



บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycotherm incubator shaker)	AG แบบ KF-1	บริษัท Infors ประเทศ สวิสเซอร์แลนด์
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	UV-240	บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave)	HA-26	บริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	pH 82	บริษัท Radiometer ประเทศเดนมาร์ก
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	CHA	บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer)	Neubauer Bright Line	บริษัท Bocco ประเทศ เยอรมัน
ถังหมักขนาด 10 ลิตร และชุดควบคุม	MD-500	บริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องไฮเพอโฟแมนซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-3A	บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (Melting point apparatus)	Gallonkamp O MFB 600	บริษัท Gallonkamp ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรสโกปี (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)		บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	J 6M/E centrifuge	บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้อบแห้ง (Oven)	Schutzart 40050-IP20	บริษัท Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Schutzart 40050-IP20	บริษัท Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2 สารเคมี

	บริษัทผู้ผลิต
1. แคลเซียมออกไซด์ (Calcium oxide)	Merck ประเทศเยอรมัน
2. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide)	Merck ประเทศเยอรมัน
3. แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)	Merck ประเทศเยอรมัน
4. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)	Merck ประเทศเยอรมัน
5. โพตัสเซียมเปอร์มันแกเนต (potassium permanganate)	Merck ประเทศเยอรมัน
6. โพตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium monohydrogen phosphate)	Merck ประเทศเยอรมัน
7. โพตัสเซียมโบรไมด์ (potassium bromide)	Merck ประเทศเยอรมัน
8. ไทโอยูเรีย (Thiourea)	May and Baker
9. โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	Merck ประเทศเยอรมัน
10. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)	Merck ประเทศเยอรมัน
11. เฮปเทน (heptane)	Merck ประเทศเยอรมัน
12. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Ammonium peroxide)	Merck ประเทศเยอรมัน
13. แคทไอออน เรซิน Dowex - 50 Strongly Acidic Cation Exchanger, Ionic form Cross Linkage 1 %, Dry mesh 50- 100	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. แอนไอออน เรซิน Dowex- 1 Basic Anion Exchanger, Ion form Cross Linkage 8%, Dry mesh 20- 50	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

15. ผงถ่านกัมมันต์

เกรดทางการค้า บริษัทดำเนิน
ประเทศไทย จำกัด

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ A 185 เป็นสายพันธุ์ที่ได้มีการคัดเลือกแล้ว โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลว โดย ศยามล นองบุญนาก (ศยามล นองบุญนาก , 2534)

3. วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อสปอร์ของเชื้อ *A. niger* A 185 โดยใช้เข็มเขี่ยลากบนอาหารแข็งเอียงโพเตโตเด็กซ์โตรส (Potato Dextrose Agar, PDA ภาควงที่ 1.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่จะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ.

4. การเตรียมน้ำหมัก

4.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ถ่ายเชื้อ *A. niger* A 185 จากเชื้อที่เก็บไว้ตามวิธีในข้อ 3 โดยใช้เข็มเขี่ยลากบนอาหารแข็งเอียงโพเตโตเด็กซ์โตรสในขวดแก้วทรงแบน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน จึงล้างสปอร์ด้วยสารละลายทวิน-80 ร้อยละ 0.1 (v/v) ปริมาตร 30 มล. แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนกันหนา 5 ชั้นนับจำนวนสปอร์แขวนลอยโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายสารแขวนลอยของสปอร์ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 4.1 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มล. (ภาควงที่ 1.2) ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ. ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3 การผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว ปริมาตร 50 มล. (ภาควงที่ 1.3) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ. ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนสิ้นสุดการหมักเป็นเวลา 9 วัน

4.4 การผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 10 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 4.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 600 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดมะนาว (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาตร 6 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิของถังหมักที่ 30 °ซ. อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที หมักเป็นเวลา 8 วัน

5. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน

(Pentabromoacetone) (stern, 1957)

