บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

วัตถุดิบ 1. เชื้อแบคทีเรีย

- เชื้อแบคทีเรียในทะเลที่สร้างโพลิเมอร์ขึ้นภายนอกเซลล์ที่แยกได้จากบริเวณท่าเรือน้ำลึก อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา (CNBP001)

2.น้ำทะเล

- จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ.เมือง จ. สงขลา

3.อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

- NA
- สูตร A
- สูตร B
- สูตร C

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, Tomy, SS-325)
2. เยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตต 0.45 ไมครอน (Sartorius)
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (LMS, VS-8480 SRN)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Universal 32/32R)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Atomic absorption spectrophotometer: AAnalyst 100 spectrometer, PerkinEmer)
6. เครื่องวัด pH (Mettler, Toledo 320)
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (LA230s, Sartorius)
8. ตู้เย็น
9. ตู้ควัน

10. อุปกรณ์สำหรับการถ่ายเชื้อ การแยกเชื้อ และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
11. อุปกรณ์สำหรับการป้องกันสารเคมีอันตราย

สารเคมี

1. Proteose-peptone (Himedia)
2. Yeast extract
3. Lead nitrate ($Pb(NO_3)$) $4H_2O$ (Unilab)
4. Beef extract
5. Peptone (Ajax Finechem)
6. Agar
7. Ethanol (commercial grade)
8. Methanol (commercial grade)
9. Acetone (commercial grade)
10. Sucrose (Ajax Finechem)
11. Potassium hydrogen phosphate ($KHPO_4$) (Ajax Finechem)
12. Sodium nitrate ($NaNO_3$) (Ajax Finechem)
13. Magnesium sulfate ($MgSO_4$) (Ajax Finechem)
14. NaCl (Ajax Finechem)
15. น้ำกลั่น
16. Cadmium nitrate $(CdNO_3)_2$ $4H_2O$ (Carlo Erba)
17. Nickel nitrate $(NiNO_3)_2$ $4H_2O$ (Carlo Erba)
18. Manganese nitrate $(MnNO_3)_2$ $4H_2O$ (PRS Panreac)
19. Cellulose acetate 0.45 micron (Sartorius)
20. Deionized water
21. n-butanol
22. Sulfuric acid

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียในทะเลจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนด้วยตะกั่ว

ในขั้นตอนนี้จะทำการแยกเชื้อที่เก็บมาจากตะกอนดินทะเล ขวดพลาสติก เศษขยะที่อยู่ในทะเล และน้ำทะเลรวมทั้งหมด 8 แหล่งจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของตะกั่วที่บริเวณท่าเรือสงขลา อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา โดยตัวอย่างที่เก็บจะทำการใส่ถุงแช่เย็นไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการแยกเชื้อต่อไป

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างโพลิเมอร์ชีวภาพ และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีตะกั่ว ทำได้โดยนำตัวอย่างไปทำเจือจางด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อและทำการ spread plate ตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 125 พีพีเอ็ม เป็นองค์ประกอบแล้วทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างโพลิเมอร์ดูดซับกับตะกั่ว

ในขั้นตอนนี้จะนำเอาแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีตะกั่วที่ระดับความเข้มข้น 125 พีพีเอ็มเป็นองค์ประกอบ สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างโพลิเมอร์ชีวภาพ โดยจะสังเกตจากลักษณะโคโลนีจะมีเมือกเยิ้ม

3. การแยกแบคทีเรียที่สามารถดูดจับกับตะกั่วให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

ขั้นตอนนี้เป็นการแยกเชื้อแบคทีเรียให้มีความบริสุทธิ์โดยการนำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2 มาถ่ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตะกั่วจนมีโคโลนีเดี่ยวเจริญขึ้นมาแล้วนำแต่ละโคโลนีมาเก็บไว้ใน NA slant เพื่อที่จะได้นำไปศึกษาว่าเชื้อตัวใดสามารถที่สร้างโพลิเมอร์ดูดจับกับตะกั่วได้ดีที่สุดในขั้นตอนต่อไป

4. จำแนกชนิดของเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างโพลิเมอร์ดูดซับกับตะกั่ว

4.1 ทดสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม ดูรูปร่างของเซลล์

4.2 ทดสอบทางชีวเคมี (ตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984))

ทดสอบคาตาเลส (catalase test) การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (oxidation-fermentation test)

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลิเมอร์ชีวภาพที่ดูดซับตะกั่ว

5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตโพลิเมอร์

5.1.1 การแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

โดยใช้แหล่งของคาร์บอนจากธรรมชาติ เช่นน้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง และวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร เป็นต้น และคัดเลือกให้ได้แหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมมากที่สุดโดยพิจารณาจากปริมาณของโพลิเมอร์ที่แยกได้และมีความสามารถในการดูดซับตะกั่วจากสูตรอาหาร C (ภาคผนวก ข) ที่แปรผันแหล่งของคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส กลูโคส และโมลาส ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะพีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของคาร์บอนที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์และมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.1.2 แปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้สูตรอาหารที่ผ่านการหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเป็นมาตรฐานแล้วแปรผันแหล่งของไนโตรเจนจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ยีสต์สกัด เปบโตน และ นมถั่วเหลือง ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆกัน ทำการเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของไนโตรเจนที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2 ปัจจัยทางกายภาพในการเลี้ยงเชื้อ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับผลิตโพลิเมอร์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 มาศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้

5.2.1 พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ค่า 3, 5, 7, 8, 10 และ พีเอชชุดควบคุมตามลำดับ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบค่าของพีเอชที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2.2 อุณหภูมิ

เลือกพีเอชที่ดีที่สุดจากข้อ 5.2.1 มาศึกษาช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโพลิเมอร์ที่ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการให้อากาศที่ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบค่าอุณหภูมิที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5.2.3 ความเร็วรอบในการเขย่า

เลือกอุณหภูมิที่ดีที่สุดจากข้อ 5.2.2 มาศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตโพลิเมอร์ที่ความเร็วรอบ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เปรียบเทียบความเร็วรอบในการเขย่าที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2.4 การชักนำการสร้างโพลิเมอร์

นำอาหารสูตร C ที่ได้คัดเลือกการหาแหล่ง คาร์บอน ไนโตรเจน พีเอช อุณหภูมิและอัตราการให้อากาศมาทำการเลี้ยงเชื้อโดยทำการทดลอง 2 ชุด โดยการทดลองชุดแรกมีการเติมตะกั่วที่มีความเข้มข้น 50, 150 และ300 ppm ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนอีกชุดหนึ่งไม่ต้องเติมตะกั่วเพื่อเป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบปริมาณการผลิตโพลิเมอร์ที่ให้ปริมาณโพลิเมอร์มากที่สุดและมีความสามารถในการดูดซับโลหะตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ดีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.3 การแยกโพลิเมอร์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการแยกโพลิเมอร์โดยวิธีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกที่ความเร็ว 5000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกสารละลายส่วนใสและตัวเซลล์ออกจากกัน หลังจากนั้นนำสารละลายส่วน

ใสไปตกตะกอนด้วย เอทานอลในอัตราส่วน 1: 4 (สารละลายส่วนใส: เอทานอล) ทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 9000 รอบ/ นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสและโพลิเมอร์ออกจากกัน นำโพลิเมอร์ที่ได้ไปละลายใน deionized water แล้วตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลอีกครั้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 3 ครั้งเพื่อให้ได้โพลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ในการหาสภาวะที่เหมาะสม (ดัดแปลงจาก Shina *et al*., 2001)

5.4 การทดสอบการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์

นำโพลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 0.1 % w/v ใส่ลงไปในสารละลายตะกั่วที่ความเข้มข้น 125 ppm (โดยละลายตะกั่วใน deionized water) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นกรองโพลิเมอร์ออกจากสารละลายตะกั่วด้วยเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตต 0.45 ไมครอน เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง AAS

นำสารละลายส่วนใสจากข้อ 5.4 ที่ได้มาทำการเจือจางด้วย 2% nitric acid ให้ตัวอย่างถูกเจือจางลง 50 เท่า และทำการวัดตัวอย่างของสารละลายตะกั่วที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 217 นาโนเมตร

การคำนวณปริมาณตะกั่วที่เหลืออยู่หลังจากถูกดูดซับ

ปริมาณของตะกั่วที่เหลืออยู่ = ค่าความเข้มข้นที่อ่านได้จากเครื่อง × 50

* หมายเหตุ ค่าความคลาดเคลื่อนของเครื่องที่ยอมรับได้เท่ากับ 20 %

5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 14.00 วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way ANOVA โดย significance level = 0.05

6. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการตกตะกอนแยกโพลิเมอร์ชีวภาพ

ในขั้นตอนนี้จะทำการแยกโพลิเมอร์ที่ได้เลี้ยงในสภาวะข้างต้น โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล เมทานอล และ อะซิโตน คัดเลือกตัวทำละลายที่สามารถตกตะกอนโพลิเมอร์ได้ในปริมาณสูงสุดโดยนำสารละลายส่วนใสที่แยกได้จากสภาวะที่เหมาะสม มาเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:4 ทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 20 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนมาเติมตัวทำละลายอีกครั้งในอัตราส่วน 1 :4 ทิ้งค้างคืนไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้ได้โพลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจาก Shina *et al*., 2001) โพลิเมอร์ที่ได้ไปทดสอบการดูดซับตะกั่วซึ่งจะทำการเลือกเพื่อหาตัวตกตะกอนที่เหมาะสม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. ศึกษาวิธีการประยุกต์ใช้

7.1 ศึกษาความสามารถในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่แยกได้

7.1.1 ศึกษาโพลิเมอร์ปริมาณ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่ความเข้มข้น 125 ppm โดยนำปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้แปรผันมาแล้วใส่ลงในสารละลายของตะกั่ว 125 ppm (โดยละลายตะกั่วใน deionized water) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วนำมากรองด้วยเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนนำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่วด้วยเครื่อง AAS ที่ค่าการดูดกลืนแสง 217 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7.1.2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ระยะเวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณของโพลิเมอร์ที่ดีที่สุดที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วจากข้อ 7.1.1 ใส่ลงในสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่ความเข้มข้น 125 ppm โดยนำปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้แปรผันมาแล้วใส่ลงในสารละลายของตะกั่ว 125 ppm ปริมาณ 50 มิลลิลิตรเป็นเวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนนำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่วด้วยเครื่อง AAS ที่ค่าการดูดกลืนแสง 217 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7.1.3 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วของโพลิเมอร์ที่ 3, 5 และ 10 โดยใช้ปริมาณของโพลิเมอร์ที่ดีที่สุดที่ใช้ในการดูดซับตะกั่วจากข้อ 7.1.1 ใส่ลงในสารละลายตะกั่วมาตรฐานที่ความเข้มข้น 125 ppm โดยนำปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้แปรผันมาแล้วใส่ลงในสารละลายของตะกั่ว 125 ppm ปริมาณ 50 มิลลิลิตรที่พีเอช ที่ 3, 5 และ 10 โดยใช้เวลาที่ดีที่สุดจากข้อ 7.1.2 แล้วนำมากรองด้วยเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนนำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่วด้วยเครื่อง AAS ที่ค่าการดูดกลืนแสง 217 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7.2 ศึกษาผลของโลหะหนักอื่นๆที่มีผลต่อการดูดซับของโพลิเมอร์

Leung และคณะ (2001) ได้ศึกษาพบว่า *Pseudomonas pseudoalcaligenes* สามารถที่จะดูดซับโลหะตะกั่วได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับโลหะหนักตัวอื่นๆอีกทั้งประจุที่อยู่บนโพลิเมอร์จะมีความสามารถที่จะจับกับประจุของโลหะหนักได้แตกต่างกัน (Gutnick and Bach, 2000) จึงทำให้การจับโลหะหนักมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อโลหะหนักชนิดใดที่สามารถที่จะจับกับโพลิเมอร์ได้ดีที่สุดแล้วจะเกิดการสร้าง anionic co-ion

- แมงกานีส (ดัดแปลงจาก Pulsawat *et al*., 2001)

ทำการศึกษาความสามารถในการดูดซับโลหะแมงกานีสโดยหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในดูดซับนิเกิลที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, 100 ppm โดยนำเอาปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้ จากข้อ 7.1.1 ใส่ในสารละลายที่มีไอออนของแมงกานีสที่ความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ทดลองในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 120 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนนำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแมงกานีสด้วยเครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 279.5 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- แคดเมียม (ดัดแปลงจาก Leung *et al*., 2001)

ทำการศึกษาความสามารถในการดูดซับโลหะแคดเมียมโดยหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในดูดซับนิเกิลที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, 100 ppm โดยนำเอาปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้ จากข้อ 7.1.1 ใส่ในสารละลายที่มีไอออนของแคดเมียมที่ความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ทดลองในปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็น

เวลานาน 120 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน นำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 228.5 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- สารละลายผสมของโลหะหนักข้างต้น (มากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป) (ดัดแปลงจาก Volesky and Holan, 1995)

โดยนำเอาปริมาณของโพลิเมอร์ที่ได้จาก 7.1.1ใส่ในสารละลายที่มีไอออนของตะกั่วที่ความเข้มข้นของตะกั่วดีที่สุด ผสมกับสารละลายที่มีไอออนของโลหะแคดเมียมที่มีความสามารถในการดูดซับที่ดีที่สุด ในปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และทำชุดควบคุมของโลหะทั้ง 2 ชนิดเพื่อทดสอบว่าถ้าผสมสารทั้ง 2 ชนิดแล้วจะมีการตกตะกอนของโลหะผสมหรือไม่ นำทั้ง 2 ชุดการทดลองไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 120 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำตัวอย่างไปกรองด้วยเยื่อกรองเซลลูโลสอะซิเตทขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอนนำสารละลายส่วนใสที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารตะกั่ว และแคดเมียมที่ใช้ทดลอง ด้วยเครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 228.5 นาโนเมตรสำหรับแคดเมียม และที่ความยาวคลื่น 217 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ

8. ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโพลิเมอร์

8.1 ศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของโพลิเมอร์

- Fourier- transform infrared (FT - IR) microspectroscopy

นำโพลิเมอร์ที่ได้มา 1 กรัมทำการ freeze drying เพื่อส่งตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์เพื่อหาหมู่ฟังก์ชันของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (Model EQUINOX 55 , Bruker) โดยใช้เทคนิค KBr pellet ซึ่งนำตัวอย่างมาบดผสมกับ KBr ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย FT-IR ซึ่งช่วงคลื่นที่ใช้ทดสอบอยู่ระหว่าง 4,000-400 cm^{-1}

- Thin Layer Chromatography (ภาคผนวก ก)

หยดตัวอย่างโพลิเมอร์ที่ผ่านการย่อยด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) และสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกลูโคส ซูโครส ไซโลส แลคโตส กาแลคโตส แรมโนส ที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ลงบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) ที่เตรียมไว้ นำโครมาโทกราฟีแผ่นบางจุ่มลงไป

ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ได้เตรียมไว้และทำการตรวจหาสารบนโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยพ่นด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นผสมกับเมทานอล และนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส จะปรากฏตำแหน่งของน้ำตาลและตัวอย่างบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของตัวอย่างน้ำตาลมาตรฐาน

- Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry

นำโพลิเมอร์ที่ได้มา 15 มิลลิกรัมมาระเหยเอาน้ำออก หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยใช้เครื่อง Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry 500 MHz (Model UNITY INOVA, Varian) โดยใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิงบอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ซึ่งมี D_2O เป็นตัวทำละลายของโพลิเมอร์

8.2 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์

- Gel Permeation Chromatography (GPC)

นำโพลิเมอร์ที่ได้มา 500 ไมโครกรัมทำการ freeze drying หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์โดยใช้เครื่อง Gel Permeation Chromatography, Waters 600 E ซึ่งใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel linear (MW resolving range = 1,000 – 20,000,000) และ guard column ในการแยกขนาดของโมเลกุลซึ่งใช้ Pullulans ที่มีMW 5,900 – 788,000 เป็นตัวมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างโพลิเมอร์ที่วิเคราะห์ โดยใช้ Refractive Index Detector เป็นตัวจับสัญญาณของตัวอย่าง