ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ซีโอดีโดยวิธี Closed reflux titrimetric (APHA AWWA and WEF, 1998)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. หลอดทดสอบทนความร้อนขนาด 16ี100 มิลลิเมตร
2. เตาให้ความร้อน
3. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
4. ฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.01667 นอร์มอล เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่งโมง จำนวน 4.903 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร และเมอร์คิวรีซัลเฟต($HgSO_4$) ชนิดผลึกบริสุทธิ์หรือเป็นผง 33.3 กรัม ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนปรับปริมาตร 1 ลิตร

2. Sulfuric acid reagent เตรียมโดยละลายซิลเวอร์ซัลเฟต ($AgSO_4$) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมากอาจใช้เวลา 1-2 วันจึงละลายหมด

3. สารละลายเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ เตรียมโดย ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_6N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และ เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ferrous ammonium sulfate: FAS) เตรียมที่ความเข้มข้น 0.10 นอร์มอล เตรียมสารละลายโดยละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต Fe $(NH_4)_2.6H_2O$ จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตร 1 ลิตร

<u>การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต (0.01667 นอร์มอล) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเติม Sulfuric acid reagent 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

<u>การคำนวณความเข้มข้นสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

$$\text{ความเข้มข้น FAS (นอร์มอล)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายโพแทสเซียสไดโตรเมตร (มล.)} \times 0.1}{\text{ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

วิธีการ

1. เติมตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม (ซีโอดีระหว่าง 500-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) 2.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบสำหรับย่อยตัวอย่างขนาด 16100 มิลลิเมตร

2. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อป้องกันการระเบิดเนื่องจากความร้อนสะสมจาก Sulfuric acid reagent ที่ก้นหลอด

3. กลั่นกลับในเตากลั่นตัวอย่างที่อุณหภูมิ 148 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเตา

4. เทสารละลายในหลอดใส่ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ชะสารละลายที่ตกค้างในหลอดด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

5. เติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรทโพแทสเซียมไดโครเมตรที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวปนน้ำเงินเป็นสีน้ำตาลปนแดง ทำ blank เช่นเดียวกับตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

หลอดทดสอบต้องกำจัดสารอินทรีย์ตกค้างโดยล้างด้วยกรดซัลฟูริกร้อยละ 20 ตามด้วยการล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง และอบแห้งก่อนใช้

การคำนวณค่าซีโอดี

$$\text{ซีโอดี (มล.ต่อลิตร)} = \frac{(A - B) \times N \times 8{,}000}{\text{ปริมาตัวอย่าง (มล.)}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มอล)

2. การวัดสี โดยวิธีเปรียบเทียบแพลทตินัมโคบอลต์มาตรฐาน (Platinum cobalt standard) (APHA AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือ

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

สารละลายมาตรฐานคลอโรแพลทติเนท

สารละลายโพแทสเซียมคลอโรแพลทติเนท 0.1246 กรัม และผลึกโคบอลตัสครอไรด์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดไฮดรอครอริกเข้มข้นอยู่ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 100 มิลลิลตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่ทีความเข้มข้นสีเท่ากับ 500 หน่วยสี

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มสี 0-500 หน่วยสี

Table-Appendix 1 Preparation of standard color solution concentration 0-500 color units

Standard color solution conc. (color units)	Volume of standard color solution 500 units (ml)
0	-
10	0.5
20	1.0
30	1.5
40	2.0
50	2.5
100	5.0
150	7.5
200	10.0
250	12.5
300	15.0
350	17.5
400	20.0
450	22.5
500	25.0

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสีระหว่าง 0-500 หน่วยสีจากสารละลายมาตรฐานได้ตามตารางภาคผนวกที่ 1 เตรียมสารละลายสีมาตรฐานเข้มข้นต่างๆ โดยปิเปตสารสารละลายสีมาตรฐาน (500 หน่วยสี) ตามปริมาตรที่กำหนดในแต่ละความเข้มข้น ปรับปริมาตร 25 มิลลิลตรด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำมาแยกตะกอนโดยใช้เครื่องเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อกำจัดของแข็งแขวนลอยจนได้ตัวอย่างที่ใส

2. ตัวอย่างส่วนใสเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางเหมาะสม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อทราบค่าสีของตัวอย่าง

การคำนวณค่าสี

หน่วยสี (color units) = CD

เมื่อ C คือ ค่าสีที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (color units)

D คือ อัตราการเจือจางตัวอย่าง

การคำนวณร้อยละการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นสีในตัวอย่างน้ำ

เนื่องการกำจัดสีมีผลให้ความเข้มสีของน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มลดลงหรือเพิ่มขึ้นแตกต่างกันซึ่งหมายถึงประสิทธิภาพในการกำจัดสีของวิธีการในแต่ละขั้นตอน เพื่อหาวิธีการกำจัดสีที่เหมาะสมที่สุด จึงพิจารณาจากร้อยละความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลง

$$\text{ร้อยละความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลง} = \frac{((C_F D_F) - (C_B D_B))}{C_B D_B} 100 = A$$

เมื่อ C_B = ค่าสีตัวอย่างน้ำเริ่มต้นที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

C_F = ค่าสีตัวอย่างน้ำหลังการกำจัดสีแล้วที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

D_B = อัตราการเจือจางตัวอย่างน้ำเริ่มต้น

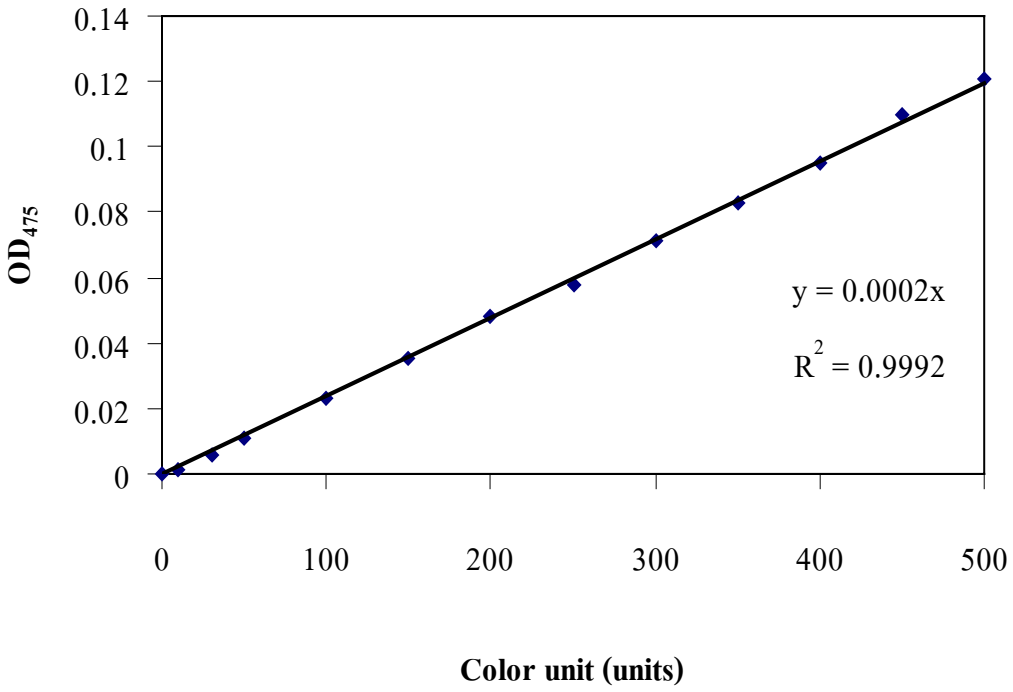
D_F = อัตราการเจือจางตัวอย่างน้ำหลังการกำจัดสีแล้ว

การแปลความหมายจากค่าที่ได้

ร้อยละความเข้มสีที่เปลี่ยนแปลง

- A หมายถึง น้ำที่ผ่านการกำจัดสีแล้วมีสีเข้มกว่าเดิมร้อยละ A

+A หมายถึง น้ำที่ผ่านการกำจัดสีแล้วมีสีจางกว่าเดิมร้อยละ A



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายสีมาตรฐานด้วยวิธี platinum cobalt standard (OD_{475})

Figure-Appendix 1 Standard curve of standard color solution by platinum cobalt standard (OD_{475}) method

3. สารฟีนอล (Substances Reducing Folin's Phenol) (จินตนา แก้วบริสุทธิ์ (2541) ดัดแปลงจากวิธีการหาแทนนิน APHA AWWA and WEF (1998))

<u>เครื่องมือ</u>

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

<u>สารเคมี</u>

1. น้ำยาคาร์บอเนต-ทาร์เทรต

ละลาย $Na_2C_4H_4O_6.2H_2O$ จำนวน 12 กรัม ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 750 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องก่อนปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

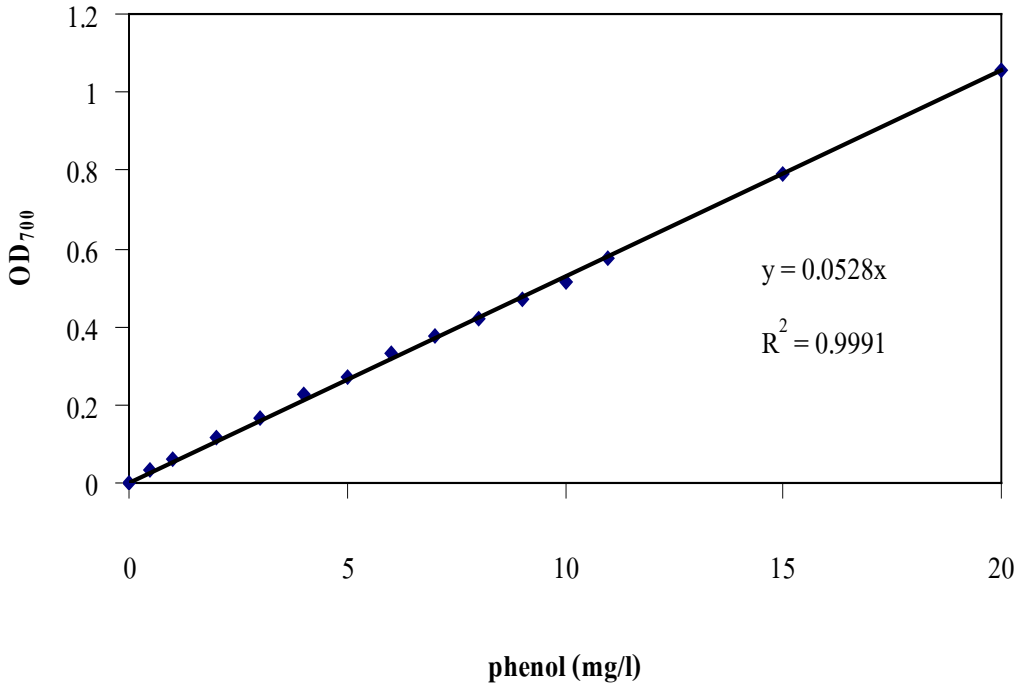
2. น้ำยาโฟลินส์ฟีนอล

วิธีการ

1. นำน้ำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. เติมโฟลินส์ฟีนอล 0.1 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำยาคาร์บอเนต-ทาร์เทรต 1.0 มิลลิลิตร
4. รอให้เกิดสี 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ
6. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1-5

การคำนวณ

ความเข้มข้นฟีนอล (มิลลิกรัม/ลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง × ความเจือจาง
ความชันกราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายฟีนอล

Figure-Appendix 2 Standard curve of phenol solution

4. ของแข็งทั้งหมด (Total solid) (APHA AWWA and WEF, 1998)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหยที่ล้างสะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยสำหรับระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 45 นาที
6. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (มิลลิกรัม)} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

5. น้ำหนักเส้นใยแห้ง (Mycelia dry weight) (ดัดแปลงจาก AOAC., 1999)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานแก้วเลี้ยงเชื้อ
2. ผ้าขาวบาง
2. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 103 องซาเซลเซียส
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เตรียมจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ล้างสะอาดและผ้าขาวบางตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตรหรือน้อยกว่า กรองผ่านผ้าขาวบางซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

3. นำเส้นใยบนผ้าขาวบางวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

4. อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

5. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 45 นาที

6. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

ชุดควบคุมคือเส้นใยในน้ำทิ้งเริ่มต้น (วันเริ่มต้นการทดลอง) ทำเช่นเดียวกับข้อ 1-6

<u>การคำนวณน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เพิ่มขึ้น</u>

$$\text{น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)} = \left(\frac{\text{น้ำหนักแห้งของเส้นใยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักแห้งเส้นใยชุดควบคุม}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}\right) 1{,}000$$

6. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi- Nelson (Nelson, 1954)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดีนัมบลู (molybdenum blue) ดังปฏิกิริยา

1. $2Cu^{2+}$ + reducing sugar ⟶ CuO_2
2. $Cu_2O + H_2SO_4$ ⟶ $2Cu^{+}$
3. $2Cu^{+} + MoO_4^{2+}$ ⟶ $2Cu^{2+}$ + molybdenum blue

<u>อุปกรณ์</u>

เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์

<u>สารเคมี</u>

1. Somogyi Reagent

Solution I : ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	12	กรัม
Na_2CO_3(anhydrous)	24	กรัม
$NaHCO_3$	16	กรัม
Na_2SO_4 (anhydrous)	144	กรัม

น้ำกลั่น

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร)

Solution II : ประกอบด้วย

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

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

2. Nelson Reagent

2.1 สารละลาย ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

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 ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในขวดสีชา

<u>วิธีการ</u>

1. ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโคส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดกลาง

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

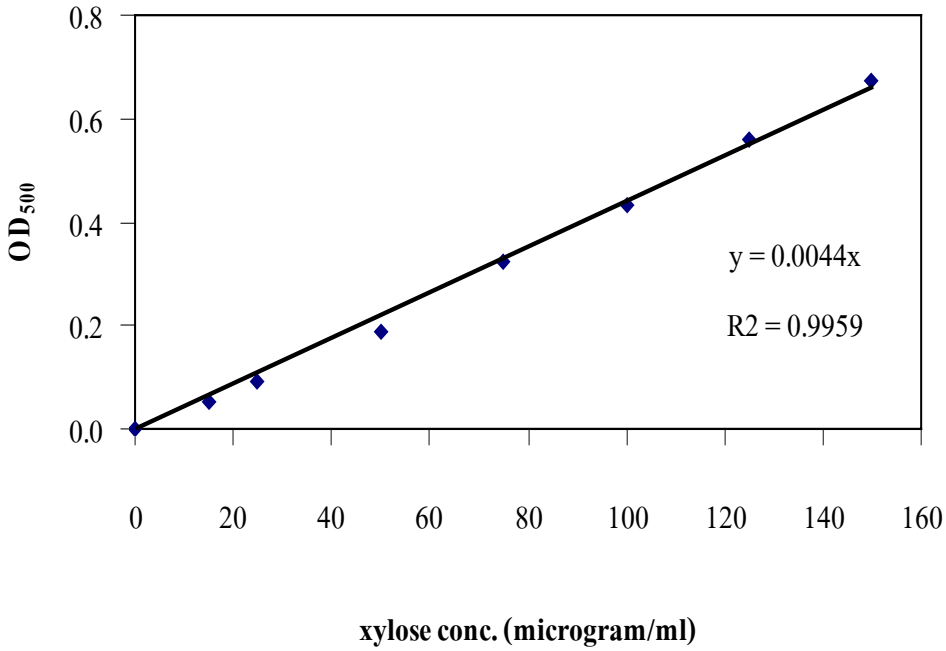
3. เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล

blank เติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-4 เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ไซโลสหรือกลูโคส)

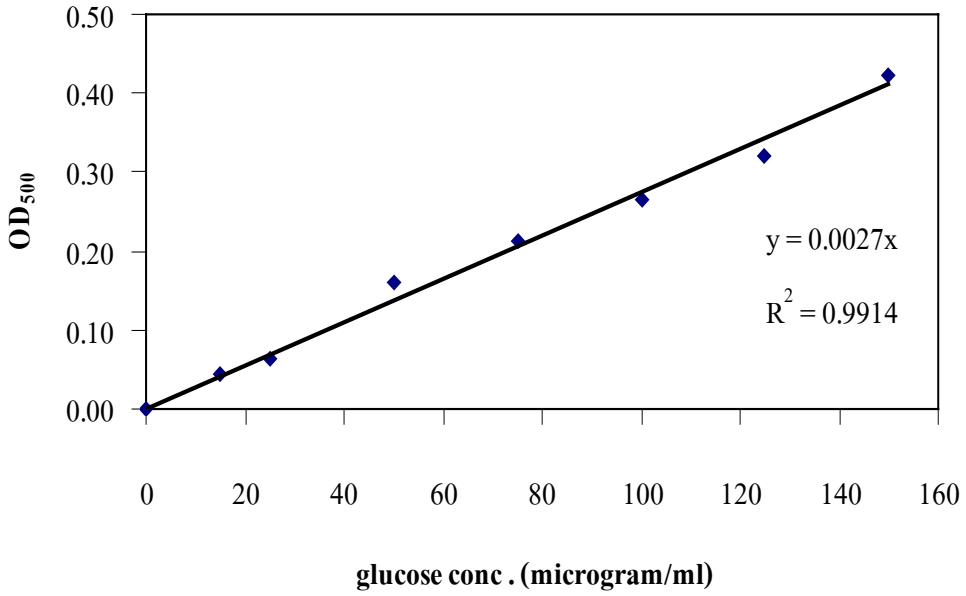
การเตรียมสารละลายกลูโคสหรือไซโลสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายดีแล้วดูดมา 2 มิลลิลิตรใส่ใน volumetric flask ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคสหรือไซโลส ความเข้มข้น 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลส วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

Figure-Appendix 3 Standard curve of standard solution xylose analysis by Somogyi-Nelson method



ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส วิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

Figure-Appendix 4 Standard curve of standard solution glucose analysis by Somogyi-Nelson method

7. การวิเคราะปริมาณโปรตีนวิธีของ Lowry (Lowry *et al*., 1951)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายด้วย Folin- ciocatrus phenol สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวกว่าวิธีไบยูเรตประมาณ 60 เท่า สีโมลิบดีนัมบลูที่ได้เกิดจากปฏิกิริยารีดักชั่นของสารละลายรกรดฟอสฟอทัง-สทิกฟอสโฟโมลิบดิกด้วยฟีนอล โปรตีนแต่ละชนิดจะให้ความเข้มสีไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนตัวสำคัญ 2 ตัว คือ ไทโรซีนและทริปโทเฟน เป็นเทคนิคการวัดโดยวัดโปรตีนที่มีวงแหวนเบนซีน แล้ววัดสีสีโมลิบดีนัมบลูที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ใน sodium potassium tartrate 1.0 %
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลาย (ในข้อ 1) 30 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร2.0 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Folin- ciocatrus phenol reagen เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1: 2 ก่อนใช้

5. สารละลาย bovine albumim protein 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีการ</u>

1. ใช้สารละลาย bovine albumim protein ที่มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัม หรือตัวอย่างที่ความเจือจางเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

2. เติมสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 .ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วจึงทำให้เย็น

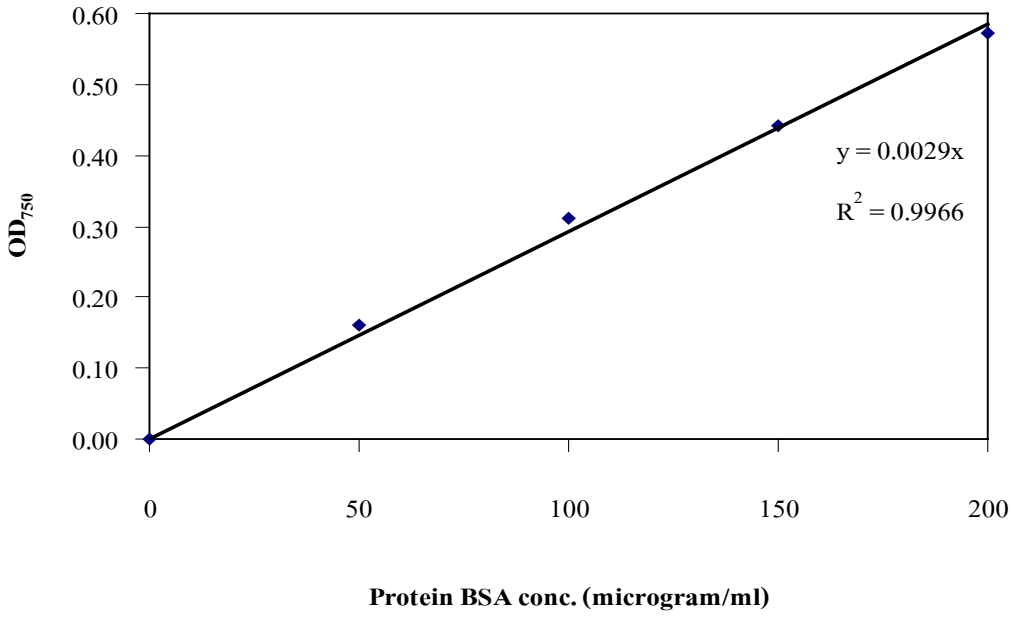
3. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติมสารละลาย Folin- ciocatrus phenol reagen ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน</u>

เตรียมโดยใช้สารละลาย bovine albumim protein ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 125 และ 150 ไมโครกรัม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการข้างต้น



ภาพภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA วิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry

Figure-Appendix 5 Standard curve of standard solution protein BSA analysis by Lowry method

8. เจดาห์ลไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl nitrogen) (AOAC., 1999)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. หลอดกลั่นขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ขวดวัดปริมาตรขนาด 2,000 มิลลิลิตร
3. บิวเรตต์ ชนิด A (Class A) ขนาด 25 มิลลิลิตร
4. ฟลาสก์ขนาด 500 มิลิลิลิตร
5. บิกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. บิกเกอร์ ชนิด PP ขนาด 2000 มิลลิลิตร

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 96-97
2. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ปราศจากไนโตรเจน (เกรดวิเคราะห์)
3. โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ปราศจากไนโตรเจน (เกรดวิเคราะห์)
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 น้ำหนักต่อปริมาตร
5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1000 นอร์มอล
6. เมทิลเรดความเข้มข้นร้อยละ 0.1
7. สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม

(1) ละลายเมธิลเรดจำนวน 0.125 กรัม และเมธิลีนบลู 0.082 กรัม ด้วยเอทธิลแอลกอฮอร์ร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

(2) ละลายโบรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัมในน้ำก่อนปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

(3) ใช้อัตราส่วน ข้อ (1) และ (2) เท่ากับ 5:1

8. สารละลายบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 น้ำหนักต่อปริมาตร
9. แอล-อาร์จินิน (L-Arginine Hydrochloride)

<u>เครื่องมือ</u>

1. ชุดย่อยโปรตีน 2006 Digester บริษัท Foss Tecator
2. เครื่องกลั่นกลับโปรตีนอัตโนมัติ 2200 Kjeltec Auto Distillation บริษัท Foss Tecator
3. ตู้ระบายควัน

<u>วิธีการ</u>

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำทิ้ง 10-20 มิลลิลิตร
2. เติมคอปเปอร์ซัลเฟตจำนวน 0.5 กรัม และโพเตสเซียมซัลเฟตจำนวน 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20-25 มิลลิลิตร

4. นำไปย่อยโดยชุดย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และย่อยที่ 400 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส หลังจากสารละลายใสย่อยต่ออีก 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งให้เย็น

5. ต่อหลอดย่อยในส่วนของเครื่องกลั่นโปรตีนและวางฟลาสก์ที่ตำแหน่งรับสารละลายของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายจุ่มในสารละลายกรดบอริก โดยเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการกลั่นโปรตีนตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ โดยใช้สารละลายบอริก 5 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร แล้วกลั่นเป็นเวลา 4 นาที

6. ไตเตรทของเหลวที่กลั่นได้ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกมาตรฐาน จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอมฟ้าเป็นสีชมพูที่จุดยุติ

7. ทำ blank และตัวอย่างควบคุมภายใน เช่นเดียวกับตัวอย่าง ปฏิบัติตามข้อ 1-6

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ไนโตรเจนทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A-B) \times 14000 \times N}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไทเทรต blank

N คือ นอร์มอลของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่เตรียมได้

9. ฟอสฟอรัสทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำทิ้งวิเคราะห์ตามวิธีการมาตรฐาน DIN 38402 A51 ด้วยเครื่อง ยูวี สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Spectroqant Nova 60 วัดสีของสารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดีนัมวานาเดท (molybdenum vanadate) ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

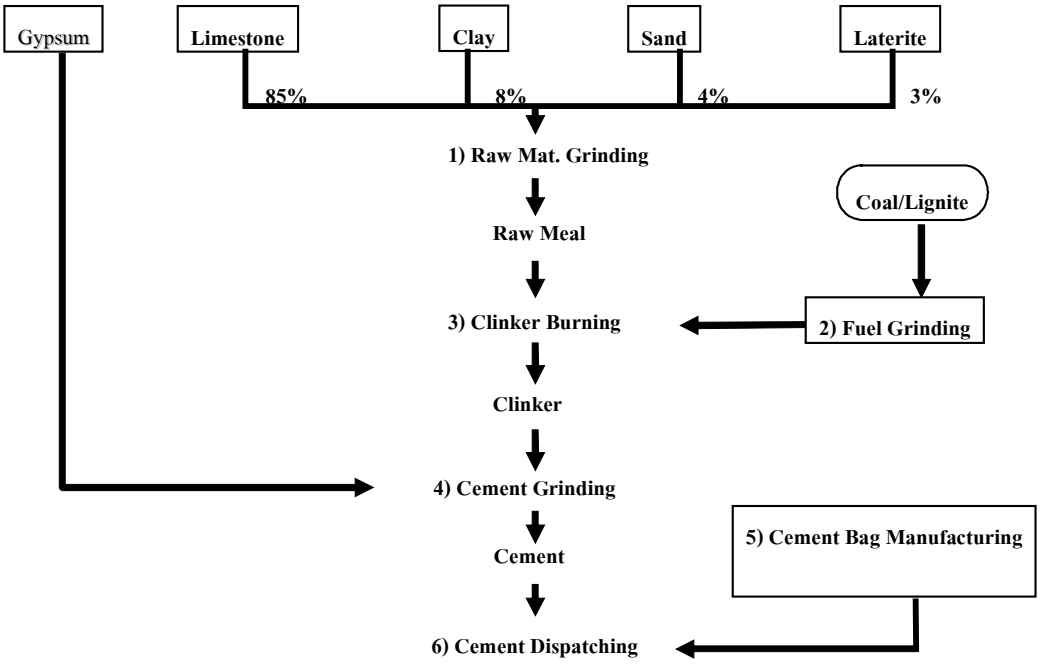
10. โลหะ ทองแดง เหล็ก และ แมงกานีส

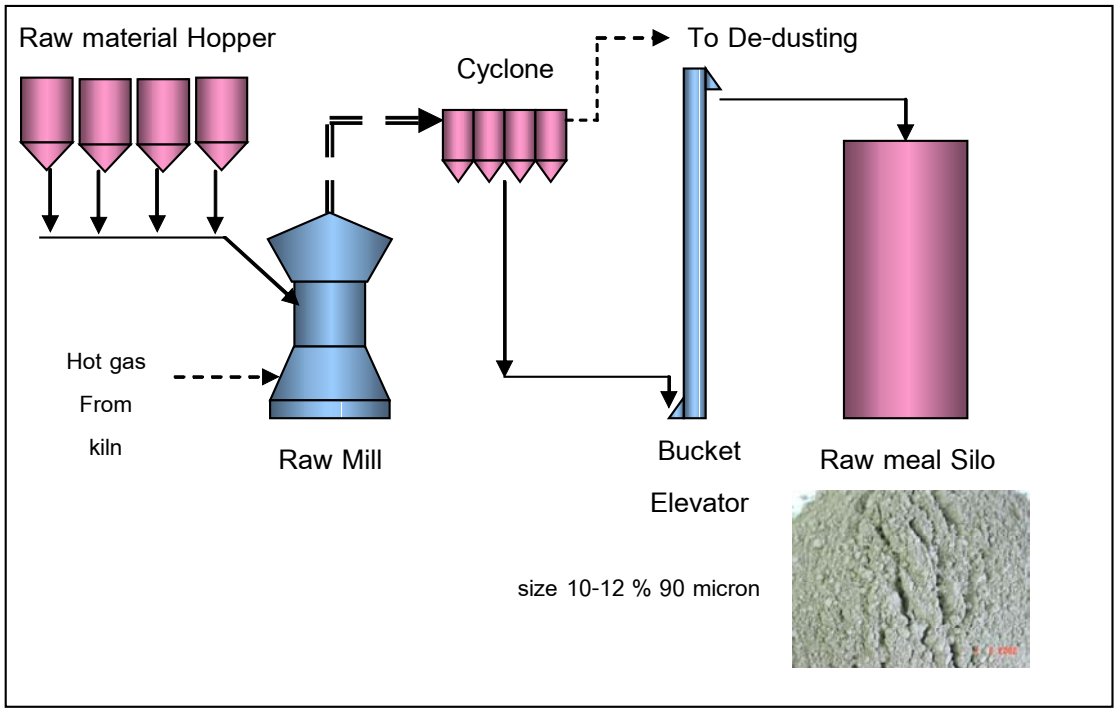
โลหะ ทองแดง เหล็ก และ แมงกานีส วิเคราะห์ด้วยเทคนิคการวัดค่าการกลับคืนสู่สภาวะพื้นของธาตุในกระบวนการอิมิสชั่น (emission) ด้วยเครื่องมือ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry ; ICP แปลผลด้วยโปรแกรมปฏิบัติการ Win lab 32 ตามวิธีมาตรฐาน AOAC. (1999)

11. วัตถุดิบ raw meal

Raw meal เป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตปูนซีเมนต์ ส่วนผสมประกอบด้วย หินปูน ดินเหนียวร้อยละ 85, 8, 4 และ3 ตามลำดับ

กระบวนการผลิตปูนซีเมนต์เริ่มจาก การลำเลียงหินปูนและดินเหนียวจากเหมืองเข้าเครื่องย่อยวัตถุดิบ (ภาพภาคผนวกที่ 6) เพื่อย่อยให้มีขนาดประมาณ 75 มม. และนำมาผสมกันในอัตราส่วน 4:1 เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตปูนซิเมนต์ ส่วนผสมของวัตถุดิบหลัก (หินปูนและดินเหนียว) ที่ผสมกับดินลูกรังและทราย ในอัตราส่วนที่กำหนด จะถูกป้อนเข้าสู่หม้อบดวัตถุดิบแบบตั้ง (Vertical Mill) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ทันสมัย ใช้ลมร้อนอุณหภูมิประมาณ 300 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ความชื้นและสามารถบดวัตถุดิบให้มีความบดละเอียดตามที่กำหนด จากนั้นจะถูกลำเลียงไปเก็บไว้ในไซโลรอมีล (Homogenizing Silo) เพื่อคลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้เป็น Raw Meal วัตถุสำเร็จในการนำไปผลิตเป็นปูนซีเมนต์โดยการเผาและการบดต่อไป





ภาพภาคผนวกที่ 6 กระบวนการผลิตปูนซีเมนต์