บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 พื้นที่ศึกษา: สวนป่าชายเลน บริเวณอ่าวปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

อ่าวปากพนังมีพื้นที่ประมาณ 155 ตารางกิโลเมตร บริเวณร่องน้ำมีความกว้างประมาณ 400-600 เมตร ถัดจากร่องน้ำจะเป็นส่วนที่เป็นโคลนทั้งสองฝั่ง คือเมื่อน้ำลดจะมองเห็นทะเลโคลนโผล่ขึ้นมา อ่าวปากพนังเป็นอ่าวตื้นๆ ดินท้องน้ำมีลักษณะเป็นโคลนล้อมรอบด้วยแผ่นดินทั้ง 2 ด้าน คือด้านตะวันตกเป็นแผ่นดินใหญ่ ที่เป็นตัวจังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนทางตะวันออก เป็นแผ่นดินที่ยื่นออกไปสู่ทะเล (Sand Spit) เรียกว่าแหลมตะลุมพุก มีป่าชายเลนขึ้นอยู่รอบ ๆ อ่าวทั้งสองฝั่ง ส่วนใหญ่เป็นป่าที่ปลูกขึ้นใหม่โดยกรมป่าไม้ (สุริยัณห์ สาระมูล และ กัลยา วัฒยากร 2545) การศึกษาครั้งนี้มีพื้นที่ศึกษา 2 แห่ง อยู่ที่สวนป่าชายเลนปลูกอายุ 5 ปี (ละติจูด N 08° 28.711' ลองติจูด E 100° 03.609') และ สวนป่าชายเลนอายุ 22 ปี (ละติจูด N 08° 34.206' ลองติจูด E 100° 00.400')

ลักษณะพื้นที่สวนป่าชายเลนอายุ 5 ปี คล้ายแบบ fringe mangrove forest โดยเป็นสวนป่าชายเลนที่ปลูกในพื้นที่นากุ้งร้างซึ่งอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลที่ติดกับผืนแผ่นดินใหญ่มีคันกั้นน้ำทะเลโดยรอบ มีการไหลของน้ำทะเลโดยผ่านคลองเล็กๆหน้าแปลงป่าปลูก น้ำทะเลไม่อาจจะท่วมได้หมดเนื่องจากเป็นที่ค่อนข้างลาดชันยกเว้นเวลาที่มีน้ำทะเลขึ้นสูงสุดเท่านั้น บริเวณสวนป่าชายเลนจึงถูกน้ำทะเลท่วมได้หมด ส่วนพื้นที่สวนป่าชายเลนอายุ 22 ปี มีลักษณะคล้ายแบบ riverine mangrove forest เป็นสวนป่าชายเลนที่ปลูกพันธุ์ไม้ในพื้นที่เลนงอกใหม่อยู่บริเวณปากคลองปากพูนที่ติดต่อกับอ่าวปากพนัง ได้รับอิทธิพลจากน้ำทะเลอยู่อย่างสม่ำเสมอ คือจะมีกระแสน้ำท่วมถึงอยู่เป็นประจำวัน พันธุ์ไม้ที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างสมบูรณ์ดี

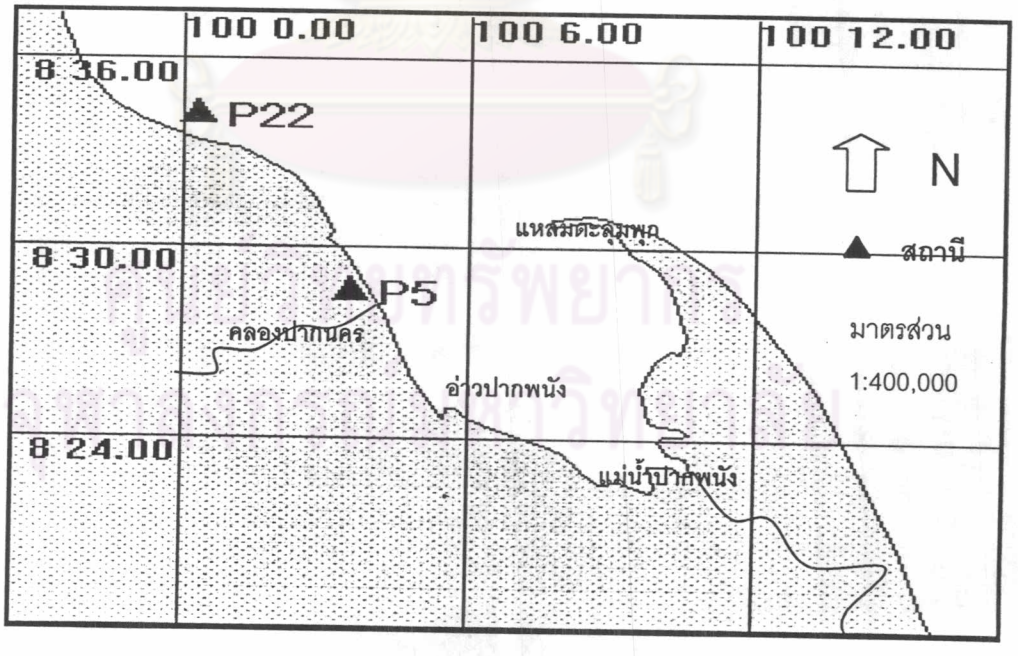
ต้นไม้ที่พบในที่สวนป่าชายเลนอายุ 5 ปี และ 22 ปี ได้แก่ โกงกางใบใหญ่ โกงกางใบเล็ก และ แสมขาว ซึ่งลักษณะทั่วไปของพันธุ์ไม้ทั้งสามชนิดข้างต้นเป็นดังนี้

โกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) ลักษณะทั่วไปโกงกางใบใหญ่เป็นไม้ที่มีขนาดใหญ่สูงถึง 30-40 เมตร บริเวณโคนต้นมีรากค้ำยันรอบลำต้น เปลือกสีเทาถึงดำ ผิวเปลือกหยาบ ใบเป็นรูปรี อวบใหญ่ ขนาดของใบยาวประมาณ 8-24 ซม. กว้างประมาณ 5-13 ซม. ปลายใบมีติ่งแหลมเล็กและแข็ง สีของใบด้านบนเป็นสีเขียวอ่อน ท้องใบสีออกเหลือง ดอกออกเป็นช่อกลีบเลียงและกลีบดอกมีอย่างละ 4 กลีบ และมีเกสรตัวผู้ 8 อัน ส่วนของผลยาวประมาณ 3-8 ซม.

มีสีน้ำตาล ผิวเปลือกหยาบ ส่วนของฝักจะแทงออกมาจากผล มีสีเขียว ผิวขรุขระ มีตุ่มขึ้นอยู่ทั่วไปทั้งฝัก เมื่อฝักแก่เต็มที่จะหลุดออกจากต้นได้เอง

โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) ลักษณะทั่วไป โกงกางใบเล็กเป็นไม้ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 30-40 เมตร บริเวณโคนต้นจะมีรากค้ำยันอยู่รอบลำต้น เปลือกสีเทาดำ ผิวเปลือกเรียบ ใบเป็นรูปรีมีสีเขียวปลายใบแหลมมีติ่งแหลมเล็กสีดำฐานใบแคบท้องใบสีเขียวอมดำ และมีจุดสีดำเล็กๆ กระจายอยู่เต็มท้องใบ ก้านใบมีสีออกแดงอ่อน ๆ ดอกออกดอกช่อละคู่ ส่วนดอกย่อยไม่มีก้านดอกดอกมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างและ 4 กลีบ กลีบดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ สีเหลืองอมเขียวถึงสีขาว ส่วนของฝักแทงออกมาจากผล ฝักมีผิวเรียบสีขาวเมื่อฝักแก่เต็มที่ส่วนที่หุ้มฝักที่ติดอยู่กับผลจะมีสีน้ำตาลแดง

แสมขาว (*Avicennia alba*) ลักษณะทั่วไปเป็นไม้ขนาดกลางถึงใหญ่สูงประมาณ 8-20 เมตร ลำต้นค่อนข้างกลมและแตกกิ่งในระดับต่ำ บริเวณผิวของเปลือกตามกิ่งและลำต้นมักมีสีต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการเกาะของเห็ดรา เช่น สีเหลืองอ่อน เขียวอ่อนกระจายอยู่ทั่วไปเป็นแผ่น มีรากหายใจในลักษณะกลมปลายเรียวทู่ ใบเป็นใบเรียงเดี่ยว ผิวใบด้านบนเกลี้ยงสีเขียวเข้ม ช่อดอกที่ออกปลายมักจะเป็นช่อใหญ่ คือมีช่อดอกย่อยแตกออกตรงข้ามกันในแนวตั้งฉาก และมีช่อย่อยตรงปลายช่อดอกรวมโดยช่อดอกย่อยคู่แรกจะอยู่บริเวณซอกใบ ดอกแต่ละดอกมีขนาดเล็ก (สนิท อักษรแก้ว 2532)



รูปที่ 7 แผนที่แสดงสวนป่าชายเลน 5 ปี และ 22 ปี บริเวณอ่าวปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช

สวนป่าชายเลนอายุ 5 ปี (P5 ในรูปที่ 7) มีลักษณะของพื้นที่เป็นแปลงทดลองปลูกป่าชายเลนบนพื้นที่นากุ้งร้าง พันธุ์ไม้ 3 ชนิด (โกงกางใบใหญ่ โกงกางใบเล็ก และแสมขาว) ที่พบมีความสูงประมาณ 2-3 เมตร

สวนป่าชายเลนอายุ 22 ปี (P22 ในรูปที่ 7) ประกอบด้วยพันธุ์ไม้ 3 ชนิดเช่นเดียวกับป่าชายเลนอายุ 5 ปี ซึ่งบริเวณนี้พันธุ์ไม้ที่พบมีความสูงถึง 5-7 เมตร ลักษณะของพื้นที่เป็นแปลงปลูกป่าชายเลนเป็นพื้นที่เลนงอกใหม่

