ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. พีเอช

การวัดค่าพีเอชของน้ำโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) ทำได้โดยใช้ Glass electrode ซึ่งมีความสามารถในการวัด ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน (H^+) การอ่านค่าจากเครื่องวัดพีเอชสามารถอ่านเป็นค่าพีเอชโดยตรง ในการวัดพีเอชของตัวอย่างน้ำทุกครั้งต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และปรับเทียบมาตรฐาน (Standardization) เครื่องก่อนเสมอที่จะวัดพีเอชตัวอย่าง

2. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับทำระเหย
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า ใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 นาที
6. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (mg/L)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง (mg)}}{\text{ตัวอย่าง (ml)}} \text{ X } 1000$$

3. Biochemical Oxygen Demand (BOD) (APHA, AWWA and WEF, 1985)

อุปกรณ์

1. ขวดมาตราฐานความจุ 250-300 มิลลิลิตร มีจุกปิดได้สนิท ปากกว้างออกเล็กน้อย ทำให้มีร่องเหนือจุกและปากขวดเพื่อให้มีน้ำหล่ออยู่เสมอขณะบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส ป้องกันการดึงอากาศจากภายนอกเข้าไปในขวด ขวดนี้ต้องล้างให้สะอาดทุกครั้งก่อนใช้

2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถใช้ได้กับตู้เย็นธรรมดา

3. ตู้เย็นขนาด 6 ลูกบาศก์ฟุตหรือใหญ่กว่า

4. กระบอกตวงขนาด 1 ลิตร

สารเคมี

1. น้ำกลั่นบริสุทธิ์คุณภาพสูง ปราศจากคลอรีน คลอรามีน ความเป็นกรดด่าง และสารอินทรีย์ มีทองแดงปนได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมโดยละลาย HK_2PO_4 8.5 กรัม K_2HPO_4 21.75 กรัม $Na_2HPO_4.7H_2O$ 33.4 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วค่อยเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ควรมีค่าพีเอช 7.2

3. สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต เตรียมโดยละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วค่อยเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เตรียมโดยละลาย $CaCl_2$ ที่อบแห้ง 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สารละลายเฟอริคคลอไรด์ เตรียมโดยละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สารละลายโซเดียมซัลไฟท์ 0.025 นอร์มัล เตรียมโดยละลาย Na_2SO_3 ที่อบแห้ง 1.575 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ไม่คงที่สลายตัวได้ง่ายจึงควรเตรียมเฉพาะเวลาที่ต้องการใช้เท่านั้น

7. สารละลายกรดและด่าง 1 นอร์มัล สำหรับใช้ปรับพีเอชให้เป็นกลาง

วิธีการ

1. การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

1.1 ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาตรที่ต้องการใช้ 1 ลิตร ใส่ลงในภาชนะที่สะอาด

1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และเฟอริคคลอไรด์ ตามลำดับ ใช้สารละลายแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร

1.3 เป่าอากาศที่สะอาดเพื่อเพิ่มปริมาณสารละลายออกซิเจนให้กับน้ำเจือจาง เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

2. การเตรียมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

2.1 ตัวอย่างน้ำที่เป็นด่างหรือกรดจะต้องปรับให้พีเอชเป็นกลางประมาณ 7 ด้วยสารละลาย H_2SO_4 1 นอร์มัล หรือ NaOH 1 นอร์มัล แล้วแต่กรณี

2.2 ตัวอย่างน้ำที่มีสารประกอบคลอรีนส่วนเหลือ โดยปกติถ้าตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง คลอรีนส่วนเหลือก็จะสลายตัวไป

แต่ถ้าตัวอย่างน้ำที่ปรับให้เป็นกลางแล้วยังมีคลอรีนส่วนเหลืออยู่มากต้องกำจัดโดยใช้โซเดียมซัลไฟท์ การหาปริมาณของโซเดียมซัลไฟท์ที่จะใช้เติมทำได้โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 100-1000 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก (1:1) หรือกรดซัลฟูริก (1:50) 10 มิลลิลิตร แล้วไตรเตรทด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟท์ 0.025 นอร์มัล ใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ก็จะทราบปริมาณของโซเดียมซัลไฟท์ที่ต้องใช้ แล้วจึงนำตัวอย่างน้ำที่กำจัดคลอรีนส่วนเกินแล้วไปหาค่าบีโอดี (BOD) ต่อไป

2.3 ตัวอย่างน้ำที่มีโลหะหนักหรือสารเป็นพิษชนิดอื่นเจือปนอยู่ จะต้องศึกษาและกำจัดออกเสียก่อน

3. วิธีการเจือจาง

3.1 เลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างในการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่าบีโอดี อยู่ในช่วงที่กำหนด แล้วจึงเลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 ขั้นตามตารางภาคผนวกที่ 1 ดังนั้นจำเป็นต้องรู้ค่าบีโอดี โดยประมาณก่อน

3.2 ค่อยๆ รินน้ำเจือจาง 700-800 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยอย่าให้มีฟองอากาศ

3.3 เติมตัวอย่างน้ำจำนวนที่ต้องการ แล้วเติมน้ำเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.4 ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน อย่าให้มีฟองอากาศ

3.5 ค่อยๆ รินใส่ขวดบีโอดี จำนวน 3 ขวด ปิดจุก นำไปเก็บในตู้ 20 องศาเซลเซียส 2 ขวด ส่วนขวดที่เหลือนำไปหาออกซิเจนที่ละลายได้ (DO) ทันที เพื่อทราบค่าออกซิเจนที่ละลายได้ที่จุดเริ่มต้น (DO_0)

3.6 ทำตั้งแต่ข้อ 2-5 สำหรับเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่ต่ำกว่าและสูงกว่า

4. การหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ โดยวิธี Azide Modification of the iodometric Method ดังจะกล่าวในข้อที่ 8

5. การเพาะเลี้ยง (Incubation) โดยเก็บ 2 ขวดของแต่ละเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางในตู้เย็นมืด อุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำออกมาหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (DO_5) ตามข้อ 4

6. การควบคุมคุณภาพน้ำเจือจาง รินน้ำกลั่นที่ใช้เจือจางแต่ไม่ได้ใส่น้ำตัวอย่างลงในขวดบีโอดี 2 ขวด ปิดจุกแล้วเอาไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส ส่วนอีกขวดหนึ่งหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ทันที ผลต่างของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ที่ได้ในตอนแรกและตอนหลัง (5 วัน) จะเป็นเครื่องชี้ให้เห็นคุณภาพของน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง ถ้าปรากฏว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ลดลง ผลที่ได้นั้นไม่ควรใช้เป็น Blank Correction ปกติแล้วปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ ไม่ควรเกินกว่า 0.2 มิลลิลิตร หรือที่ดีไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิลิตร

7. การพิจารณาผลเพื่อใช้คำนวณค่าบีโอดี ผลที่น่าเชื่อถือและจะใช้คำนวณต่อไปได้นั้น จะต้องมีค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องมีการลดปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้ค่าบีโอดีที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

ตารางภาคผนวกที่ 1 ช่วงของค่าบีโอดีที่วัดได้ตามค่าเปอร์เซนต์ตัวอย่างของการเจือจาง

Table- Appendix 1 Rang of BOD at percentage sample dilution.

