โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคและทำให้บริสุทธิ์จากไบโอเอทานอล
Extraction and Purification of Humic and Fulvic Acids from Bio-ethanol Vinasses

ชื่อนิสิต นางสาวชัญญา ติ๊บปละ เลขประจำตัว 6033023623

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคและทำให้บริสุทธิ์จากไบโอเอทานอล

Extraction and Purification of Humic and Fulvic Acids from Bio-ethanol Vinasses

โดย
นางสาวชัญญา ติ๊บปละ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการ การสกัดกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคและทำให้บริสุทธิ์จากไบโอเอทานอล

โดย นางสาวชัญญา ติ๊บปละ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร. คเณศ วงษ์ระวี ประธานกรรมการ
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล กรรมการ
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 28 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ การสกัดกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคและทำให้บริสุทธิ์จากไบโอเอทานอล
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวชัญญา ติ๊บปละ เลขประจำตัว 6033023623
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

การนำสารฮิวมิกมาใช้คือการเพิ่มประสิทธิภาพทางการทำการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยกรดฮิวมิก กรดฟูลวิค และฮิวมิน กรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคช่วยป้องกันพืชจากความเครียด ทำให้มีการปรับสภาพดิน เร่งการเจริญเติบโตของพืช และช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุอาหาร โดยสกัดจากโพแทสเซียมฮิวเมทซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการกลั่นไบโอเอทานอลด้วยวิธีการสกัดด้วยกรด-เบส โดยละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงในการกำจัดฮิวมินออก จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริกให้มี pH เท่ากับ 1 ใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงในการแยกกรดฮิวมิกซึ่งเป็นตะกอนออกจากกรดฟูลวิคซึ่งเป็นสารละลาย นำกรดฮิวมิกไปอบแห้ง เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสกัด ระหว่างการใช้กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริกในการสกัด ผลการศึกษาพบว่าการใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดจะได้เปอร์เซ็นต์การสกัดของกรดฮิวมิกมากกว่า และใช้ปริมาตรของกรดที่น้อยกว่า อีกทั้งกรดซัลฟิวริกมีราคาที่ต่ำกว่าจึงเลือกใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดเนื่องจากต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิต ในส่วนของกรดฟูลวิคจะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทั้งแบบที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและไม่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อหาปริมาณของกรดฟูลวิคในโพแทสเซียมฮิวเมท ผลการศึกษาพบว่าสารตัวอย่างกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีกรดฟูลวิคอยู่ 11.87% w/w และ 3.58% w/w ของโพแทสเซียมฮิวเมททั้งหมดตามลำดับ

คำสำคัญ: โพแทสเซียมฮิวเมท, กรดฮิวมิก, กรดฟูลวิค

Project Title Extraction and Purification of Humic and Fulvic Acids from Bio-ethanol Vinasses
Student Name Miss Chanya Tipala Student ID 6033023623
Advisor Name Assistant Professor Dr. Monpichar Srisa-Art
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

The efficiency of agriculture can be improved by using humic substances (HS) which are divided into three categories including humic acid (HA), fulvic acid (FA), and humin. Humic and fulvic acids assist to protect plants against stress, serve as soil conditioners, stimulate plant growth, and increase nutrient absorption. Potassium humate is a by-product from the bioethanol distillation with acid-base extraction method. The process begins by dissolving potassium humate in sodium hydroxide solution in an appropriate ratio and centrifuge to remove the humin. After that, either concentrated sulfuric acid or hydrochloric acid is added into the solution until the pH = 1 and the mixture is then centrifuged to separate the precipitated humic acid from fulvic acid solution. Humic acid is further dried in order to compare the extraction yield between using sulfuric acid and hydrochloric acid. The results revelated that the extraction using sulfuric acid provides higher percent yield, lower added-volume, and lower production cost compared to hydrochloric acid. Therefore, sulfuric acid is selected for potassium humate extraction. Moreover, the extracted fulvic acid was analyzed using HPLC. The results show that the percent yields of the fulvic acid solution and the spray-dried fulvic acid are 11.87% w/w and 3.58% w/w, respectively.

keywords: potassium humate, humic acid, fulvic acid

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการแก้ปัญหา ให้ความรู้ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำงานวิจัย ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ตลอดจนการทำรูปเล่มรายงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มนพิชา ศรีสะอาด อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. คเณศ วงษ์ระวี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล ที่ให้ความกรุณามาเป็นกรรมการสอบการวิจัยและตรวจสอบแก้ไขรายงานให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณพศวัต ฟองสมุทร และคุณปาณิสราภรณ์ พันธุ์กิริยา ผู้ดูแลโครงการ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ อีกทั้งพนักงานบริษัท Napnutriscience Co. Ltd. ที่ดูแลเป็นอย่างดี ให้ข้อคิดและกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ รวมทั้งเทคนิคปฏิบัติการพื้นฐานในการทำงานวิจัย และขอระลึกถึงกำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัว เพื่อน จนสามารถดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้วิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อ ..... ค
Abstract ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญรูปภาพ ..... ช
สารบัญแผนภาพ ..... ซ
สารบัญตาราง ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 1
1.2.1 เอทานอล 1
1.2.2 Vinasse 3
1.2.3 สารฮิวมิก (humic substances) 6
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ 6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7
บทที่ 2 การทดลอง 8
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ 8
2.2 รายการสารเคมี 8
2.3 การสกัดกรดฮิวมิกด้วยวิธี Acid-base extraction โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 9
2.4 การสกัดกรดฮิวมิกด้วยวิธี Acid-base extraction โดยใช้กรดซัลฟิวริก 9
2.5 การวิเคราะห์กรดฟูลวิคโดยเทคนิค high performance liquid chromatography 9
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 10
3.1 การหาชนิดและปริมาตรของกรดที่ใช้ในการสกัดกรดฮิวมิก 10
3.2 วิเคราะห์กรดฟูลวิคโดยเทคนิค high performance liquid chromatography 12
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 18
ข้อเสนอแนะ 18
เอกสารอ้างอิง 19
ประวัติผู้วิจัย 21

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส [10]..... 2
รูปภาพที่ 1.2 ลักษณะทางการภาพของ vinasse [13]..... 4
รูปภาพที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของกรดอินทรีย์ที่พบใน vinasse..... 5
รูปภาพที่ 3.1 กรดฮิวมิกอบแห้งโดยการใช้ (ก) กรดซัลฟิวริก (ข) กรดไฮโดรคลอริก ในการสกัด 11
รูปภาพที่ 3.2 โครมาโตแกรม (ก) กรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry 13
รูปภาพที่ 3.3 โครมาโตแกรม (ก) กรดฟูลวิคที่ไม่ได้ทำการ spike (ข) spiked sample..... 15
รูปภาพที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดฟูลวิคและพื้นที่ใต้พีค 16

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1.1 แผนผังกระบวนการการผลิตเอทานอลและ vinasse จากอ้อย [11]..... 3
แผนภาพที่ 1.2 แผนผังกระบวนการการผลิตผง vinasse [17]..... 5

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบทางเคมีของ vinasse [12] 3
ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างองค์ประกอบใน vinasse ของอ้อย [16] 5
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักกรดฮิวมิก และ %การสกัด จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก ในการทดลองครั้งที่ 1 10
ตารางที่ 3.2 น้ำหนักกรดฮิวมิก และ %การสกัด จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก ในการทดลองครั้งที่ 2 11
ตารางที่ 3.3 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry 14
ตารางที่ 3.4 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry 14
ตารางที่ 3.5 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคสารมาตรฐานกรดฟูลวิค 14
ตารางที่ 3.6 ค่า Retention time พื้นที่ และความสูงของพีค spiked sample (*กรดฟูลวิค) 16
ตารางที่ 3.7 ค่า Retention time พื้นที่ และความสูงของพีคที่ไม่ได้ทำการ spike (*กรดฟูลวิค) 16

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรดินเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาการเกษตร การจะได้ผลผลิตที่ดีต้องมีทรัพยากรดินที่อุดมสมบูรณ์ เกษตรกรจึงนำสารอินทรีย์มาใช้ประโยชน์ คือ ซากพืชซากสัตว์ที่ย่อยสลายแล้วหรือสารฮิวมิก (humic substances) เป็นสารประกอบอินทรีย์ตามธรรมชาติซึ่งประกอบด้วย 50 ถึง 90% ของอินทรียวัตถุของถ่านหิน ลิกไนต์ ตลอดจนอินทรียวัตถุที่ไม่มีชีวิตในระบบนิเวศของดินและน้ำ [1] พบว่าถ่านหินแต่ละชนิดประกอบด้วยสารฮิวมิกที่มีโครงสร้างแตกต่างกันไปตามระยะเวลาและแหล่งที่เกิดถ่านหินนั้น สารฮิวมิกแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ กรดฮิวมิก (humic acid) กรดฟูลวิค (fulvic acid) และฮิวมิน (humin) [2] โมเลกุลของกรดฮิวมิกมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของกรดฟูลวิคและสามารถปรับสภาพดินได้ดี และเร่งการเจริญเติบโตของพืช จึงถูกนำไปใช้และได้รับผลสำเร็จเป็นอย่างดีในหลายพื้นที่ทางด้านผลิตผลทางการเกษตร ส่วนกรดฟูลวิคมีโมเลกุลที่เล็กกว่าและออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า ทั้งช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและปรับปรุงความต้านทานตามธรรมชาติของพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม และมีสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออนสูงสุดทำให้พืชสามารถดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น มีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม ช่วยให้พืชมีคุณภาพดีขึ้นรวมทั้งการเพิ่มผลผลิตด้วย [3]

เนื่องจากปัจจุบันในท้องตลาดอุตสาหกรรมปุ๋ยและอาหารเสริมของพืชมีผู้ผลิตสารฮิวมิกจำนวนมาก แต่ยังมีผู้ผลิตน้อยรายที่ทำการสกัดแยกขายสินค้าเฉพาะกรดฮิวมิกหรือกรดฟูลวิค ทางบริษัท Napnutriscience Co. Ltd. จึงต้องการทำการสกัดเพื่อเพิ่มความหลากหลายของสินค้าจากเดิม และเพื่อเป็นอีกทางเลือกสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการเฉพาะกรดฮิวมิกหรือกรดฟูลวิคเพียงชนิดเดียวให้ตรงตามความต้องการของพืช ดังนั้นโครงการนี้จึงนำซากพืชที่ย่อยสลายแล้ว ได้แก่ กากน้ำตาล หลังการทำการกลั่นเอทานอล (ethanol distillation) มาสกัดแยกให้ได้กรดฮิวมิกและกรดฟูลวิค

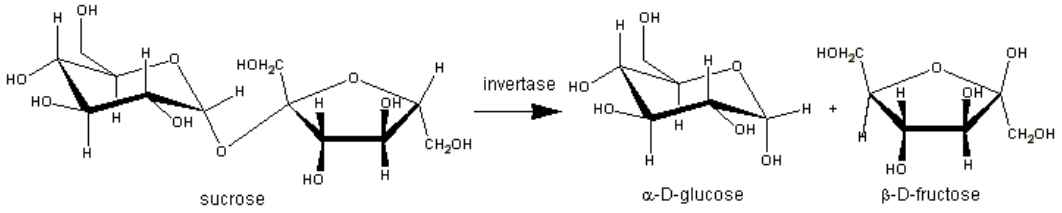
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เอทานอล

เอทานอล (ethanol) เรียกอีกอย่างว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) หรือ แอลกอฮอล์จากเมล็ดพืช (โครงสร้างทางเคมีคือ C_2H_6O) เป็นของเหลวไม่มีสี, ระเหยง่าย และไวไฟ ซึ่งได้มาจากการหมักน้ำตาลหรือแป้ง หรือโดยการสังเคราะห์ทางเคมี [4] การเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นเชื้อเพลิงเอทานอลหรือที่เรียกกันทั่วไปว่าไบโอเอทานอล (bio-ethanol) อาจจะแตกต่างกันในผู้ผลิตแต่ละราย โดยวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปคือการหมักน้ำตาลโมเลกุลคู่และแป้ง กากน้ำตาลถือเป็นวัตถุดิบสำคัญที่สุดในประเทศไทยสำหรับการผลิต

เอทานอลเนื่องจากมีทรัพยากรหมุนเวียนในประเทศอย่างมากมาย ดังนั้นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่นิยมใช้คือกากน้ำตาลและอ้อยเนื่องจากมีปริมาณซูโครส (sucrose) สูง [5]

ขั้นตอนแรกของการผลิตคือการย่อยสลายซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) หรือซูเครส (sucrase) หรือแซคคาเรส (saccharase) ถูกนำมาใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของซูโครส [6] โดยสมการของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแสดงไว้ใน **รูปภาพที่ 1.1**

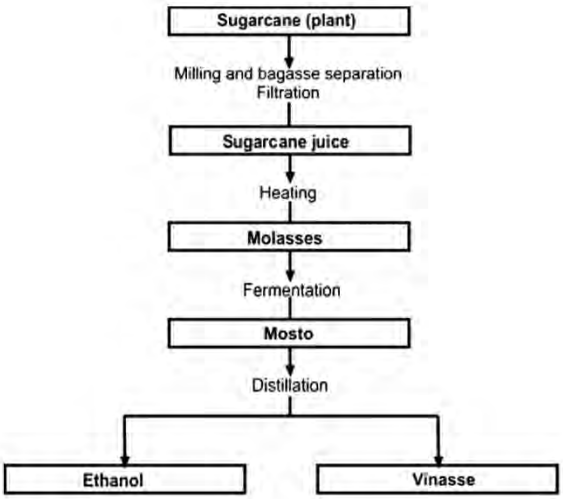


รูปภาพที่ 1.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของซูโครส [10]

หลังจากนั้นจะตามมาด้วยการหมักโดยการใช้ยีสต์ (yeast) ซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสและฟรุกโตสเป็นไบโอเอทานอล โดยแสดงสมการดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

สุดท้ายเอทานอลที่ผ่านการหมักจะถูกนำไปสู่การกลั่นเพื่อแยกเอทานอลออกจากส่วนผสมน้ำที่จุด azeotropic ความร้อนจะถูกนำไปใช้ในการระเหยสารที่จุดเดือดต่ำกว่า ในกรณีนี้เอทานอลจะระเหยเร็วกว่าน้ำเพราะมีจุดเดือดที่ต่ำกว่า ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะไหลผ่านท่อ เก็บและควบแน่นไว้ในอีกภาชนะ สิ่งที่เหลือจากการกลั่นเป็นที่รู้จักกันในชื่อของ vinasse หรือกาก สามารถนำมาใช้ในการผลิตแก๊สธรรมชาติโดยการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic digestion) มีการแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย และผลพลอยได้อื่น ๆ ที่มีมูลค่า ตามที่แสดงใน **แผนภาพที่ 1.1** ผลพลอยได้จาก vinasse จะถูกนำไปแปรรูปเพื่อกำจัดผลกระทบต่อธรรมชาติทั้งมลพิษทางอากาศและมลพิษทางบก เพื่อจะกลายเป็นการเพิ่มมูลค่าขยะชีวภาพ (biowaste) ให้กับระบบเศรษฐกิจหมุนเวียน



แผนภาพที่ 1.1 แผนผังกระบวนการการผลิตเอทานอลและ vinasse จากอ้อย [11]

1.2.2 Vinasse

Vinasse เป็นสารละลายที่เป็นกรด (ช่วง pH คือ 3.5-5) มีสีน้ำตาลเข้มและมีสารอินทรีย์สูง (คาร์บอน, ไฮโดรเจน, ออกซิเจน และไนโตรเจน) องค์ประกอบทางเคมีของ vinasse จะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล vinasse จากกากน้ำตาลมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์, โพแทสเซียม, แคลเซียม และแมกนีเซียมสูง องค์ประกอบเหล่านี้สามารถใช้เป็นปุ๋ยที่เป็นสารอาหารหลักและรองของพืชได้ โดยทั่วไปองค์ประกอบของ vinasse เป็นน้ำ 90% และที่เหลือเป็นสารอินทรีย์ [7] องค์ประกอบทางเคมีของ vinasse แสดงดัง **ตารางที่ 1.1** และลักษณะของ vinasse แสดงดัง **รูปภาพที่ 1.2** จะเห็นได้ว่า vinasse สามารถมีองค์ประกอบคาร์บอนได้ถึง 33,000 mg/L และโพแทสเซียม 13,700 mg/L ประโยชน์ของ vinasse นอกจากจะใช้เป็นปุ๋ยและสารปรับปรุงดินแล้ว ยังสามารถเป็นอาหารสัตว์ได้อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นการย่อยสลาย vinasse แบบไม่ใช้ออกซิเจนยังให้แก๊สไบโอมีเทน (biomethane) ในปริมาณมากซึ่งเป็นเชื้อเพลิงในการสร้างพลังงาน

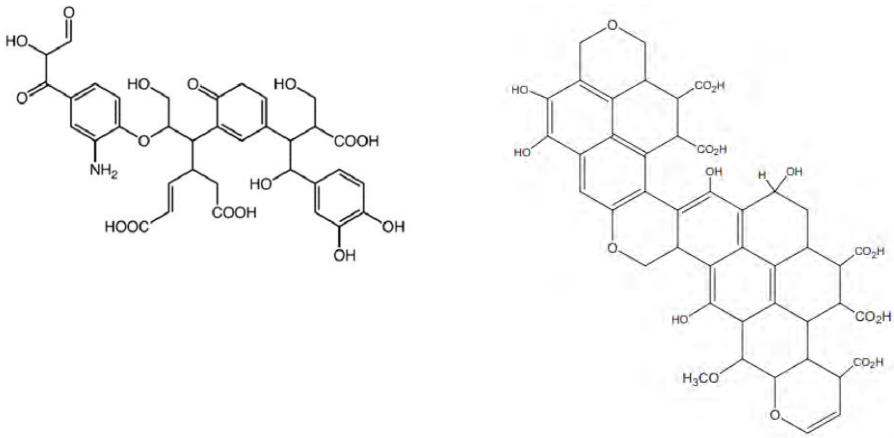
ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบทางเคมีของ vinasse [12]

Characteristic	Value
Color	dark brown
Specific gravity	1.05
pH	4.06
Electrical conductivity, S m^{-1}	10.5
Loss-on-ignition, kg kg^{-1}	0.58
Total organic C, mg L^{-1}	33,000
Total N, mg L^{-1}	1,150
PO_4, mg L^{-1}	375
Cl, mg L^{-1}	9,560
Na, mg L^{-1}	528
K, mg L^{-1}	13,700
Ca, mg L^{-1}	1,990
Mg, mg L^{-1}	1,240
Chemical O_2 demand, mg L^{-1}	82,700
Biological O_2 demand, mg L^{-1}	21,700
Total solids, mg L^{-1}	93,800
Suspended solids, mg L^{-1}	
>8 μm	1,532
1.2–8 μm	1,726
0.45–1.2 μm	445
0.22–0.45 μm	130