3.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนทั้ง 2 แห่ง ได้ดำเนินเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2544 – เมษายน 2545 โดยทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนผิวหน้าแบบสุ่มทั้งบริเวณสวนป่าชายเลนอายุ 5 ปี และ 22 ปี ใต้ต้นไม้หลัก 3 ชนิด คือ ต้นโกงกางใบใหญ่ ต้นโกงกางใบเล็ก และต้นแสมขาว โดยใต้ต้นไม้แต่ละชนิดเก็บตัวอย่างดิน 3 ซ้ำ เก็บดินตะกอนด้วยช้อนสแตนเลสโดยตักผิวหน้าดินลึกไม่เกิน 3 เซนติเมตร ตัวอย่างดินตะกอนผิวหน้าที่เก็บได้ทำการบรรจุในขวดแก้วสะอาด วัดค่า Eh และ ค่า pH ทันที จากนั้นใช้อลูมิเนียมฟอยล์ ปิดข้างในและใช้ฝาปิดให้สนิท เก็บตัวอย่างดินในที่เย็นแล้วนำไปแช่แข็งในห้องปฏิบัติการจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

การเก็บตัวอย่างดินตะกอนตามความลึกใช้ เครื่องมือเก็บแท่งดิน (Corer) ชนิดสแตนเลสสติล เส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร เก็บแท่งดินจากสวนป่าชายเลนอายุ 5 ปี และ 22 ปี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละบริเวณจำนวน 2 จุด ตัดแบ่งแท่งดินทุก ๆ 4 เซนติเมตร คือ 0-4, 4-8, 4-12, 12-16, 16-20, 20-24, 24-28, 28-32, 32-36, 36-40 เซนติเมตร ตามลำดับ นำดินตะกอนตามระดับความลึกที่เก็บได้ในแต่ละชั้นบรรจุในขวดแก้วสะอาด วัดค่า Eh และ ค่า pH ทันที จากนั้น ใช้อลูมิเนียมฟอยล์ ปิดข้างใน และใช้ฝาปิดให้สนิท เก็บตัวอย่างดินในที่เย็นแล้วนำไปแช่แข็งในห้องปฏิบัติการจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3.3 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องแก้วที่ใช้ในการศึกษาต้องทำความสะอาดด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำเครื่องแก้วแช่ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 10 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่าแล้วแต่คราบที่ติดอยู่กับเครื่องแก้ว แช่เครื่องแก้วนาน 15 นาทีหรือมากกว่าตามความเหมาะสม ล้างกรดออกด้วยน้ำประปา และชะขวดที่สะอาดแล้วด้วยอะซีโตน ผึ่งขวดให้แห้ง จากนั้นนำ

เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียสข้ามคืนปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเก็บในที่สะอาดเพื่อป้องกันการสะสมของฝุ่นละอองและสิ่งปนเปื้อน

3.3.1 อุปกรณ์สำหรับสกัดสารฮิวมิกจากดินตะกอน

บีกเกอร์ ขนาด 50 100 500 1000 มิลลิลิตร
กระบวกตวง ขนาด 10 50 250 มิลลิลิตร
ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 125 250 มิลลิลิตร
กรวยกรองแก้ว
แท่งแก้วคนสาร
ขวดเตรียมสาร ขนาด 10 25 50 100 250 มิลลิลิตร
หลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร
ออโตปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร
พลาสเจอร์ปิเปต
หลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร
ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร 25 มิลลิลิตร
ขวดเก็บสารเคมีใส และขวดสีชา
ไยแก้ว
กรรไก
มีดพับ
กระดาษกรองขนาด 22 ไมโครเมตร
Dialysis tubing membrane(sigma-aldrich D 9777)
ขวดขนาด 500 –600 มิลลิลิตร
คอลัมน์แก้วสำหรับทำโครมาโตกราฟี
ช้อนตักสาร
สายเทฟลอน
กระดาษฟอยล์
พาราฟิล์ม
ที่คีบสาร
ตะแกรงตั้งหลอดทดลอง
ขวดใส่น้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 สารเคมี

กรดไฮโดรคลอริก AR grade
โซเดียมไฮดรอกไซด์
โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์
กรดไฮโดรฟลูออริก AR grade
เมทานอล AR grade
โปแตสเซียมคลอไรด์
น้ำกลั่น
แก๊สไนโตรเจน
H^+ -saturated cation exchange resin (Bio-Rad AG-Mp-50)
XAD-8 resin (DAX-8)
สารมาตรฐานกรดฮิวมิก 100 มิลลิกรัม (Minnesota Peat Humic Acid Reference)
สารมาตรฐานกรดฟุลวิค 100 มิลลิกรัม (Minnesota Peat Fulvic Acid Reference)