ช่วง BOD	% ตัวอย่าง
20,000-70,000	0.01
10,000-25,000	0.02
4,000-14,000	0.05
2,000-7,000	0.1
1,000-3,500	0.2
400-1,400	0.5
200-700	1.0
100-350	2.0
40-140	5.0
20-70	10.0
10-35	20.0
4-14	50.0
0-7	100.0

8. ออกซิเจนละลายได้ (Dissolved Oxygen) โดยวิธี Azide Modification of Iodometric

- สารเคมี

(1) สารละลายแมงกานีสซัลเฟต เตรียมโดยละลายสาร $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4.H_2O$ 364 กรัมในน้ำกลั่นแล้วเติมปริมาตรเป็น 1 ลิตร

(2) สารละลายอัลคาไลไอโอไดด์อาไซด์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 400 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เสร็จแล้วเติมโซเดียมอาไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 ลิตร

(3) กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น

(4) น้ำแป้ง เตรียมโดยละลายแป้งมัน 5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือดและคนจนเป็นเนื้อเดียว เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที ปิดไฟตั้งไว้ให้เย็นเติมกรดซาลิไซลิค (Salicylic acid) 1.25 กรัม หรือ โทลูอีน (Toluene) 2-3 หยด เติมลงในสารละลายน้ำแป้งกันบูด

(5) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มัล สำหรับใช้ในการไตเตรท เตรียมโดยละลาย $Na_2S_2O_3 5H_2O$ 3.205 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดใหม่ๆ และปล่อยให้เย็น แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้โดยเติม NaOH 0.4 กรัมต่อลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ 1 มิลลิลิตร จะมีค่าเท่ากับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (DO) 0.200 มิลลิกรัม

- การหาค่ามาตรฐานของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตด้วยสารละลายไดโครเมท

(1) สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมท 0.025 นอร์มัล เตรียมโดยละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่อบแห้ง 1.226 กรัม ในน้ำกลั่นและเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

(2) ละลาย KI 2 กรัม ในขวดแก้ว Erlenmeyer flask ด้วยน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร

(3) เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) (1:9) 10 มิลลิลิตร

(4) เติมสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 20 มิลลิลิตร

(5) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที

(6) เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร

(7) ไตเตรทไอโอดีนที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

(8) นอร์มัลของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต $= (a \times N) / 20$

a = มิลลิลิตรของโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้

N = นอร์มัลของสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

(9) ปรับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ให้มีความเข้มข้นแน่นอนเป็น 0.025 นอร์มัล

- วิธีการ

(1) จากตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ในขวด 250-300 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร

(2) แล้วเติมสารละลายอัลคาไลด์ไอโอไดด์อาไซด์ ตามลงไปทันที 2 มิลลิลิตรให้ปลายปิเปตจมในตัวอย่างน้ำ

(3) ปิดจุก ระวังอย่าให้มีฟองอากาศติดอยู่ในขวด จับขวดคว่ำลงเขย่าแบบพลิกมือให้ขวดตั้งขึ้นและคว่ำลงสลับกันอย่างน้อย 15 ครั้ง ตั้งปล่อยทิ้งไว้ให้ตะกอนที่เกิดขึ้นนอนก้น

(4) รอจนได้น้ำใสส่วนบนประมาณ 100 มิลลิลิตร ค่อยๆ เปิดจุก แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ให้กรดไหลลงไปตามคอขวด

(5) ปิดจุก ค่อยๆเขย่าจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

(6) ตวงสารละลายที่ได้ปริมาตร 203 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร (ปริมาตรจำนวนนี้จะแทนปริมาตรของตัวอย่างน้ำจริงๆ 200 มิลลิลิตร เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างน้ำถูกแทนที่ด้วยสารเคมีทั้งหมด 4 มิลลิลิตร ที่เติมลงไปในขวดขนาด 300 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรที่จะนำมาเพื่อการไตเตรทจึงควรเป็น $\frac{200 \times 300}{300 - 4} = 203$ มิลลิลิตร)

(7) ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 นอร์มัล จนได้สีเหลืองอ่อน

(8) เติมน้ำแป้ง 1-2 มิลลิลิตร และไตเตรทจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป

การคำนวณ

เนื่องจาก 1 มิลลิลิตร ของ 0.025 นอร์มัล โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทจะเท่ากับปริมาณ DO 0.200 มิลลิกรัม เพราะฉะนั้น 1 มิลลิลิตร ของโซเดียมไธโอซัลเฟตจะเท่ากับ1 มิลลิกรัมต่อลิตร DO เมื่อใช้ปริมาตรของตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร ในการไตเตรท

4. Chemical Oxygen Demand (COD) Dichromate Reflux Method (APHA, AWWA and WEF, 1985)

อุปกรณ์

1. ขวดเออร์เลนเมเยอร์ หรือขวดกลมก้นแบนขนาดความจุ 250 มิลลิลิตรซึ่งปากขวดแบบ Ground glass joint ขนาด 24/40

2. เครื่องควบแน่นหรือคอนเดนเซอร์ซึ่งมี jacket ขนาด 300 มิลลิเมตร และต่อได้พอดีกับขวดเออร์เลนเมเยอร์

3. เตาแผ่น (Hot plate)

4. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 0.250 นอร์มัล เตรียมโดยละลาย 12.259 กรัม $K_2Cr_2O_7$ (อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดซัลฟามิค 120 มิลลิกรัม เติมน้ำจนได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. กรดกำมะถัน เตรียมโดยเติม 22 กรัม Ag_2SO_4 ลงในขวดกรดซัลฟูริกเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้ละลาย

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต 0.10 นอร์มัล เตรียมโดยละลาย 39 กรัม $(NH_4)_26H_2O$ ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ลงไป ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การหานอร์มัลมาตรฐานของเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

ดูดสารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นลงไป 30 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต และใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด

$$\text{Normality} = \frac{(\text{ml})\ K_2Cr_2O_7 \times 0.25}{(\text{ml})\ Fe(NH_4)_2(SO_4)_2}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอินดิเคเตอร์ ละลาย 1.485 กรัม 1,10-$C_{12}H_8N_2.H_2O$ และ 695 มิลลิกรัม $FeSO_47H_2O$ ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. เงินซัลเฟต

6. เมอร์คิวรี่ซัลเฟต

7. ซัลฟามิคแอซิด ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตร์เท่านั้น

วิธีการ

1. ดูดน้ำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือใช้ตัวอย่างน้ำน้อยกว่าแต่เติมน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตรลงในขวดรีฟลักซ์

2. เติม $HgSO_4$ 0.2 กรัม พร้อมด้วยลูกแก้วขนาดจิ๋ว (Glass beads) และ H_2SO_4 ที่ผสม $AgSO_4$ เรียบร้อยแล้ว 15 มิลลิลิตร ควรเติมกรดช้าๆ เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลาย $HgSO_4$

3. เติม 0.250 นอร์มัลของสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ 5 มิลลิลิตร สวมขวดรีฟลักซ์ให้เข้ากับเครื่อง คอนเดนเซอร์ เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่านในขวดรีฟลักซ์ให้เข้ากันดีก่อนที่จะให้ความร้อน

4. กลั่นในเครื่องรีฟลักซ์ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างคอนเดนเซอร์

5. เติมน้ำกลั่นลงไปจะได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง

6. ไตเตรทสารละลายไดโครเมตส่วนเกินด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด (0.10-0.15 มิลลิลิตร) ไตเตรทจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวน้ำเงินไปเป็นสีน้ำตาลแดง (ถึงแม้ว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้สีจะเปลี่ยนกลับมาเป็นสีเขียวน้ำเงินก็ตาม)

7. ทำแบลงค์ (Blank) โดยใช้น้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากับตัวอย่างและทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างทุกประการ

การคำนวณ

$$\text{COD (mg/L)} = \frac{(a - b)\,N}{\text{Sample (ml)}} \times 8000$$

เมื่อ COD = ค่า chemical oxygen demand จากไดโครเมต

A = มิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ในการไตเตรทแบลงค์

B = มิลลิลิตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

N = นอร์มัลลิตี้ของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ใช้

5. เกลือ (AOAC., 1990)

อุปกรณ์

1. เตาไฟฟ้า
2. เครื่อง Magnetic stirrer, Magnetic bar
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

สารเคมี

1. สารละลายเงินไนเตรดความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์
2. กรดไนตริกเข้มข้น
3. สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมเฟอริคซัลเฟต
4. ไนโตรเบนซิน
5. สารตละลายโปแตสไธโอไซยาเนตเข้มข้น 0.1 โมล่าร์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มล. และปิเปตสารละลายเงินไนเตรดความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ใส่ลงไป 25 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้นลงไป 10 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายที่ได้ไปต้มนานประมาณ 10 นาที จนกระทั่งสารละลายในฟลาสค์มีสีเหลืองอ่อนปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

3. เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมเฟอริคซัลเฟตลงไป 5 มิลลิลิตร และหยดไนโตรเบนซินลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน

4. นำสารละลายทั้งหมดไปไตรเตรดด้วยสารตละลายโปแตสไธโอไซยาเนตเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ จนกระทั่งได้สีแดงที่คงตัวอยู่นาน 15 นาที

5. ทำแบลงค์โดยไตรเตรดเฉพาะสารเคมีที่ใช้ทั้งหมดคำนวณหาผลต่างของการไตรเตรตระหว่าง แบลงค์และตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเกลือ (\%)} = \frac{0.0058(A - B)}{W} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายเงินไนเตรดความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารตละลายโปแตสไธโอไซยาแนตเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Robyt, 1987)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. นาฬิกาจับเวลา
3. Vortex mixer
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐานโบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) 10 มิลลิลิตรกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารละลายไบยูเรท โดยชั่ง $CuSO_4 5H_2O$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาเตรต 6.0 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10% จำนวน 300 มิลลิลิตร ในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

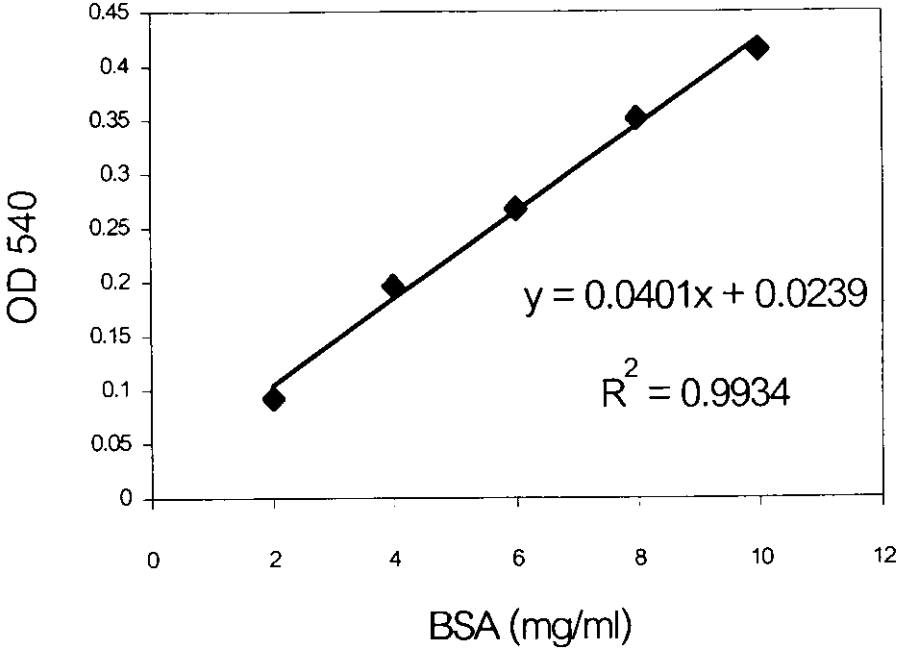
1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง

2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vertex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวินซีรัมอัลบูมิน

การเตรียมโปรตีนมาตรฐานโบวินซีรัมอัลบูมิน

ดูดสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ 1)



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานโบวินซีรัมอัลบูมินที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

Figure-Appendix 1 Standard curve of Bovine Serum Albumin (OD 540 nm).

7. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยการทำเจลอิเลกโตรโฟรีซิส (Laemmli, 1970)

สารเคมี

1. Acrylamide/bisacrylamide (30%T)

เตรียมโดยสารละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ Bisacrylamide 0.8 กรัมในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากเตรียม

2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ละลาย Tris-base 18.17 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ละลาย Tris-base 6.06 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 10% SDS เตรียมโดยละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5. Stock sample buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2 มิลลิลิตร
10% SDS	2.0 มิลลิลิตร
40% Glycerol	1.0 มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue	0.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.8 มิลลิลิตร

6. 5x electrode (Running) buffer, pH 8.3

Tris-base	9.0 กรัม
Glycine	43.2 กรัม
SDS	3.0 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7. Catayst

7.1 10% Ammonium persulphate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

7.2 TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ TEMED ได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีการทำให้เจือจาง

8. โปรตีนมาตรฐานชุด Broad Rang Protein Molecular Weight Makers ของบริษัท Promega ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 และ 225 kDa

9. การเตรียมสารละลายโปรตีนสำหรับทำโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยละลายโปรตีนตัวอย่างผสมกับ Stock sample buffer ที่เตรียมจากข้อ 5 ในอัตราส่วน 1:4

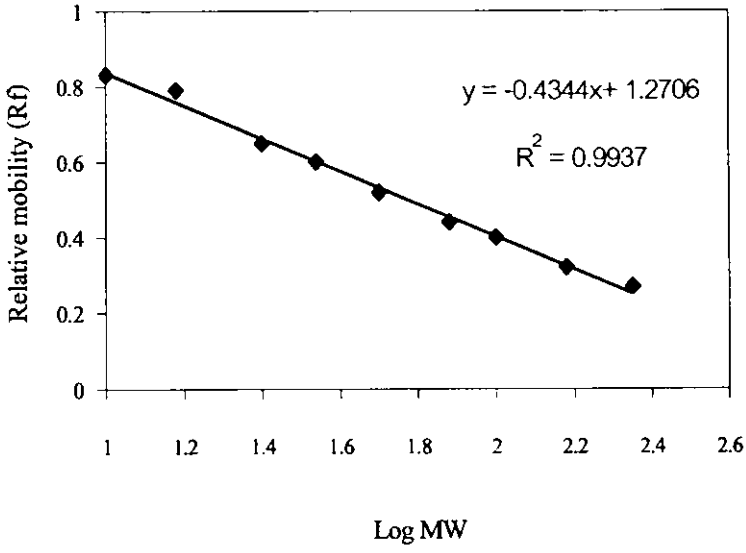
10. การย้อมแถบสีโปรตีน

ย้อมแถบสีโปรตีนด้วยโคมาสซีบริลเลียนท์บลู (Coomassie brilliant blue R-250) ความเข้มข้น 0.1% (Staining solution) โดยละลาย 0.1% w/v Coomassie brilliant blue R-250 ใน 40% Methanol และ 10% Acetic acid เมื่อสีละลายแล้ว ให้กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา ใช้เวลาในการแช่แผ่นเจลประมาณ 2-3 ชั่วโมง และล้างสีส่วนเกินด้วยสารล้างสี (Destaining solution) (เตรียมโดยละลาย 40% Methanol กับ 10% Acetic acid) โดยเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ล้างสีส่วนเกินออกหลายๆ ครั้ง จนสามารถเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน

ตารางภาคผนวกที่ 2 องค์ประกอบของเจลสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

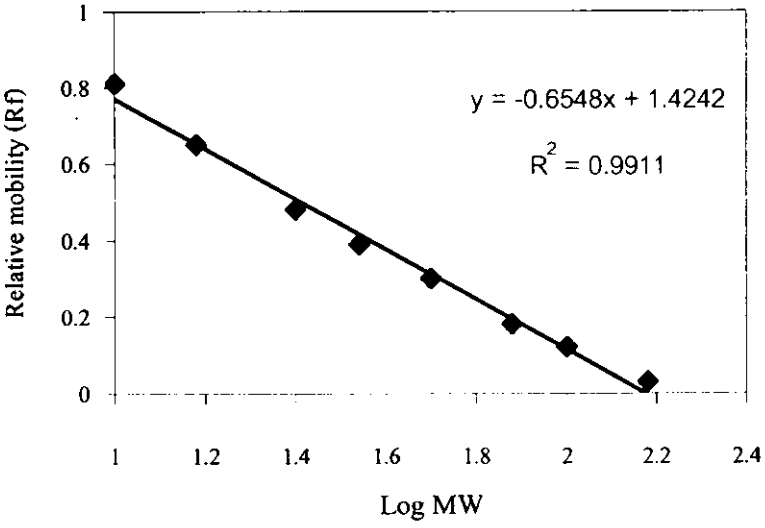
Table- Appendix 2 Compositions of gel for SDS-PAGE.

ส่วนประกอบของเจล	Stacking gel 3%	Seperating gel 4%	Seperating gel 20%
30% Acrylamide- 0.8% Bisacrylamide (ml)	0.50	0.3	1.5
0.5 M Tris- HCl, pH 6.8 (ml)	1.25	-	-
1.5 M Tris- HCl, pH 8.8 (ml)	-	0.536	0.536
10% SDS (µl)	50	23	23
0.2 M EDTA (µl)	50	23	23
10% Ammonium persulphate (µl)	50	23	23
TEMED (µl)	5	3	3
Distill water (ml)	3.10	1.320	0.120
Total volume (ml)		2.26	2.26



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใน SDS-PAGE ภาพที่ 2-5

Figure-Appendix 2 Calibration curve for the molecular weight determination of the protein on SDS-PAGE for figure 2-5.



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใน SDS-PAGE ภาพที่ 3-5

Figure-Appendix 3 Calibration curve for the molecular weight determination of the protein on SDS-PAGE for figure 3-6.

8. การล้างเมมเบรน

ขั้นตอนการล้างที่ปฏิบัติมีดังนี้

1. นำสารละลายตัวอย่างโปรตีนออกจากระบบ
2. ล้างทิ้ง (Rinse) ด้วยน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. ล้างโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 M ไหลวนใช้เวลา 30-60 นาที
4. ล้างทิ้งด้วยน้ำเพื่อกำจัดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งพีเอชของน้ำเป็นกลาง
5. ล้างโดยใช้สารละลายกรดไนตริก (HNO_3) 0.1 M ไหลวนใช้เวลา 15-30 นาที
6. ล้างทิ้งด้วยน้ำเพื่อกำจัดสารละลายกรดไนตริก จนกระทั่งพีเอชของน้ำเป็นกลาง
7. ทดสอบฟลักซ์ของน้ำ ถ้ายังไม่ได้ค่าที่พอใจ (เช่น 85% ของค่าเริ่มต้น) ให้ทำซ้ำข้อ 3-6
8. เก็บรักษาเมมเบรนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Hagihara, *et al.*, 1958)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง
4. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายสับสเตรต เตรียมโดยใช้เคซีน (Casein) ความเข้มข้น 1%
2. บัฟเฟอร์หยุดปฏิกริยา เตรียมโดยใช้ Tris-chloroacetic acid 0.1 M (1.6339 กรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) sodium acetate 0.22 M (ซึ่งโซเดียมคลอไรด์ 12.87 กรัม เติมกรดอะซิติก 1.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) และ Acetic acid 0.33 M แล้วผสมสารทั้ง 3 ชนิด ในอัตราส่วน 1:1:1

วิธีการ

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พีเอช 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมบัฟเฟอร์หยุดปฏิกริยา ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไทโรซีน

หลอดควบคุม โดยเติมบัฟเฟอร์หยุดปฏิกริยา ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร