตาม การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ก็ทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้

2.4 น้ำยาที่ใช้ทดสอบ

2.4.1 ทดสอบ Tetramethyl thiuram disulphide (TMTD) และ Zinc diethyldithiocarbamate (ZDC) ใช้ 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chlorimine

2.4.2 ทดสอบ Zinc oxide (ZnO) ใช้ 1% dithizone ใน ethanol

2.4.3 ทดสอบ Boric acid ใช้ carmine

2.4.4 ทดสอบ sodium pentachlorophenate (SPP) ใช้ dithizone และ dichlorofluorescene หรือ UV light 254 nm

2.5 การเตรียมน้ำยา

2.5.1 น้ำยาทดสอบ TMTD และ ZDC

ชั่ง 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chlorimine 1 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 cm^3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 cm^3

2.5.2 น้ำยาทดสอบ ZnO

ชั่ง dithizone 1 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 cm^3 เติมเอทานอลจนมีปริมาตรครบ 100 cm^3

2.5.3 น้ำยาทดสอบ Boric acid

ชั่ง carmine 0.1 กรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 cm^3 เติมน้ำร้อนจนมีปริมาตรครบ 100 cm^3

2.6 วิธีทำการทดสอบและผลการทดสอบ

2.6.1 การสกัดสาร

2.6.1.1 นำถุงมือยางมา 1 ข้าง ตัดให้มีขนาดเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนัก

2.6.1.2 สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด คือ acetone, 25% acetic acid, 30% ethanol และเอทานอล ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดๆละ 200 cm^3 และสกัดแต่ละครั้งนาน 16 ชั่วโมง

2.6.1.3 นำสิ่งที่สกัดได้ไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator จนเหลือตัวทำละลายปริมาณน้อยๆ จะได้ "crude" ให้เทใส่ขวด vial ใช้ตัวทำละลายจำนวนน้อยล้างสิ่งสกัดให้หมดเทรวมกัน แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน หรือเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่า (ไม่ใช้ความร้อน) สังเกตลักษณะสารที่ได้ แล้วชั่งน้ำหนักจดไว้ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.4-3.7

2.6.2 การตรวจสอบหาสารรักษาสภาพทุติยภูมิโดยใช้ TLC

2.6.2.1 ตรวจสอบหา TMTD

2.6.2.1.1 นำสารมาตรฐาน TMTD มาละลายใน acetone แล้ว spot ลงบน plate ที่เตรียมไว้และเป่าให้แห้ง

2.6.2.1.2 นำ crude ที่สกัดได้ในครั้งแรกมาละลายด้วย acetone จำนวนน้อยๆมา spot บนแผ่นเดียวกันแล้วเป่าให้แห้ง

2.6.2.1.3 นำแผ่น TLC ใส่ลงใน chromatographic tank ที่บรรจุ developing solvent ซึ่งประกอบด้วย heptane:benzene:acetone = 5:3:2 (v/v) ซึ่งอยู่ในภาวะสมดุล

2.6.2.1.4 ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่ง solvent เคลื่อนที่ถึง solvent front

2.6.2.1.5 นำ plate ออกจาก chromatographic tank ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ว spray ด้วย 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chlorimine ซึ่งละลายใน ether เพื่อทำให้เกิดสี จะสังเกตเห็นแต่ละ spot ของสารมีสีเหลืองอมส้ม มีค่า R_f 0.36-0.37 ซึ่งมีสีเหมือนกับ spot ของ standard ซึ่งมีค่า R_f 0.36 ทุกประการ ค่า R_f ของแต่ละตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 3.8 และโครมาโตแกรมของ TMTD แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.2

2.6.2.2 ตรวจสอบหา ZDC

2.6.2.2.1 นำสารมาตรฐาน ZDC มาละลายใน acetone แล้ว spot ลงบน plate ที่เตรียมไว้และเป่าให้แห้ง

2.6.2.2.2 นำ crude ที่สกัดได้ในครั้งที่ 2 มาละลายใน acetone จำนวนน้อยๆ มา spot ลงบนแผ่นเดียวกัน แล้วเป่าให้แห้ง

2.6.2.2.3 นำแผ่น TLC ไปใส่ลงใน chromatographic tank ที่บรรจุ developing solvent ซึ่งประกอบด้วย heptane : toluene : acetone = 5 : 3 : 2 (v/v) ซึ่งอยู่ในภาวะสมดุล

2.6.2.2.5 นำ plate ออกจาก chromatographic tank ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ว spray ด้วย 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chlorimine ซึ่งละลายใน ether เพื่อทำให้เกิดสี จะสังเกตเห็นแต่ละ spot ของ standard ที่มีค่า R_f 0.49 ทุกประการ ค่า R_f ของแต่ละตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 3.9 โครมาโตแกรมของ ZDC แสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.3

2.6.2.3 ตรวจสอบหา ZnO

2.6.2.3.1 นำสารมาตรฐาน ZnO มาละลายใน 25% aqueous acetic acid แล้ว spot ลงบน plate ที่เตรียมไว้และเป่าให้แห้ง

2.6.2.3.2 นำ crude ที่สกัดได้ในครั้งที่ 2 มาละลายใน 25% aqueous acetic acid จำนวนน้อยๆมา spot ลงบนแผ่นเดียวกันแล้วเป่าให้แห้ง

2.6.2.3.3 นำแผ่น TLC ใส่ลงใน chromatographic tank ที่บรรจุ developing solvent ซึ่งประกอบด้วย acetone : water : acetic acid = 8:4:3 (v/v) ซึ่งอยู่ในภาวะสมดุล

2.6.2.3.4 ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่ง solvent เคลื่อนที่ถึง solvent front นำ plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ว spray ด้วย 1% dithizone ซึ่งละลายใน ethanol สังเกตเห็น spot ของ standard มีสีแดง ซึ่งมีค่า R_f 0.90 โดยไม่ปรากฏ spot ของตัวอย่าง

2.6.2.4 ตรวจสอบหา Boric acid

2.6.2.4.1 นำสารมาตรฐาน boric acid มาละลายใน 30% ethanol แล้ว spot ลงบน plate ที่เตรียมไว้ และเป่าให้แห้ง

2.6.2.4.2 นำ crude ที่สกัดได้ในครั้งที่ 3 มาละลายใน 30% ethanol จำนวนน้อยๆ แล้ว spot ลงบนแผ่นเดียวกันและเป่าให้แห้ง

2.6.2.4.3 นำแผ่น TLC มาใส่ลงใน chromatographic tank ที่บรรจุ developing solvent ซึ่งประกอบด้วย water : acetic acid = 9.5 : 0.5 (v/v) ซึ่งอยู่ในภาวะสมดุล

2.6.2.4.4 ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่ง solvent เคลื่อนที่ถึง solvent front นำ plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำให้เกิดสีโดย spray ด้วย carmine จะสังเกตเห็น spot สีน้ำเงินของ standard ซึ่งมีค่า R_f 0.80 โดยไม่ปรากฏ spot ของสารตัวอย่าง

2.6.2.5 ตรวจสอบหา SPP

นำ SPP มาตรฐานมาละลายในเอทานอลแล้วจุดลงบนแผ่นTLCที่เตรียมและอบไว้แล้วและนำสารที่สกัดจากถุงมือยางด้วยเอทานอล มาละลายในเอทานอลและจุดลงบนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน เป่าให้แห้ง นำแผ่น TLC ไปวางลงในโครมาโตกราฟิกแทงค์ที่ได้ทำให้อิ่มตัวด้วยสารผสมของบิวทานอล:เมทานอลในอัตราส่วน 7:3 (v/v) โดยระดับของสารละลายผสมต้องอยู่ต่ำกว่า starting line ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับที่กำหนดไว้ จึงนำแผ่น TLC ออกจากแทงค์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วสังเกตสีของจุดสารโดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น

254 nm จะเห็นทั้งจุดสีน้ำตาลของ SPP มาตรฐาน และของ SPP จากถุงมือ โดยค่า R_f ของสารตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.93-0.94 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน คือ 0.93 ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.10 และโครมาโตแกรมแสดงไว้ในแผนภาพที่ 3.4

2.6.2.6 การทดสอบปริมาณสารรักษาสภาพทุติยภูมิ

2.6.2.6.1 การทดสอบ TMTD โดยใช้ uv spectrophometer

วิธีการทดสอบ

เตรียมสารมาตรฐาน TMTD : ชั่ง TMTD หนัก 1.8750 g ละลายใน acetone แล้วปรับปริมาตรด้วย acetone เป็น 1 l ได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm เจือจางลงเป็น 50, 40, 25, 20 และ 10 ppm เพื่อนำไปวัด : uv absorption ที่ความยาวคลื่น 323 nm ได้ผลดังตารางที่ 3.10 แล้วสร้างกราฟมาตรฐานตามแผนภาพที่ 3.5

เตรียมสารละลายตัวอย่าง : ชั่ง erude ที่ได้จากการสกัดถุงมือด้วย acetane มา 0.0050 g ละลายด้วย acetone แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml นำไปวัด absorbance ที่ความยาวคลื่น 323 nm นำค่า absorbance ไปอ่านค่าความเข้มข้นของ TMTD ได้จากกราฟมาตรฐาน (ดูผลจากตารางที่ 3.12) แล้วคำนวณหาปริมาณของ TMTD ในถุงมือดังตัวอย่าง

ค่า absorbance = 0.052

อ่านความเข้มข้นจากกราฟได้ = 27.0 ppm

ปริมาตรของสารละลาย = 50 ml

ชั่งสารจาก crude หนัก = 0.0050 g

การคำนวณ

สารละลาย 10^6 ml มี TMTD = 27 g

" 50 " = $\frac{27 \times 50}{10^6}$ g

ในถุงมือ 1 ข้างมี TMTD = $\frac{27 \times 50}{10^6} \times \frac{0.1741}{0.0050}$ g

ถุงมือหนัก 8.8105 g มี TMTD = $\frac{27x50}{10^6} \times \frac{0.1741}{0.0050}$ g

" 100 g " = $\frac{27x50}{10^6} \times \frac{0.1741}{0.0050} \times \frac{100}{8.8105}$ g

= 0.053 %

บริมาณ TMTD ในถุงมือแสดงไว้ในตารางที่ 3.13

2.6.2.6.2 การทดสอบหา ZDC และ SPP

วิธีทดสอบ

เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียม : ทำตามที่เคยทำมาแล้ว

เตรียมสารละลายมาตรฐานซิงค์ : ชั่ง $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ 3.3560 g ละลายใน double distillated water แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 l ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 ppm เจือจางลงเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm เพื่อนำไปวัด AES

สารละลายตัวอย่างโซเดียม : นำสารที่ได้จากการสกัดด้วย acetone มาละลายด้วยกรดไนตริก 1.6% (w/v) 10 ml แล้วนำไป digest จนใส ทิ้งให้เย็นกรองแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย double distillated water นำไปทดสอบค่า absorbance ด้วย AES ได้ผลดังตารางที่ 3.12

สารละลายตัวอย่างซิงค์ : นำสารที่สกัดด้วยเอทานอลมาละลายด้วยกรดไนตริก 1.6% (w/v) 10 ml แล้วนำไป digest จนใส ทิ้งให้เย็น กรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วย double distillated water นำไปทดสอบค่า absorbance ด้วย AES ได้ผลดังตารางที่ 3.12

คำนวณปริมาณของ ZDC และ SPP ได้จากปริมาณของซิงค์และโซเดียมโดยใช้วิธีการเดียวกับที่คำนวณปริมาณของ TMTD ได้ผลดังตารางที่ 3.13