3.3.3 เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์

เครื่องเหวี่ยงแยกอนุภาค
เครื่องวัดความเป็นกรดเบส
เครื่องวิเคราะห์คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน
เครื่องฟลูออโรมิเตอร์
เครื่องเขย่าสาร
เครื่องอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี
เครื่อง SCT
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

3.4 **การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของดินตะกอน**

1. **การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน** นำตัวอย่างดินตะกอนจากตู้แช่แข็ง ปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง รินน้ำส่วนเกินที่อยู่ด้านบนออก คนดินให้เป็นเนื้อเดียวกันกำจัดเศษใบไม้

รากไม้ เปลือกหอยออกแบ่งตัวอย่างดิน 50 กรัมไปหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยวิธีการอบที่ 105 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จึงนำออกมาเก็บใน desiccator เมื่อดินเย็นแล้ว ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

การคำนวณ

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = {(น้ำหนักดินก่อนอบ-น้ำหนักดินหลังอบ)/น้ำหนักดินหลังอบ} x 100

2. **วิเคราะห์หาลักษณะของเนื้อดิน** (texture) **โดยวิธีไฮโดรมิเตอร์**

ขั้นตอนการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อดิน

1. ชั่งตัวอย่างดินตากแห้งที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มม. จำนวน 50 กรัม ลงในบีกเกอร์ 600 มล.
2. เติมสารละลายแคลกอน 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มล. เติมน้ำกรอง 150 มล. คนให้ทั่วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน
3. ถ่ายดินจากข้อ 3 ลงในเครื่องปั่นไฟฟ้านาน 1-2 นาที
4. ถ่ายดินจากเครื่องปั่นลงใน sedimentation cylinder ทั้งหมด (อย่าให้หกเด็ดขาด)
5. เติมน้ำกรองจนครบ 1,130 มล. ใช้ plunger คน 20 ครั้ง ขณะหยุดเติม เอมิลแอลกอฮอล์ 1 มล. เพื่อกำจัดฟองภายหลังการกวน
6. วัดด้วย Hydrometer อ่านค่า 40 นาทีแรก และวัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ บันทึกผล
7. ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง วัดไฮโดรมิเตอร์ (จับเวลา 40 วินาที แล้วอ่านค่า) วัดอุณหภูมิ บันทึกผล
8. ทำ blank โดยใช้สารละลายแคลกอน 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มล. ลงใน sedimentation cylinder อีกใบหนึ่งทำเช่นเดียวกับการวัดค่า hydrometer และอุณหภูมิของดิน

รายละเอียดวิธีการคำนวณเพื่อหาเนื้อดินแสดงในภาคผนวก ข

3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีอื่นของดินตะกอน

1. **การวิเคราะห์อินทรีย์คาร์บอน** แบ่งดินส่วนหนึ่งไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ในตู้อบนำมาบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.2 มิลลิเมตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์โดยวิธี Walkley Black (Jackson, 1973)

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารอินทรีย์

1. ชั่งดินตะกอนที่แห้งและร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (80 เมสต่อนิ้ว) ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโปแตสเซียมไดโครเมต 1 นอร์มาล ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดตัวอย่างดินตะกอนด้วยบิวเรต

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร เขย่าอย่าให้ตะกอนติดข้างขวด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร
5. เติมกรด H_3PO_4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
6. เติม solid NaF ปริมาณ 0.2 กรัม
7. เติม Diphenylamine Indicator 15 หยด
8. ไตเตรตด้วย FAS 0.5 N จนถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว จดปริมาตร FAS ที่ใช้ไป

รายละเอียดการคำนวณสารอินทรีย์แสดงในภาคผนวก ข

2. **การวิเคราะห์คาร์บอน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน** วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer instruments Series II CHNS/O Analyzer 2400

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

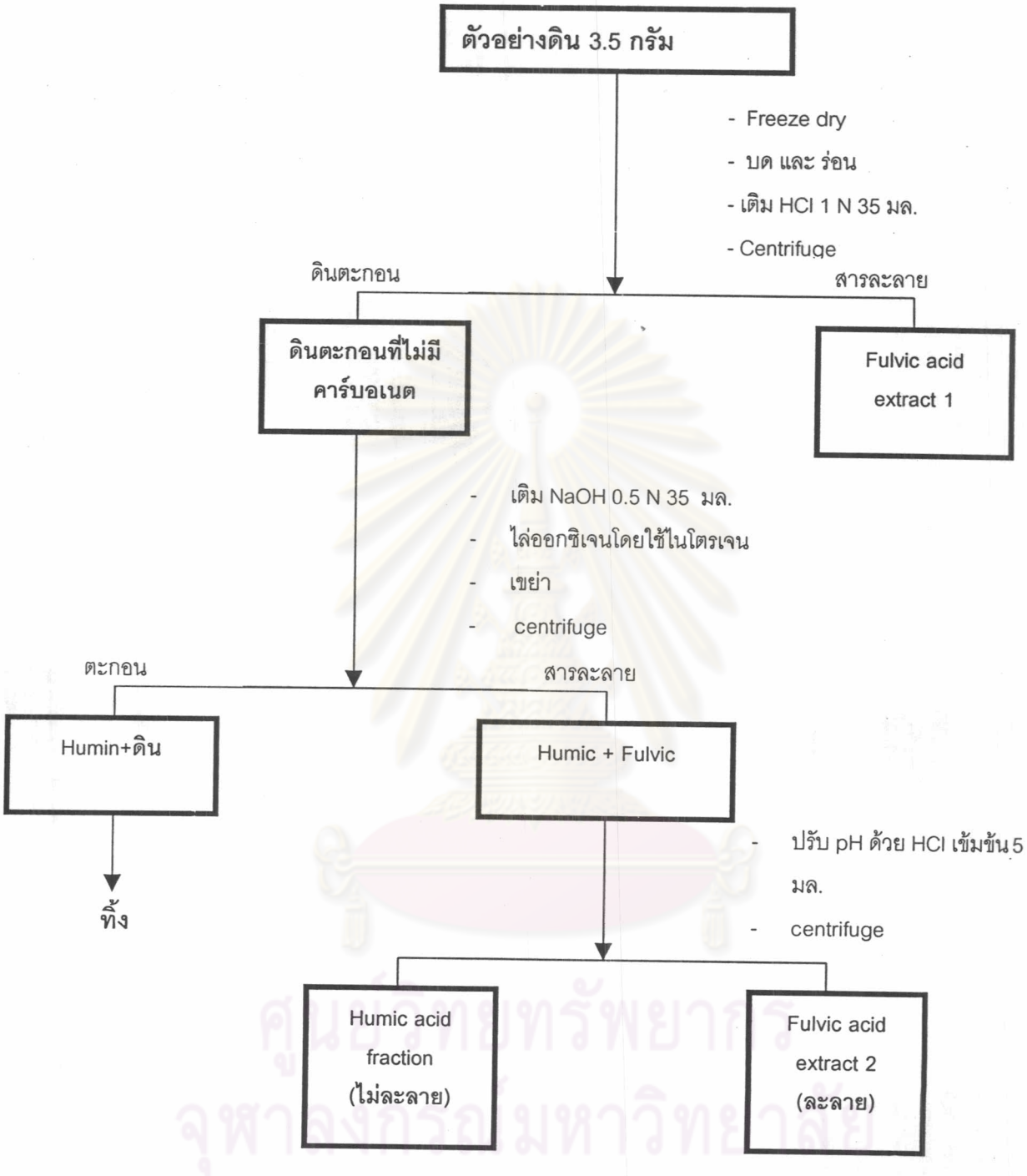
3.6 การวิเคราะห์สารฮิวมิกจากดินตะกอน

3.6.1 การสกัดกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิกจากดินตะกอน
(ดัดแปลงวิธีการสกัดจากวิธีของสมาคม IHSS)

1. ชั่งตัวอย่างดินตะกอนที่ผ่านการ freeze dry บด และร่อนดินด้วยตะแกรง จำนวน 3.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกแบบมีฝาปิดที่แห้งสะอาดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 35 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองพลาสติกนำไปตั้งในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกอนุภาคที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เมื่อสังเกตที่หลอดทดลองพบว่ามีส่วนที่เป็นของเหลวสีเหลืองใสอยู่ด้านบน และ ส่วนที่เป็นดินอยู่ด้านล่าง ส่วนที่เป็นของเหลวเก็บไว้เพื่อผ่าน XAD-8 resin ส่วนดินที่อยู่ด้านล่างนำไปสกัดต่อไปขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดคาร์บอเนตในดินตะกอนด้วย

2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 35 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองพลาสติกที่มีดินจากข้อ 1 เติมก๊าซไนโตรเจนลงในหลอดเพื่อไล่ออกซิเจนให้หมด ปิดฝาให้สนิทแล้วพันด้วยเทปเทฟลอน เพื่อป้องกันก๊าซออกซิเจน จากนั้น นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกอนุภาคที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที สังเกตเห็นส่วนที่เป็นของเหลวสีน้ำตาล และดินตะกอนที่ผ่านการสกัดแล้ว เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ ส่วนดินตะกอนทิ้งไป

3. เทส่วนที่เป็นของเหลวจากข้อ 2 ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ส่วนที่เป็นของเหลวนี้ มีส่วนที่เป็นกรดฟุลวิค และ กรดฮิวมิกอยู่ จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 5 มิลลิลิตรเพื่อปรับ pH เท่ากับ 1 ตั้งทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง จากนั้น เหวี่ยงแยกอนุภาคที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกสารเป็นสองของเหลวสีน้ำตาลใสเป็นชั้นของกรดฟุลวิค (ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์) ตะกอนสีน้ำตาลเข้มปนดำเป็นชั้นของกรดฮิวมิก (ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์) โดยขั้นตอนการสกัดสารฮิวมิกจากดินตะกอนที่กล่าวข้างต้นแสดงดังรูป 8



รูปที่ 8 ขั้นตอนการสกัดกรดฟุลวิค และกรดฮิวมิกจากดิน
(ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของสมาคม IHSS)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.2 การกำจัดสารเจือปนในกรดฟุลวิค

1. การเตรียม XAD-8 resin ทำตามขั้นตอนดังนี้

1.1 ตัก XAD-8 เรซิน จำนวน 10 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด100 มิลลิลิตร เติมเมทานอลลงไปให้สูงกว่าเรซินที่อยู่ในบีกเกอร์ 4 เซ็นติเมตร ใช้แท่งแก้วคนนาน 1นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นให้เทเมทานอลออกแล้วเทน้ำ DI ลงไปแทนที่เมทานอล ตั้งทิ้งไว้ 10นาที

1.2. เตรียมคอลัมน์ XAD-8 ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 25 เซ็นติเมตร ใส่ใยแก้วหนา 0.5-1.0 เซ็นติเมตร ใช้แท่งแก้วดันเพื่อไล่ฟองอากาศออก ล้างใยแก้วด้วยเมทานอล ตามด้วยน้ำ DI เติม XAD-8 เรซิน ให้มีความสูง 10 เซนติเมตร ขณะที่เติมเรซินให้มีน้ำท่วมสูงเหนือเรซิน 1-2 เซ็นติเมตรเสมอ ควรเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้เรซินเรียงตัวเป็นระเบียบ เตรียม คอลัมน์ XAD-8 นี้ 2 คอลัมน์ ต่อ 1 ตัวอย่าง

2. เตรียม H^+-saturated cation exchange resin (AG-MP-50) ตัก AG-MP-50 จำนวน 5 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI ให้ท่วมคนประมาณ 1 นาที จากนั้นเตรียมคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร สูง 25 เซ็นติเมตรใส่ใยแก้วหนา 0.5–1.0 เซนติเมตร ล้างใยแก้วด้วยน้ำกลั่น จากนั้น เติม AG-MP-50 ให้มีความสูง 2 เซนติเมตร ให้เตรียมคอลัมน์ AG-MP-50 นี้ 2 คอลัมน์ต่อ 1 ตัวอย่าง

3. หลังจากที่เตรียมคอลัมน์ตามขั้นตอนข้างต้นจะได้คอลัมน์ทั้งหมด 4 คอลัมน์ คือ คอลัมน์ XAD-8 (1), XAD-8 (2), AG-MP-50 (1), AG-MP-50 (2) แล้วให้นำส่วนที่เป็นกรดฟุลวิค ของเหลวสีเหลืองที่ได้จากการเติมกรดไฮโดรคลอริกและของเหลวสีน้ำตาลที่ได้จากการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์นำมารวมกัน ผ่าน XAD-8 (1) โดยมีอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร 2 ครั้ง กรดฟุลวิคยังคงถูกจับอยู่ที่ XAD-8 ทิ้งส่วนที่ไหลผ่าน XAD-8 (1) จากนั้นใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 8 มิลลิลิตร เทผ่านคอลัมน์ XAD-8 (1) เพื่อให้กรดฟุลวิคที่เกาะกับ XAD-8 ไหลผ่านคอลัมน์ออกมาพร้อมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เทน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร 2-3 ครั้งลงในคอลัมน์เดิม เพื่อให้กรดฟุลวิคบางส่วนที่เกาะกับ XAD-8 บางส่วนไหลผ่านคอลัมน์ออกจนหมด กรดฟุลวิคที่ได้เป็นของเหลวสีน้ำตาลแก่ เก็บของเหลวที่ได้ในขวดรูปชมพู่

4. นำของเหลวที่ได้ในขวดรูปชมพู่ จากข้อ 3 มาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จำนวน 5 มิลลิลิตร สังเกตเห็นว่าสีจะจางลง แล้วผ่านสารละลายที่ได้บน XAD-8 (2) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตามด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ทิ้งส่วนที่ไหลออกมา แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 8 มิลลิลิตร ผ่านบน XAD-8 (2) ปรับอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตามด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร 3 ครั้ง กรดฟุลวิคไหลออกมากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น

5. นำของเหลวจากข้อ 4 ผ่านบน AG-MP-50 (1) ตามด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ไว้ในขวดพลาสติก ซึ่งส่วนที่เก็บในขวดพลาสติกนี้เป็นกรดฟุลวิค จากนั้นเทโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร ผ่านบน AG-MP-50 (1) อีกครั้งเพื่อชะเอากรดฟุลวิคบางส่วนที่ค้างอยู่ที่ AG-MP-50 (1) จากนั้นนำส่วนที่ไหลออกมาผ่านบน AG-MP-50 (2) ล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง นำส่วนที่ไหลออกมาจาก AG-MP-50 (2) รวมกันกับกรดฟุลวิคที่บริสุทธิ์เก็บไว้ในขวดพลาสติกเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนกรดฟุลวิคที่ได้กล่าวข้างต้นแสดงดังรูป 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 การทำกรดฟุลวิคให้บริสุทธิ์

(ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของสมาคม IHSS)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.3 การกำจัดสารเจือปนในกรดฮิวมิก

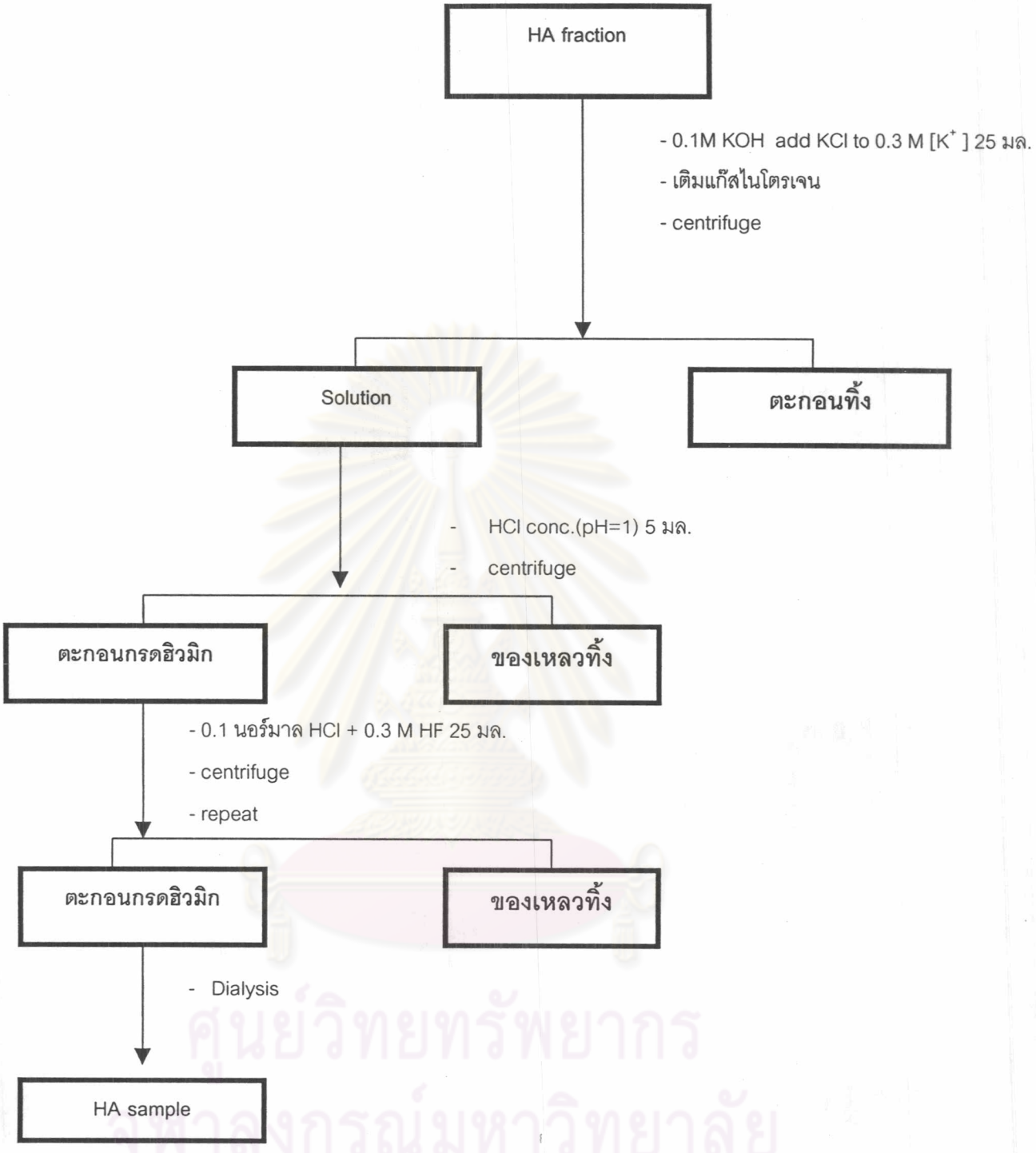
1. เตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น [K^+] รวมเท่ากับ 0.3 โมลาร์ (โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ โปแตสเซียมคลอไรด์ 14.90 กรัม ในสารละลาย 1 ลิตร) จากนั้นนำส่วนที่เป็นกรดฮิวมิก (ตะกอนสีดำ) ที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.5 เติมสารละลายที่มี [K^+] ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จำนวน 25 มิลลิลิตร เติมแก๊สไนโตรเจน ปิดฝาหลอดพลาสติกให้แน่น เหวี่ยงแยกอนุภาค 3500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ถ้าหากมีส่วนที่ตกตะกอนให้ทิ้ง นำของเหลวมาเติมด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จะเกิดการตกตะกอน จากนั้นเหวี่ยงแยกอนุภาค 3500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว

2. นำส่วนที่เป็นสารฮิวมิกมาเติม สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ผสมกับกรดไฮโดรฟลูออริก .3 โมลาร์ ในหลอดทดลองที่เป็นพลาสติกเขย่า 4 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกอนุภาค ทำซ้ำถ้าจำเป็น (หรือสังเกตส่วนที่เป็นของเหลวถ้าใสไม่ต้องทำซ้ำ) เทส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการเหวี่ยงแยกอนุภาคทิ้งเก็บส่วนที่เป็นกรดฮิวมิก (ตะกอนสีดำ) ไว้

3. นำส่วนที่เป็นกรดฮิวมิกมาผ่านกระบวนการไดอะไลซิส ดังนี้ ใช้กรรไกตัด dialysis tubing membrane (ลักษณะเป็นถุงยาวปลายเปิด 2 ข้าง) ความยาว 30 เซนติเมตร แช่น้ำประมาณ 5 นาที มัดที่ปลายถุงด้วยเอ็น จากนั้นให้ใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 25 มิลลิลิตร ละลายในส่วนที่เป็นกรดฮิวมิก เทใส่ ใน dialysis tubing membrane มัดด้วยเอ็น

4. นำ dialysis tubing membrane ที่มีกรดฮิวมิกและกรดไฮโดรคลอริกแช่ในน้ำ 500 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 12 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนน้ำ 8 ครั้ง จนไม่มีปริมาณคลอไรด์ในตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง SCT ใช้โหมดการวัด conductivity (ให้ conductivity ของน้ำที่ผ่านการไดอะไลส์มีค่า conductivity เท่ากัน) เก็บตัวอย่างกรดฮิวมิกในขวดพลาสติกปิดฝาให้สนิทก่อนนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไปซึ่งขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนในกรดฮิวมิกที่กล่าวข้างต้นแสดงในรูป 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การทำกรดฮิวมิกให้บริสุทธิ์

(ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของสมาคม IHSS)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิก

วิเคราะห์ปริมาณกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิกโดยวิธีวัดการเรืองแสงของสารละลายกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิก ซึ่งการหาปริมาณกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิกจะต้องหา calibration curve ของสารมาตรฐานกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิกก่อน จึงจะสามารถวัดความเข้มข้นของกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิกจากตัวอย่างที่สกัดได้จากดินตะกอน เมื่อทราบความเข้มข้นแล้วจะสามารถคำนวณหาปริมาณได้(ภาคผนวก ค)

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟุลวิค

นำตัวอย่างกรดฟุลวิคที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ Perkin Elmer LS 55 โดยก่อนการวิเคราะห์กรดฟุลวิคด้วยวิธีฟูลออโรมิเตอร์ ต้องปรับ pH ของกรดฟุลวิค pH = 6.5 จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดฟุลวิคความเข้มข้น 5, 25 และ 50 mg/L ในสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปรับ pH = 6.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง นำสารละลายไปวัดปริมาณการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น Ex = 390, Em =459 (Mobed et al., 1996)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิวมิก

นำตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ Perkin Elmer LS 55 ก่อนการวิเคราะห์กรดฟุลวิคด้วยวิธีฟูลออโรมิเตอร์ ต้องปรับ pH ของกรดฟุลวิค pH = 6.5

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดฮิวมิกความเข้มข้น 5, 25 และ 50 mg/L ในสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปรับ pH = 6.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง นำไปวัดที่ Ex = 466, Em =522 (Mobed et al., 1996)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.5 การวิเคราะห์ฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของกรดฟุลวิคและกรดฮิวมิก

วิเคราะห์หาฟังก์ชันนัลกรุ๊ป ด้วย FTIR ทำเพื่อยืนยันว่าสารตัวอย่างที่สกัดได้จากดินตะกอนเป็นสารฮิวมิก โดยพิจารณาสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่สกัดได้จากดินตะกอนเทียบกับสารมาตรฐานสารฮิวมิก

1.การวิเคราะห์กรดฟุลวิคด้วย FTIR

นำสารละลายกรดฟุลวิคหยดลงแผ่น window (ทำด้วย NaCl) แล้วใช้ window อีกแผ่นหนึ่งประกบลงไป แล้วนำไปใส่ cell holder นำไปวัดในเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ Perkin Elmer FTIR Spertrum Rx สามารถหาสเปกตรัมได้เลย

2.การวิเคราะห์กรดฮิวมิกด้วย FTIR

นำกรดฮิวมิกที่อบแห้งมาบดกับ KBr จากนั้นอัดสารให้เป็นแผ่นบางๆด้วยเครื่องอัด แล้วแล้วนำไปใส่ cell holder นำไปวัดในเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ Nicolet IR Impact 410 สามารถหาสเปกตรัมได้เลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย