

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัสดุ-อุปกรณ์

1. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Absorption Spectrophotometer : AAS) Shimadzu, AA-6200, Japan
2. เครื่องเขย่า (HEIDOLPH, Unimax 2010, Germany)
3. Heating mantle
4. เครื่องให้ความร้อนพร้อมหมวนสนามแม่เหล็ก (Hotplate with Magnetic Stirrer, JANWAY 1203, JAPAN)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide, NaOH), Assay 95%, MW=40 g/mol, MERCK, Germany
2. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid, H_3PO_4), Assay 84%, $d=1.71 \text{ g/cm}^3$, MW=98 g/mol, MERCK, Germany
3. กรดไนตริก (Nitric acid, HNO_3) Assay 68%, $d=1.40 \text{ g/cm}^3$, MW=63.01 g/mol, MERCK, German
4. ยูเรีย (Urea, NH_2CONH_2), Assay 98%, MW=60.06 g/mol, Ajax, Newzeland
5. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Assay 99-101%, MW= 372.24 g/mol, Ajax, Newzealand
6. Dimethylformamide (DMF) Assay 99.9%, MW 73.1, J.T. Beker, USA
7. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid , HCl), Assay 35.4%, $d=1.18 \text{ g/cm}^3$, MW=36.5, BDH, England

วิธีการทดลอง

1. วิเคราะห์น้ำในพื้นที่

ผู้ทำการทดลองเลือกพื้นที่ตรวจสอบคุณภาพน้ำ โดยเลือกทั้งหมด 6 จุด และในชุมชน 3 จุด เพื่อเป็นตัวแทนของหมู่บ้านที่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ทำการตรวจหาปริมาณโลหะหนัก และแร่ธาตุ

- 1.1 เก็บน้ำตัวอย่างจากแหล่งที่คัดเลือกด้วยขวดโพลีเอทิลีนที่ล้างให้สะอาดและอบแห้ง แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเดิมกรดไนตริกเพื่อรักษาตัวอย่างน้ำ
- 1.2 นำน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มาย่อยด้วยกรดผสมระหว่างกรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริกอัตราส่วน 3:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดจนสารละลายมีปริมาตรเหลือน้อยกว่า 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เป็น 100 มิลลิลิตร
- 1.3 นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5
- 1.4 นำสารละลายที่ได้ตรวจวัดปริมาณ Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Mn^{2+} ด้วยเครื่อง AAS

2. คัดเลือกชนิดของพืชในท้องถิ่น

เลือกพืชที่มีปริมาณมากในท้องถิ่นและเหลือใช้หรือเป็นวัชพืช นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดและอบให้แห้ง

3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์

3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

- (1) ชั่งพืชที่อบแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 25 กรัม แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน
- (2) นำไปแช่ในสารละลาย NaOH 0.2 M 1250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
- (3) ล้างเซลล์โลสที่สกัดได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
- (4) ทำซ้ำเดิม แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ NaOH เป็น 0.5 และ 1.0 M
- (5) ชั่งพืชที่อบแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 25 กรัม แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน
- (6) นำไปให้ความร้อนในสารละลาย NaOH 0.2 M 1250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง
- (7) ล้างเซลล์โลสที่สกัดได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

- (8) ทำซ้ำเดิม แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ NaOH เป็น 0.5 และ 1.0 M
(9) บันทึกปริมาณเซลล์ที่ได้ และสภาพเซลล์ต่อการนำไปใช้งาน

3.2 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์

- (1) ชั่งพืชที่อบแห้งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 25 กรัม แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน
(2) นำไปต้มกับ NaOH 0.2 M 1250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- (3) ล้างเซลล์ที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
(4) ทำซ้ำเดิม แต่เปลี่ยนเวลาในการให้ความร้อนเป็น 2 และ 3 ชั่วโมง
(5) บันทึกปริมาณเซลล์ที่ได้ และสภาพเซลล์ต่อการนำไปใช้งาน

4. การกำจัดไอออนโลหะจากเซลล์ที่สกัดได้

- 4.1 ชั่งเซลล์จากหญ้าไทร 5.0 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
4.2 เติมน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร
4.3 คนตลอดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4.4 กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5
4.5 นำสารละลายวัดปริมาณ Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+}
4.6 ทำซ้ำเดิมแต่เปลี่ยนจากแช่ในน้ำปราศจากไอออน เป็นแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5% v/v และแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5% v/v ร่วมกับการให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเซลล์

- 5.1 นำพืชที่ต้องการมาล้างทำความสะอาด จากนั้นตัดเป็นขนาดเล็กลง
5.2 นำไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งมา 25 กรัม แช่น้ำ 1 คืน
5.3 นำไปต้มกับสารละลาย NaOH 0.2 M 1250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที
5.4 ล้างเซลล์ที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น จนมีค่า pH เป็นกลาง แล้วนำมาแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% คนตลอดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียส
5.5 ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็นกลาง แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6. หาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงเซลลูโลส

ในการวิจัยนี้ใช้การปรับปรุงเซลลูโลส 2 แบบ

6.1 วิธีการปรับปรุงเซลลูโลสแบบที่ 1 (MC1)

การปรับปรุงได้อาศัยปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน (Phosphorylation) โดยมีการศึกษาอัตราส่วนโดยมวลของเซลลูโลส กรดฟอสฟอริกเข้มข้นและยูเรีย ดังตาราง 3.1 โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูโลส 25 กรัมต่อน้ำปราศจากไอออน 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 100-110 องศาเซลเซียส พร้อมคนตลอดเวลา ล้างเยื่อที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออนจนมีค่า pH เป็นกลาง อบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับแคลเซียมไอออน และ แมกนีเซียมไอออน

ตาราง 3.1 อัตราส่วนโดยมวลของเซลลูโลส กรดฟอสฟอริกเข้มข้นและยูเรีย

สภาวะ	เซลลูโลส (กรัม)	กรดฟอสฟอริกเข้มข้น (กรัม)	ยูเรีย (กรัม)
1	2	1	3
2	1	1	3
3	1	10	10

6.2 วิธีการปรับปรุงเซลลูโลสแบบที่ 2 (MC2)

(1) นำเซลลูโลสที่สกัดได้และอบแห้งแล้ว 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียด ใส่ในขวดก้นกลมเติม EDTA 2.5 กรัม และ acetic anhydride 5.3 มิลลิลิตร

(2) เติม DMF 70 มิลลิลิตร ในส่วนผสมข้อที่ 1

(3) นำมาให้ความร้อน 75 °C ใน oil bath คนสารละลายด้วย magnetic bar เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น

(4) กรองโดยใช้ sintered glass funnel ถัดขวดก้นกลมด้วย DMF เล็กน้อย

(5) ล้างเซลลูโลสที่ปรับปรุงได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO₃ ตามด้วยน้ำปราศจากไอออน และ 95% ethanol

(6) นำเซลลูโลสที่ปรับปรุงได้ออบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

7. การหาประสิทธิภาพการดูดซับไอออนโลหะ

- 7.1 นำเซลล์ลอสหรือเซลล์ลอสปรับปรุงมาบดให้มีขนาดเล็กกลง
- 7.2 นำไปแช่น้ำปราศจากไอออนในขวดรูปชมพู่พร้อมเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
- 7.2 ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานที่ต้องการทดสอบการดูดซับลงไป จากนั้นทำการเขย่าตามเวลาที่เหมาะสมคือเวลาสมดุลในการดูดซับ (equilibrium time)
- 7.3 กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5
- 7.4 นำสารละลายที่ได้วัดปริมาณ ไอออน โลหะที่เหลือด้วย AAS

8. เวลาสมดุลในการดูดซับ (Equilibrium time)

- 8.1 ชั่งเซลล์ลอสปรับปรุง 0.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ 5 ใบ
- 8.2 เติมสารละลายมาตรฐาน Ca^{2+} 10 ppm 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 5 ใบ
- 8.3 นำเซลล์ลอสปรับปรุงที่ชั่งไว้เทลงในขวดรูปชมพู่ในข้อ 8.2
- 8.4 นำไปเขย่าโดยที่ขวดรูปชมพู่ใบที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ และใบที่ 5 ไม่ต้องเขย่า
- 8.5 นำขวดรูปชมพู่ที่เขย่าได้ตามเวลาที่กำหนดแต่ละใบ กรองทันทีผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5
- 8.6 วัดหาปริมาณ Ca^{2+} ที่เหลือด้วยเทคนิค AAS
- 8.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Ca^{2+} ที่ถูกดูดซับ กับ เวลาที่ใช้ในการดูดซับ
- 8.8 หาเวลาที่มีการดูดซับเริ่มเข้าสู่สมดุล (equilibrium time)
- 8.9 ทำเช่นเดิมแล้วเปลี่ยนสารละลายมาตรฐานเป็น Mg^{2+} 10 ppm

9. ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการดูดซับไอออนโลหะ

- 9.1 ชั่งเซลล์ลอส ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 2 ใบๆละ 0.5 กรัม
- 9.2 เติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที
- 9.3 ปิเปตต์สารละลายมาตรฐาน Ca^{2+} ลงไปทั้งสองใบ
- 9.4 วัด pH ของสารละลายในขวดรูปชมพู่ใบแรก (pH 4-5) ส่วนใบที่สองปรับ pH ให้ได้ประมาณ 9-10
- 9.5 นำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้ววัดปริมาณ Ca^{2+} ด้วย AAS (ทำเทียบกับสารละลายในขวดรูปชมพู่ที่มีเฉพาะน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐาน Ca^{2+})
- 9.6 ทำซ้ำเดิมแต่เปลี่ยนจากสารละลายมาตรฐาน Ca^{2+} เป็น Mg^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+}
- 9.7 ทำซ้ำเดิมแต่เปลี่ยนจากเซลล์ลอสเป็นเซลล์ลอสปรับปรุงแบบที่ 1 และแบบที่ 2