นำตัวอย่างน้ำหมัก 0.5 มล. ใส่หลอดแก้วทดลองแบบที่มีฝาเกลียวปิด เต็ม 2 นอร์มัลกราดซิลฟูริกปริมาตร 0.5 มล. เต็ม 1 โมลาร์ โปตัสเซียมโบรไมด์ จำนวน 5 หยด เต็มโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/v) จำนวน 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 6 (v/v) จนได้สีใสจึงเติมเฮปแทน 3 มล. ปิดฝาเกลียวให้สนิท สกัดกรดมะนาวโดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จึงถ่ายส่วนเฮปแทนปริมาตร 2 มล. ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว ซึ่งมีสารละลายไทโอยูเรีย (ภาคผนวกที่ 2.1) ปริมาตร 4 มล. ปิดฝาให้สนิท สกัดด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้นประมาณ 2-3 นาที จึงนำชั้นสารละลายไทโอยูเรีย มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกรดมะนาวเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 3)

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของกรดมะนาวโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิด

โครมาโตกราฟี (HPLC) (Berilaegua , 1987)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นกรดมะนาวอยู่ระหว่าง 100-500 มก./ลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทที่มีรูพรุน (pore size) 0.45 ไมครอน ฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร คำนวณปริมาณกรดมะนาวเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 4) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดมะนาวด้วยเครื่อง HPLC มีดังต่อไปนี้

คอลัมน์ : Zorbax C-18 ขนาด (I.D.) 4.6 มม. ยาว 25 ซม.

สารละลายตัวพา : 0.5% ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (w/v) และ 0.4% (v/v) ของอะซิโตนไนไตรล์ ปรับพีเอชเป็น 2 ด้วยกรดฟอสฟอริก

อัตราการไหลของสารละลายตัวพา : 1.4 มล.ต่อนาที

ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV ความยาวคลื่น : 214 นาโนเมตร

ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ : 10 ไมโครลิตร

เวลาที่เหมาะสมของกรดมะนาวที่อยู่ในคอลัมน์ : 7 นาที

6. การแยกสายใยรา

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* A185 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 4 มาแยกสายใยราจากน้ำหมักด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยอัตราเร็ว 4,800 รอบ / นาที เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวในน้ำหมักตามวิธีในข้อ 5.1

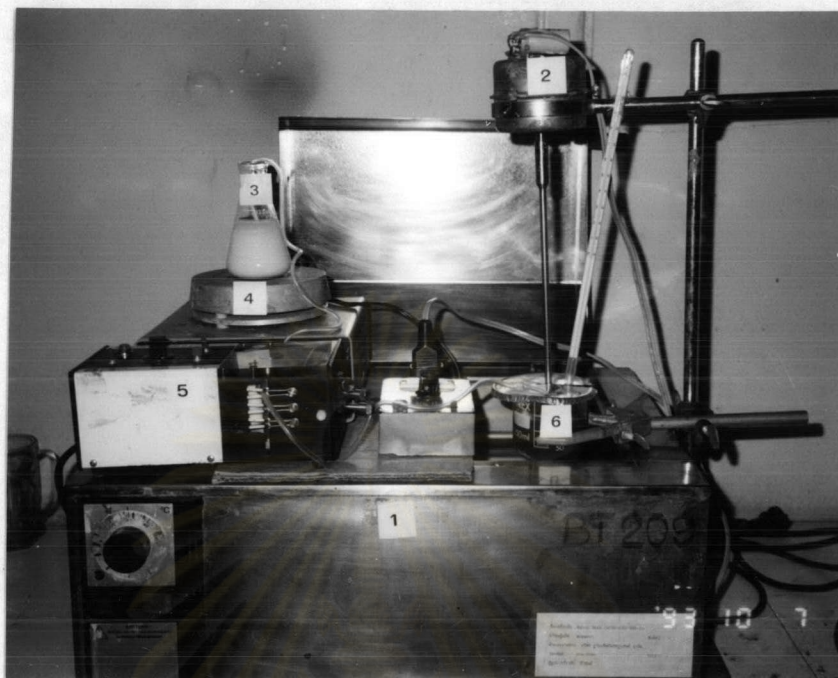
7. การตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก

7.1 หาชนิดของด่างที่เหมาะสมสำหรับตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก

เตรียมน้ำหมักที่มีกรดมะนาวเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) 100 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. อุ่นในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ให้อุณหภูมิในน้ำหมักเท่ากับ 90 °ซ. เตรียมสารละลายแขวนลอยของแคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 25 (w/v) ควบคุมอุณหภูมิตัวตกตะกอนที่ 90 °ซ. บนแผ่นลวดร้อนซึ่งมีแท่งแม่เหล็กกวนผสมตลอดเวลา (รูปที่ 2) ผันแปรตัวตกตะกอนแต่ละชนิด โดยเติมลงในน้ำหมักด้วยอัตราเติม 2 มล./ นาที อัตราการกวนของมอเตอร์ติดใบกวนคงที่ 500 รอบ / นาที ตกตะกอนกรดมะนาวในระบบปิด เติมสารละลายต่างจนกระทั่งพีเอชของน้ำหมักเป็น 7 จึงหยุดเติมด่างและจับเวลาเพื่อป่มให้เกิดตะกอนได้สมบูรณ์ในช่วงเวลาตกตะกอน 10, 30, 60 และ 90 นาที กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 90 °-100 °ซ. ปริมาตร 200 มล. นำตะกอนแคลเซียมซิติเรทที่ตกตะกอนแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักในแต่ละสภาวะมาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ภาคผนวกที่ 5) วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวตามวิธีในข้อ 5.1 ที่ตกตะกอนแยกได้จากน้ำหมักในช่วงเวลาต่างๆ โดยการทดลองแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ

7.2 หาอุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอนแยกกรดมะนาวจากน้ำหมัก

เตรียมน้ำหมักที่มีกรดมะนาวเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 100 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. ตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยสารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์ ร้อยละ 25 (w/v) โดยผันแปรอุณหภูมิขณะตกตะกอน ในน้ำหมักเป็น 70°, 80°, 90° และ 100 °ซ. ขณะเติมสารละลายต่างกวนผสมน้ำหมักให้ทำปฏิกิริยา



1. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 2. มอเตอร์ติดใบกวน 3. สารละลายแขวนลอยต่าง
4. แผ่นเหล็กร้อนควบคุมอุณหภูมิ 5. ปุ่มควบคุมอัตราการไหล 6. น้ำหมักกรดมะนาว

รูปที่ 2 ส่วนประกอบของเครื่องมือสำหรับการตกตะกอนกรดมะนาวจากน้ำหมัก

ตลอดเวลาด้วยอัตราความถี่ 500 รอบ/ นาที เติมสารละลายต่างด้วยอัตรา 2 มล./ นาที ในระบบปิด จนกระทั่งพีเอชเป็น 7 จึงหยุดเติม บ่มให้เกิดตะกอนในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที กรองแยกตะกอนกรดมะนาวด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างตะกอนบนกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 °- 100 °ซ. ปริมาตร 200 มล. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ภาคผนวกที่ 5) วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวตามวิธีในข้อ 5.1 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่แยกได้จากน้ำหมัก เมื่อผันแปรอุณหภูมิตกตะกอนกับช่วงเวลาต่างๆ

7.3 หาความเข้มข้นกรดมะนาวในน้ำหมักกับช่วงเวลาในการตกตะกอนกรดมะนาว

เตรียมน้ำหมักให้มีกรดมะนาวเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 (w/v) ความเข้มข้นละ 100 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. ตกตะกอนแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยสารละลายแขวนลอยแคลเซียมออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 25 (w/v) โดยมีอัตราเติม 2 มล. / นาที ที่อุณหภูมิ 90 °ซ. ขณะเติมกวนน้ำหมักตลอดเวลาเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาด้วยอัตราความถี่ 500 รอบ/ นาที ในระบบปิด จนกระทั่งพีเอชมีค่าเป็น 7 จึงหยุดเติมต่าง จับเวลาบ่มให้เกิดตะกอน

ในช่วงเวลา 10, 30, 60 และ 90 นาที กรองแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 °-100 °ซ. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ภาควงที่ 5) วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวตามวิธีในข้อ 5.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตกตะกอนกรดมะนาว เมื่อผันแปรความเข้มข้นกรดมะนาวในน้ำหมักกับช่วงเวลาตกตะกอนต่างๆ

8. หาอุณหภูมิกับช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับละลายตะกอนแคลเซียมซัลเฟต

เตรียมตะกอนแคลเซียมซัลเฟต โดยตกตะกอนจากน้ำหมักเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) 100 มล. ที่อุณหภูมิ 90 °ซ. ด้วยสารละลายแวนิลอยแคลเซียมออกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 25 (w/v) เป็นเวลา 30 นาที กรองตะกอนแคลเซียมซัลเฟตด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ° - 100 °ซ. ปริมาตร 200 มล. นำตะกอนที่ได้ปริมาณ 36 กรัม (มีน้ำในตะกอน 15 กรัม) มาละลายด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70 (w/v) (Milsom, 1985) ปริมาตร 6.30 มล. ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. บนแผ่นลวดร้อนควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีแท่งแม่เหล็กกวนผสมตลอดเวลา ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายตะกอนเป็น 50 °, 60 °, 70 ° และ 80 ° ซ. ในช่วงเวลาของการละลาย 30, 60 นาที , 1.5, 2, 2.5 และ 3 ชม. กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างกรดมะนาวที่ติดในตะกอนแคลเซียมซัลเฟตด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ° - 100 ° ซ. วิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวตามวิธีในข้อ 5.1 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการละลาย เมื่อผันแปรอุณหภูมิกับช่วงเวลาของการละลายตะกอนแคลเซียมซัลเฟต

9. หาสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกสีสารละลายกรดมะนาวด้วยผงถ่านกัมมันต์

หลังจากละลายตะกอนแคลเซียมซัลเฟตด้วยกรดซัลฟูริก ได้สารละลายตะกอนกรดมะนาวที่มีสีของสารปนเปื้อน ฟอกสีสารละลายกรดมะนาวด้วยผงถ่านกัมมันต์ โดยผันแปรอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ต่อปริมาณของแข็งทั้งหมด 1.35, 2.70, 4.05, 5.40, 6.75 และ 8.10% (w/w) ในช่วงเวลาการฟอกสี 30 นาที ที่อุณหภูมิ 70 °ซ. กวนผสมสารละลายกรดมะนาว กรองแยกผงถ่านกัมมันต์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างกรดมะนาวที่ติดในผงถ่านด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50 °ซ. ปริมาตร 10 มล. วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟอกสี (ภาควงที่ 13) วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวหลังฟอกสีตามวิธีในข้อ 5.1

10 . การจับสารปนเปื้อนที่มีประจุในสารละลายกรดมะนาวด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ

เตรียมเรซินชนิดแคทไอออน Dowex- 50 และแอนไอออน Dowex-1 อย่างละ 30 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 ซม. ยาว 30 ซม. (ภาควงที่ 7) นำสาร



ละลายกรดมะนาวที่ฟอกสีจนใส ปริมาตร 100 มล. ผ่านแคทอไอออนและแอนไอออนเรซิน ด้วย อัตราการไหล 1, 2, 3, 4 และ 5 มล. / นาที อย่างต่อเนื่อง ล้างสารละลายกรดมะนาวออก จากคอลัมน์ด้วยน้ำที่ไม่มีประจุ (deionized water) เก็บสารละลายกรดมะนาวที่ได้เป็นส่วนๆ (fraction) ส่วนละ 20 มล. วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวในแต่ละส่วน รวมส่วนที่มีกรดมะนาว ให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 120 มล. วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวหลังผ่านการจับสารปนเปื้อน ด้วยเรซินเทียบกับสารละลายกรดมะนาวก่อนผ่านเรซินจับประจุตามวิธีในข้อ 5.1 วิเคราะห์ ปริมาณสารปนเปื้อน โปตัสเซียม โซเดียม แคลเซียม และ เหล็ก ด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชัน วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตด้วยวิธีวัดความขุ่นในสารละลายกรดมะนาวหลังผ่านเรซิน

11. การตกผลึกกรดมะนาว

นำสารละลายกรดมะนาวที่ผ่านการจับประจุด้วยเรซินจับประจุบวกและเรซินจับประจุลบ 100 มล. ใส่ขวดกั้นกลมขนาด 1 ลิตร ระเหยน้ำออกด้วยเครื่องกลั่นภายใต้สูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50 °ซ. จนกระทั่งสารละลายกรดมะนาวมีความเข้มข้นเท่ากับ 65 ° และ 68 °brix รอให้เย็นอุณหภูมิในสารละลายกรดมะนาวเท่ากับ 25 °ซ. (Cruger, 1987) จึงเติมกรดมะนาวบริสุทธิ์ 99.50 % ปริมาณ 0.5 % (w / w) เพื่อเหนี่ยวนำให้ตกผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรต ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 24 ชม. กรองแยกผลึกกรดมะนาวด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ผ่านการอบจนทราบน้ำหนักคงที่ ล้างผลึกกรดมะนาวบนกระดาษกรองด้วยน้ำเย็น อุณหภูมิ 4 °ซ. อบกรดมะนาวในตู้อบสูญญากาศให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °ซ. วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวโมโนไฮเดรตที่ตกผลึกได้ด้วยวิธีชั่งน้ำหนัก

12. การวิเคราะห์สมบัติกรดมะนาว

12.1 หาจุดหลอมเหลว

นำผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรตที่เตรียมได้และกรดมะนาวโมโนไฮเดรตมาตรฐาน (ความบริสุทธิ์เท่ากับ 99.5 %) มาวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องวิเคราะห์จุดหลอมเหลว

12.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์กรดมะนาวที่เตรียมได้

ชั่งผลึกกรดมะนาวโมโนไฮเดรตที่เตรียมได้ในสภาพแห้งน้ำหนักแน่นอน ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง วิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 5.2 เทียบกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก 4) โดยมีกรดอะซิติกเป็นสารเปรียบเทียบภายใน (รูปที่ 17) คำนวณความบริสุทธิ์กรดมะนาวที่เตรียมได้

$$\text{กรดมะนาวบริสุทธิ์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์ได้ (กรัม)}}{\text{(น้ำหนักกรดมะนาวที่ซั่งมาวิเคราะห์ - น้ำหนักน้ำในผลึก)} (\text{กรัม})} \times 100$$

12.3 วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

เตรียมตัวอย่างกรดมะนาวเข้มข้น 10 มก./ มล. ปริมาตร 100 มล. ในขวดกันชมพูขนาด 250 มล. ดูดสารละลาย condition reagent (ภาคผนวกที่ 2.2) มา 5 มล. ใส่ในตัวอย่างกรดมะนาว กวนผสมด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตเทียบกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 8) (Sidney, 1984)

12.4 วิเคราะห์ปริมาณเหล็ก แคลเซียม โปตัสเซียม และโซเดียม

เตรียมตัวอย่างสารละลายกรดมะนาวเข้มข้น 10 มก. / มล. วิเคราะห์หาปริมาณ เหล็ก แคลเซียม โปตัสเซียม และโซเดียมด้วยเครื่องมืออะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรสโคปีเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 9, 10, 11 และ 12) (Sidney, 1984)

12.5 วิเคราะห์กากที่เหลือจากการเผา

ซั่งตัวอย่างกรดมะนาวโมโนไฮเดรตที่เตรียมได้มา 2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนถึง 4 ตำแหน่ง ใส่ครุชิลซึ่งเผาจนน้ำหนักคงที่แล้ว นำไปให้ความร้อนด้วยไฟอ่อนๆ จนตัวอย่างไหม้เป็นสีดำ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล. นำไประเหยด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควันสีขาว นำไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 800 ° ซ. จนหมดสีดำ ทิ้งไว้ในเตลิกเคเตอร์ ซั่งน้ำหนักแล้วคำนวณกากที่เหลือจากการเผา (มอก, 2526)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย