

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

- 2.1.1 Atomic Absorption Spectrophotometer, รุ่น AA-3100, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation, USA.
- 2.1.2 Hollow cathode lamp of selenium, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation, USA.
- 2.1.3 Hydride generation system, รุ่น MHS-10, ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer Coperation, USA.
- 2.1.4 Digestion system 40, ยี่ห้อ Tecator, รุ่น Digester 1016, ผลิตโดยบริษัท Prabin & Co. AB, Sweden.
- 2.1.5 Vortex genie mixer, รุ่น K-550 GE, ผลิตโดยบริษัท Scientific Industries Inc., USA.
- 2.1.6 หลอดย่อยสลาย(digestion tube) ขนาด 25 x 150 mm.
- 2.1.7 Analytical balance (accurate to ± 1 mg.), ยี่ห้อ Mettler, รุ่น H33, ผลิตโดยบริษัท Mettler Instrument Coperation, USA.
- 2.1.8 Muffle furnace, ยี่ห้อ Thermolyne, Type 1500, ผลิตโดยบริษัท Thermolyne Coperation, USA .
- 2.1.9 Hotplate, ยี่ห้อ Thermolyne, Type 2200, ผลิตโดยบริษัท Thermolyne Coperation, USA .

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 Hydrochloric acid 37%, analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.2 Nitric acid 68 %, analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.3 Sulfuric acid 98 %, analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.4 Perchloric acid 70 %, analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.5 Titrisol of selenium standard solution $1.000 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ (SeCl_2 in water), analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.6 Sodium hydroxide, proanalysis grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.7 Sodium borohydride, Fluka A., Switzerland.
- 2.2.8 Magnesium oxid, analytical grade, E. Merck, Germany.
- 2.2.9 Magnesium nitrate hexahydrate, analytical grade, E. Merck, Germany.

2.2.10 Certified SRM nonfat milk powder NBS1549, NIST, Gaithersburg, USA .

2.2.11 Certified SRM bovine liver NBS1577a, NIST, Gaithersburg, USA .

2.3 การเก็บตัวอย่างนม

ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างนมชนิดต่างๆ ที่จำหน่ายตามท้องตลาดในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ดังต่อไปนี้

2.3.1 นมโคสดยี่ห้อต่างๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง

2.3.2 นมปรุงแต่งรสหวาน รสช็อกโกแลต และอื่นๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง

2.3.3 นมผงสูตรสำหรับเด็กยี่ห้อต่างๆ จำนวน 5 ตัวอย่าง

2.3.4 นมถั่วเหลืองยี่ห้อต่างๆ จำนวน 2 ตัวอย่าง

2.3.5 นมมารดา โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมจากมารดาที่อาศัยอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีระยะเวลาให้นมบุตรหลังคลอดแล้ว 6 สัปดาห์ จำนวน 19 ตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างนมผงจะเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนมชนิดอื่นนั้น จะเก็บไว้ในตู้เย็นแช่แข็ง(freezer)ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเก็บไว้จนกว่าจะวิเคราะห์

2.4 การเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการย่อยสลายเปียกก่อนวิเคราะห์

ปริมาณซิลิเนียมโดยเทคนิค HG – AAS

2.4.1 ชั่งตัวอย่างนมผงน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 1.000 กรัมถึง 2.000 กรัม หรือน้ำนมที่เป็นของเหลวปริมาตรที่แน่นอนระหว่าง 5.0 mL ถึง 10.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลายและใส่เม็ดแก้ว(glass bead)จำนวน 4 เม็ดลงไปในแต่ละหลอดย่อยสลาย ซึ่งเม็ดแก้วจะเป็นตัวทำหน้าที่ช่วยกระจายความร้อนให้แก่สารผสม ในขณะที่ทำการย่อยสลายสารตัวอย่าง

2.4.2 เติมนกรดไนตริกเข้มข้น 68% ปริมาตร 10.0 mL กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 70% ปริมาตร 4.0 mL และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 % ปริมาตร 2.0 mL ลงไปในแต่ละหลอดย่อยสลาย

2.4.3 ปิดปากหลอดย่อยสลายด้วยพาราฟิล์ม แล้วปล่อยตัวอย่างของผสมตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน ซึ่งจะเป็นการย่อยสลายสารตัวอย่างขั้นต้น

2.4.4 นำหลอดย่อยสลายแต่ละหลอดไปวางบนเตาไฟฟ้า(digestion system 40) แล้วให้ความร้อนทำการย่อยสลายสารตัวอย่าง โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาตามตารางที่ 2.1 จนกระทั่งย่อยสลายสารตัวอย่างได้สมบูรณ์ ก็จะได้สารละลายมีสีใสหรือสีเหลืองอ่อน และมีปริมาตรสารละลายเหลืออยู่เพียงประมาณ 2.0 mL ให้ยกหลอดย่อยสลายออกจากเตาไฟฟ้า แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- 2.4.5 นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์แล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL
- 2.4.6 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 % ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลายแต่ละหลอดและปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วเขย่าสารละลายแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย (vortex genie mixer)
- 2.4.7 นำหลอดย่อยสลายทั้งหมดวางบนเตาไฟฟ้าที่ปรับอุณหภูมิคงที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ถึง 30 นาที แล้วยกหลอดย่อยสลายทั้งหมดออกจากเตาไฟฟ้า และตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 2.4.8 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วไปวัดปริมาณซิลิเนียม ด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำตามขั้นตอนทดลองที่ 2.6

ตาราง 2.1 การโปรแกรม อุณหภูมิ เวลา ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีย่อยสลายสลายเปียก

สเกลของเตาไฟฟ้า (ซีดี)	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (ชั่วโมง)
2.0	90	2
2.5	130	2
3.0	160	2
3.5	180	2
4.0	210	2
4.5	250	2

2.5 การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการย่อยสลายเปียก

2.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

- 1) สารละลายมาตรฐาน A (สารละลายมาตรฐาน Se เข้มข้น 1000 ng/mL)
 ดูดสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมที่มีความเข้มข้น 1,000 ug/mL ปริมาตร 0.1 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนถึงขีดปริมาตร
- 2) สารละลายมาตรฐาน B (สารละลายมาตรฐาน Se เข้มข้น 100 ng/mL)
 ดูดสารละลายมาตรฐาน A ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนจนถึงขีดปริมาตร
- 3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม
 - 3.1) ดูดสารละลายมาตรฐาน B ปริมาตร 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลายและใส่เม็ดแก้วลงไปหลอดละ 4 เม็ด
 - 3.2) ทำการย่อยสลายสารละลายตัวอย่างตามขั้นตอน 2.4.2 ถึง 2.4.4
 - 3.3) นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์แล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10.0 mL แล้วทำการทดลองตามขั้นตอน 2.4.6 ถึง 2.4.7
 - 3.4) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวัดหาปริมาณซีลีเนียมด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.6 เมื่อนำผลการทดลองมาเขียนกราฟ ก็จะได้กราฟมาตรฐานซีลีเนียมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมกับความสูงของพีค (peak height)

2.5.2 สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3 % (w/v)

ชั่งสารโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3.0 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0% (w/v) ลงไปจนถึงขีดปริมาตรและเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน สำหรับสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3 % (w/v) ที่เตรียมใช้ในการทดลองจะมีอายุการใช้งานเพียง 1 วันเท่านั้น

2.5.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0% (w/v)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนไปจนถึงขีดปริมาตร แล้วเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน

2.6 วิธีการวัดปริมาณซิลิเนียมในสารละลายตัวอย่างโดยเทคนิค HG-AAS

2.6.1 สภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม

โดยเครื่อง HG-AAS ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น AA-3100

ความยาวคลื่น	196	นาโนเมตร
slit	0.7	นาโนเมตร
ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง	10.0	มิลลิลิตร
diluent	1.5 %	HCl
reductant	3 %	NaBH ₄ in 1 % NaOH
sensitivity check	0.01	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
MHS - 10 : air	110.0	ลิตรต่อนาที
acetylene	3.0	ลิตรต่อนาที
char. mass	2.2	(ng / 1%A)

2.6.2 วิธีการใช้เครื่อง HG-AAS ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น AA-3100⁽³³⁾

1) เปิดสวิตช์เครื่องคอมพิวเตอร์และเครื่อง AAS

2) ทำการ align lamp โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1) ติดตั้งหลอด hollow cathod lamp สำหรับธาตุซิลิเนียมที่จะวิเคราะห์

2.2) ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าเท่ากับ 16 มิลลิแอมแปร์ ความยาวคลื่นเท่ากับ 196

นาโนเมตร และปรับปุ่ม align lamp screws ให้มีค่าพลังงานสูงสุดซึ่งจะสังเกตได้จาก bar chart บนจอภาพจะแสดงค่าพลังงานสูงสุด

2.3) ใส่ค่าพารามิเตอร์ต่างๆสำหรับวิเคราะห์ธาตุซิลิเนียม ดังต่อไปนี้

element: : Se analyst : Tawatchai

wavelength (nm) : 196.0 slit : width (nm) : 0.70

height : high low

signal type ; AA - BG signal measurement : peak height

read time (sec) : 15.0 (0.1 - 60) BOC time(sec) : 0 (0-5)

read delay (sec) : 1.0 (0 - 20)

sample replicates ; 1 (1 - 99) standard replicate : 1 (1-99)

flame type : air / C₂H₂

- 3) เปิดวาล์วท่อ air และวาล์วท่อก๊าซ acetylene โดยปรับอัตราส่วน air : acetylene ให้มีสเกลเท่ากับ 4 : 2 หน่วย แล้วจึงจะจุดไฟโดยกดปุ่ม ignight (สีแดง) เมื่อเปลวไฟติดให้ปรับลดอัตราส่วนของสเกล air : acetylene เป็น 2 : 1 หน่วย
- 4) ค่อยๆ เอียงควอร์ตซ์เซลล์(quartz cell) เข้าหาเปลวไฟให้ warm up ประมาณ 10 ถึง 15 นาที ก่อนที่จะเริ่มทำการวัดปริมาณซิลิเนียมในสารละลายตัวอย่าง
- 5) เทสารละลายมาตรฐานที่เตรียมจากขั้นตอน 2.5 ใส่ในหลอดทำปฏิกิริยา (reaction flask) แล้วต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฮไดรด์(hydride generation system) ทำการวัดสารละลายมาตรฐานที่ละ 1 ตัวอย่างต่อครั้ง เมื่อวัดสารละลายมาตรฐานเสร็จแล้วก็จะวัดสารละลายตัวอย่างนามที่เตรียมเสร็จแล้วจากขั้นตอน 2.4.1
- 6) กดปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์(โดยกดแช่นาน 5 วินาที) พร้อมกับกดปุ่ม read ของเครื่อง AAS (กดปุ่ม read แล้วปล่อยทันที) สำหรับปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์ จะทำหน้าที่ควบคุมการไหลของก๊าซไนโตรเจน ซึ่งจะเป็นตัวพาสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ จากขวดภาชนะบรรจุสารละลาย(reductant reservoir) เข้าไปยังหลอดทำปฏิกิริยา

2.7 การหาสถานะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการย่อยสลายเปียก

ก่อนวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมโดยเทคนิค HG – AAS

2.7.1 การทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดไฮไดรคลอริก

- 1) เตรียมสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 20 ng / mL
 - 1.1) ดูดสารละลายมาตรฐาน A ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลาย และใส่เม็ดแก้ว(glass bead) ลงไปจำนวน 4 เม็ด ซึ่งเม็ดแก้วจะเป็นตัวช่วยกระจายความร้อนในขณะทำการย่อยสลายสารตัวอย่าง
 - 1.2) เติมกรดไนตริกเข้มข้น 68 % ปริมาตร 10.0 mL กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 70 % ปริมาตร 4.0 mL และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 % ปริมาตร 2.0 mL ลงไปในแต่ละหลอดย่อยสลาย
 - 1.3) ปิดปากหลอดย่อยสลายด้วยพาราฟิล์ม แล้วปล่อยตัวอย่างของผสมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน
 - 1.4) นำหลอดย่อยสลายไปวางบนในเตาไฟฟ้า แล้วทำการย่อยสลายสารตัวอย่างโดยใช้อุณหภูมิและเวลา ตามตารางที่ 2.1 จนกระทั่งสารละลายตัวอย่างย่อยสลายสมบูรณ์ จะได้สารละลายสีใสหรือสีเหลืองอ่อนและมี

ปริมาตรสารละลายเหลืออยู่ประมาณ 2.0 mL ให้ยกหลอดค่อยๆ สล่ายออกจากเตาไฟฟ้าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- 1.5) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ค่อยๆ สล่ายเสร็จสมบูรณ์แล้ว ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL แล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 mL และเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน
- 1.6) ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 mL ใส่ในหลอดค่อยๆ สล่าย โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
- 1.7) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 % ที่ปริมาตร 0.0, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 mL ใส่ในแต่ละหลอดค่อยๆ สล่ายตามลำดับ และปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มแล้วเขย่าสารละลายแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย
- 1.8) นำหลอดค่อยๆ สล่ายทั้งหมดวางบนเตาไฟฟ้า ที่ปรับอุณหภูมิให้คงที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วยกหลอดค่อยๆ สล่ายทั้งหมดออกจากเตาไฟฟ้างตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 1.9) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วไปวัดหาปริมาณซิลิเนียม ในสารละลายแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่

2.4.3

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

- 2.1) ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมตามขั้นตอนที่ 2.4.2
- 2.2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในสารละลายตัวอย่างด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่

2.4.3

2.7.2 การทดลองเปลี่ยนแปลงเวลาในการ Incubation ปฏิกริยารีดิวซ์ Se(+6) ให้เป็น Se(+4)

- 1) เตรียมสารละลายตัวอย่างนมขมิ้นแลคแอคควานซ์ ที่มีปริมาณซิลิเนียมเข้มข้น 18.0 ng/mL โดยมีขั้นตอนวิธีทำดังต่อไปนี้
 - 1.1) ชั่งนมขมิ้นแลคแอคควานซ์ 75.0 กรัม เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL เติมน้ำอุ่น (ใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน) ปริมาณ 400 mL ลงไป และปั่นให้นมขมิ้นแลคแอคควานซ์ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องปั่นแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เมื่อนมขมิ้นแลคแอคควานซ์ละลายหมดให้

ตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจาก
ไอออนไปจนถึงขีดปริมาตร และปั่นสารละลายให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง ด้วย
เครื่องปั่นแม่เหล็กไฟฟ้า

- 1.2) ตูดยาสารละลายนิกเกิลและโคบอลต์ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลายและใส่
เม็ดแก้วลงไป 4 เม็ด โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ
- 1.3) เติมกรดไนตริกเข้มข้น 68 % ปริมาตร 10.0 mL กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น
70 % ปริมาตร 4.0 mL และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 98 % ปริมาตร 2.0 mL
ลงไปในแต่ละหลอดย่อยสลาย
- 1.4) ปิดปากหลอดย่อยสลายด้วยพาราฟิล์ม แล้วปล่อยสารผสมตั้งทิ้งไว้ที่
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน
- 1.5) นำหลอดย่อยสลายแต่ละหลอดไปวางบนเตาไฟฟ้า และให้ความร้อน
ทำการย่อยสลายสารตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 2.4.1 นำสารละลายตัวอย่างที่
ย่อยสลายเสร็จสมบูรณ์แล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มี
ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL
- 1.6) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในแต่ละหลอด
ย่อยสลายและปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วเขย่าสารละลายแต่ละ
หลอดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย
- 1.7) นำหลอดย่อยสลายทั้งหมดใส่ในเตาไฟฟ้า ที่ปรับอุณหภูมิให้คงที่ 80
องศาเซลเซียสแล้ว incubation สารละลายตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 10,
20, 30 และ 40 นาที เมื่อครบเวลาช่วง incubation ให้ยกหลอดย่อยสลาย
ออกจากเตาไฟฟ้าตามลำดับ แล้วตั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 1.8) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม
ด้วยเทคนิคHG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6
- 2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม
 - 2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมตามขั้นตอนที่ 2.5
 - 2.2) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม
ด้วยเทคนิคHG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6

2.7.3 การทดลองเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการ incubation ปฏิกริยารีดิวซ์ Se(+6)ให้เป็นSe(+4)

- 1) การเตรียมสารละลายตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์
มีปริมาณซีลีเนียม 18.0 ng/mL
 - 1.1) เตรียมสารละลายตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีปริมาณซีลีเนียม 18.0 ng/mL โดยทำการเตรียมตามขั้นตอนที่ 2.7.2.1
 - 1.2) นำหลอดย่อยสลายทั้งหมดไปวางบนเตาไฟฟ้าที่ปรับอุณหภูมิที่ 60, 70, 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ถึง 30 นาที แล้วยกหลอดย่อยสลายทั้งหมดออกจากเตาไฟฟ้า แล้วตั้งหลอดทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
 - 1.3) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมด้วยเทคนิคHG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6
- 2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม
 - 2.1) วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมทำตามขั้นตอนที่ 2.5
 - 2.2) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวัดปริมาณซีลีเนียมด้วยเทคนิคHG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6

2.7.4 การทดลองวัดอัตราการไหลของสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์

- 1) วิธีการทดลองวัดอัตราการไหลของสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์
 - 1.1) เตรียมสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ 3% ใน 1% NaOH โดยทำตามขั้นตอน 2.5.4
 - 1.2) คัดตั้งหลอดทำปฏิกิริยาเข้ากับเครื่องกำเนิดไฮไดรด์
 - 1.3) เปิดวาล์วถังก๊าซไนโตรเจนให้มีความดัน 36 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
 - 1.4) กดปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์ โดยกดปุ่มนี้ซ้ำกันเป็นเวลาที่ 0, 5, 10 และ 15 วินาทีตามลำดับสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์จะไหลจากขวดสารละลายไปยังหลอดทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆกัน และวัดปริมาตรสารละลายในหลอดทำปฏิกิริยาด้วยกระบอกตวง สำหรับปุ่ม plunger นี้จะทำหน้าที่ควบคุมการไหลของก๊าซไนโตรเจน ซึ่งเป็นตัวพาสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ จากขวดสารละลายเข้าไปยังหลอดทำปฏิกิริยา

2.7.5 การทดลองเปลี่ยนแปลงการเติมปริมาตรละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์

- 1) เตรียมสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 20 ng/mL
 - 1.1) วิธีทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 20 ng/mL จะเตรียมโดยทำตามขั้นตอนที่ 2.7.1
 - 1.2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วไปวัดปริมาณซิลิเนียมด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำตามขั้นตอน 2.6 เพียงแต่เปลี่ยนแปลงการเติมปริมาตรของสารละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์ 3 % ใน 1% โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ปริมาณต่างๆ กันคือ 2.25, 4.50, 9.00 และ 13.50 mL ซึ่งสามารถควบคุมการเติมปริมาตรของสารละลายโดยการกดปุ่ม plunger ของเครื่องกำเนิดไฮไดรด์ โดยกดปุ่มนี้ซ้ำไว้ที่เวลาต่างๆ กันคือเวลา 2, 5, 10 และ 15 วินาทีตามลำดับ
- 2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม
 - 2.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมทำตามขั้นตอนที่ 2.5
 - 2.2) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวัดหาปริมาณซิลิเนียมด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6

2.7.6 การทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นละลายโซเดียมบอโรไฮไดรด์

- 1) เตรียมสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 20 ng/mL
 - 1.1) เตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมเข้มข้น 20 ng/mL โดยทำตามขั้นตอน 2.7.1
 - 1.2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วไปวัดปริมาณซิลิเนียมโดยทำตามขั้นตอน โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย NaBH_4 ใน 1% NaOH ที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 % NaBH_4 ตามลำดับ

2.7.7 การทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการย่อยสลายเปียก

- 1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม
 - 1.1) ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียมตามขั้นตอนที่ 2.5
 - 1.2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมโดยทำการทดลองตามขั้นตอน 2.6
- 2) การเตรียมสารตัวอย่าง
 - 2.1) เตรียมสารละลายตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีปริมาณซิลิเนียม 18.0 ng/mL โดยทำการเตรียมตามขั้นตอนที่ 2.7.2

- 2.2) คัดสารละลายตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์ ที่มีปริมาตรที่แน่นอนและเติมสารละลายมาตรฐานซีลิเนียมใส่ในหลอดย่อยสลายตามตาราง 2.2 และใส่เม็ดแก้วจำนวน 4 เม็ดลงไปในแต่ละหลอดย่อยสลาย นำสารตัวอย่างแต่ละหลอดไปย่อยสลายหรือเตรียมตามขั้นตอน 2.4.1
- 2.3) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณซีลิเนียมด้วยเทคนิคHG-AAS โดยทำตามขั้นตอนที่ 2.6

ตาราง 2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับหาเปอร์เซ็นต์ recovery

สารตัวอย่าง (mL)	เติมstd. B (mL)	ความเข้มข้นซีลิเนียม (ng / mL)		
		สารตัวอย่าง	std.	ความเข้มข้น Se ทั้งหมด
10	0	18	0	18
2	0.2	1.8	10	11.8
5	0.2	9	10	19
10	0.2	18	10	28

สารตัวอย่าง = สารละลายนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีความเข้มข้นของ 18 ng/mL

Std. B = สารละลายมาตรฐานซีลิเนียมเข้มข้น 100 ng / mL

Std. = สารละลายมาตรฐานซีลิเนียม

2.7.8 การทดสอบหาความแม่นยำของการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการย่อยสลายเปียก

- 1) เตรียมสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซีลิเนียม
เตรียมสารตัวอย่างสารละลายมาตรฐานซีลิเนียมตามขั้นตอนที่ 2.5
- 2) การเตรียมสารตัวอย่างนม
ชั่งนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 1.000 กรัมถึง 2.000 กรัมแล้วทำการย่อยสลายเปียกหรือเตรียมตัวอย่างสารละลายโดยทำตามขั้นตอน 2.4.1
- 3) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซีลิเนียมโดยเทคนิค HG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6

**2.8 การวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมในนมชนิดต่างๆ ที่เตรียมตัวอย่าง
ด้วยวิธีการย่อยสลายเปียกก่อนการวิเคราะห์โดยเทคนิค HG-AAS**

2.8.1 วิธีทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

- 1) ทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน โดยทำตามขั้นตอนที่ 2.5
- 2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมโดยทำการทดลองตามขั้นตอน 2.6

2.8.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- 1) ชั่งตัวอย่างนมผงน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 1.000 กรัมถึง 2.000 กรัม หรือน้ำนมที่เป็นของเหลวปริมาตรที่แน่นอนระหว่าง 5.0 mL ถึง 10.0 mL ใส่ในหลอดย่อยสลายแล้วทำการย่อยสลายเปียกโดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.4.1 ถึง 2.4.7
- 2) นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้ว ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมด้วยเทคนิค HG-AAS โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.6

2.9 การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีการเผาแห้ง ก่อนการวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมโดยเทคนิค HG-AAS

2.9.1 สารละลาย ashing aid solution.

ชั่งสาร magnesium nitrate 80 กรัม เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL เติมน้ำกลั่นปราศจากออกซิเจนปริมาตร 200.0 mL และเติม magnesium oxide หนัก 10 กรัม แล้วเขย่าสารละลายให้เข้ากันก่อนที่จะใช้

2.9.2 สารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3 % (w/v)

ชั่งสารโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3.0 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% (w/v) ลงไปจนถึงขีดปริมาตรเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน สำหรับสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 3% (w/v) ที่เตรียมใช้ในการทดลองจะมีอายุการใช้งานเพียง 1 วันเท่านั้น

2.9.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0% (w/v)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากออกซิเจนไปจนถึงขีดปริมาตรแล้วเขย่าขวดสารละลายให้เข้ากัน

2.9.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

1) สารละลายมาตรฐาน A (สารละลายมาตรฐาน Se เข้มข้น 1000 ng/mL)

ดูดสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมที่มีความเข้มข้น 1,000 ug/mL ปริมาตร 0.1 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และเติมน้ำกลั่นปราศจากออกซิเจนจนถึงขีดปริมาตร

2) สารละลายมาตรฐาน B (สารละลายมาตรฐาน Se เข้มข้น 100 ng/mL)

ดูดสารละลายมาตรฐาน A ปริมาตร 10.0 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากออกซิเจนจนถึงขีดปริมาตร

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม

ดูดสารละลายมาตรฐาน B ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 mL ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 10.0 mL แล้วเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานโดยทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.10.2 ถึง 2.10.7

2.10 การเตรียมสารตัวอย่างนมด้วยวิธี การเผาแห้งก่อนวิเคราะห์โดยเทคนิค HG-AAS

- 2.10.1 ชั่งสารตัวอย่างนมผงที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 0.500 ถึง 1.000 กรัม หรือน้ำนม ปริมาตร 5.0 mL และดูดสารละลายมาตรฐาน B ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 mL ทำเทใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 10.0 mL
- 2.10.2 เติมสารละลาย ashing aid 10.0 mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์และเขย่าหรือคนสารละลาย ของผสมให้เข้ากัน
- 2.10.3 นำสารผสมแต่ละบีกเกอร์ไปเข้าเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เพื่อระเหย สารละลายให้แห้งเป็นเวลา 1 คืน
- 2.10.4 นำสารผสมแต่ละบีกเกอร์ไปเข้าเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูง (muffle furnace) แล้วเพิ่ม อุณหภูมิตามโปรแกรมดังแสดงในตาราง 2.2 เมื่อครบเวลาตามที่โปรแกรมไว้ให้ปิด สวิตซ์ไฟฟ้า ทั้งสารตัวอย่างให้อยู่ในเตาเผาไฟฟ้าเป็นเวลา 1 คืน
- 2.10.5 นำสารตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ออกจากเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูง ถ้าได้เถ้า (ash) เป็นสีขาว แสดงว่าเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ ให้นำสารตัวอย่างมาเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10.0 mL และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 15.0 mL
- 2.10.6 นำสารตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ ไปต้มบนเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 204 องศาเซลเซียสจน กระทั่งตะกอนเถ้าละลายหมด ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 204 องศาเซลเซียสจน สารละลายทั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 2.10.7 นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม ตามขั้นตอนที่ 2.6

ตาราง 2.3 การทำโปรแกรม อุณหภูมิ เวลา ในการเตรียมตัวอย่าง ด้วยวิธีเผาแห้ง

สเกลของเตาเผาไฟฟ้า อุณหภูมิสูง (ซีดี)	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (นาที)
20	90	0 – 15
30	140	15 – 30
40	220	30 – 45
50	310	45 – 60
60	420	60 – 75
70	500	75 - 90

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของเตาเผาไฟฟ้าถึง 500 องศาเซลเซียสให้ปรับปุ่มสเกลของเตาเผาที่ขีด 50 เป็นเวลา 5 นาที แล้วปรับปุ่มสเกลของเตาเผาที่ขีด 40 เป็นเวลาอีก 60 นาที ซึ่งจะใช้เวลารวมทั้งหมด 150 นาที ให้ปิดสวิทช์ของเตาไฟฟ้าปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

2.11 การหาสถานะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีเผาแห้ง

ก่อนวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียมโดยเทคนิค HG- AAS

2.11.1 การทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิลิเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซิลิเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.9.2 นำผลการทดลองมาเขียนกราฟจะได้กราฟมาตรฐานซิลิเนียมเป็นเส้นตรงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 12 ng/mL

2) การเตรียมตัวอย่างนมซิมิลแลคแอคควานซ์

2.1) ชั่งนมซิมิลแลคแอคควานซ์ที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 1.000 ถึง 2.000 กรัม แล้วทำการทดลองตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.10.2 ถึง 2.10.4

2.2) นำสารตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ออกจากเตาเผาไฟฟ้าอุณหภูมิสูง ถ้าได้เถ้า (ash) เป็นสีขาวแสดงว่าเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ ให้นำสารตัวอย่างมาเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่มีความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 mol/L ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25.0 mL ตามลำดับ

2.3) นำสารตัวอย่างแต่ละบีกเกอร์ไปต้มบนเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 204 องศาเซลเซียสจนตะกอนเถ้าละลายหมดแล้วกลั่นสารละลายแต่ละบีกเกอร์ออกจากเตาไฟฟ้าแล้วตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.4) นำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณซิลิเนียม โดยทำตามการทดลองขั้นตอนที่ 2.6

2.11.2 การทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์

- 1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม
เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.9.2 ถ้านำผลการทดลองมาเขียนกราฟจะได้กราฟมาตรฐานซีลีเนียมที่เส้นตรงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 12 ng/mL
- 2) การเตรียมตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์
 - 2.1) ชั่งนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 1.000 ถึง 2.000 กรัม แล้วทำการทดลองตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.10.2 ถึง 2.10.6
 - 2.2) นำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียม ตามวิธีการทดลองขั้นตอนที่ 2.6 โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นที่ 1 %, 2 %, 3 % และ 4 % ของสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ ใน 1 % NaOH ตามลำดับ

2.11.3 การทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการเตรียมตัวอย่างนมด้วยวิธีเผาแห้ง ก่อนวิเคราะห์โดยเทคนิค HG – AAS

- 1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม
เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.9.2 ถ้านำผลการทดลองมาเขียนกราฟจะได้กราฟมาตรฐานซีลีเนียมที่เส้นตรงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 12 ng/mL
- 2) การเตรียมตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์
 - 2.1) ชั่งนมผงซีมิแลคแอควานซ์ ที่มีน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 0.500 ถึง 1.000 กรัม เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 10 mL แล้วเติมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียมเข้มข้น 100 ng/mL ปริมาตร 1 และ 2 mL และเติมสารละลาย ashing aid ปริมาตร 10.0 mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์ แล้วคนสารผสมด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน
 - 2.2) ทำการทดลอง ตามขั้นตอนที่ 2.10.3 ถึง 2.10.7

2.11.4 การทดสอบหาความแม่นยำในการเตรียมสารตัวอย่างด้วยวิธีการเผาแห้ง

ก่อนวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมโดยเทคนิค HG-AAS

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.9.2 ถ้านำผลการทดลองมาเขียนกราฟจะได้กราฟมาตรฐานซีลีเนียมที่เส้นตรงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 12 ng/mL

2) การเตรียมตัวอย่างนมซีมิแลคแอควานซ์

2.1) ชั่งนมซีมิแลคแอควานซ์ที่มีน้ำหนักแน่นอนระหว่าง 1.000 ถึง 2.000 กรัม จำนวน 11 ครั้ง แล้วทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.10.2 ถึง 2.10.7

2.12 การวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมในนมชนิดต่างๆที่เตรียมตัวอย่างด้วย

วิธีการเผาแห้งก่อนวิเคราะห์โดยเทคนิค HG-AAS

2.12.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard ของซีลีเนียม โดยทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.9.2 ถ้านำผลการทดลองมาเขียนกราฟจะได้กราฟมาตรฐานซีลีเนียมเป็นเส้นตรงที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 12 ng/mL

2.12.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- 1) ชั่งตัวอย่างนมผงที่มีน้ำหนักที่แน่นอนระหว่าง 1.000 ถึง 2.000 หรืออนมที่เป็นของเหลวที่มีปริมาตรที่แน่นอนระหว่าง 5.0 ถึง 10.0 mL ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 10 mL และเติมสารละลาย ashing aid ปริมาตร 10.0 mL ลงไปในแต่ละบีกเกอร์ โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วคนสารผสมด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน
- 2) ทำการทดลองตามขั้นตอนที่ 2.10.3 ถึง 2.10.7