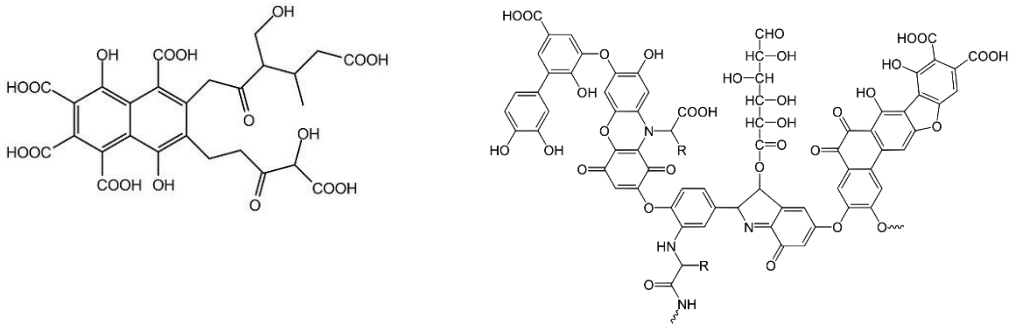
รูปภาพที่ 1.2 ลักษณะทางการภาพของ vinasse [13]

Vinasse เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตพืช (biostimulant) โดย biostimulant เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ทางการเกษตรใน EU regulation ที่กำลังจะมีขึ้น โดยพื้นฐานแล้วเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการเจริญเติบโตของพืชในหลายด้าน เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ธาตุอาหาร ความอดทนต่อความเครียด การแก้ไขดินเค็มและความเป็นกรดของดิน ในทางเคมี biostimulant เป็นกรดอินทรีย์ กล่าวคือกรดอินทรีย์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดที่เป็น plant biostimulant คือกรดฮิวมิก (humic acid) และ กรดฟูลวิค (fulvic acid) โดยแสดงตัวอย่างโครงสร้างใน **รูปภาพที่ 1.3** จะเห็นได้ว่ามีหลายโครงสร้างโดยขึ้นกับต้นกำเนิด ที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ และเขตภูมิอากาศ

(a)



(b)

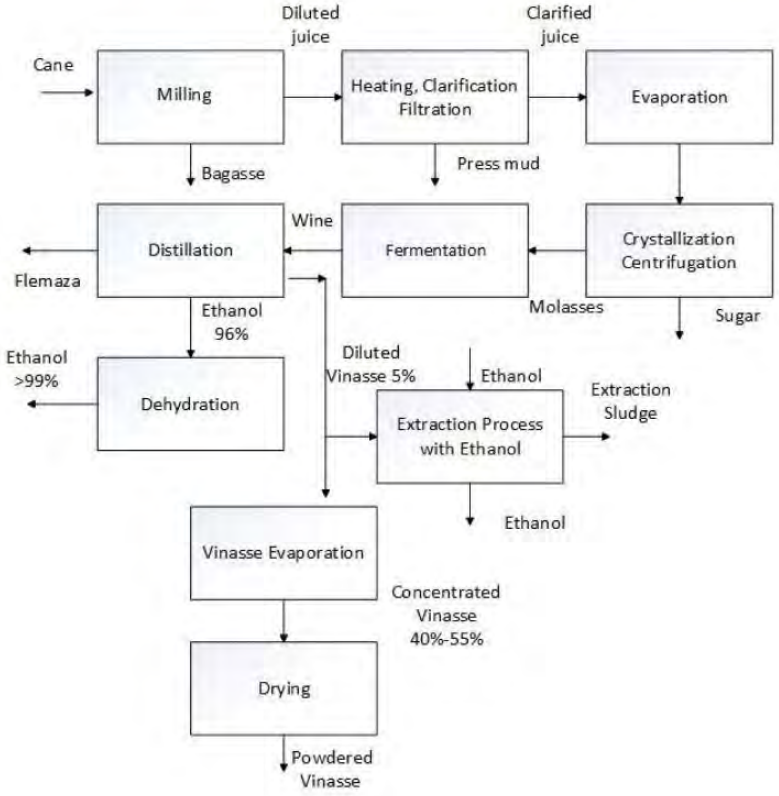


รูปภาพที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของกรดอินทรีย์ที่พบใน vinasse
(a) กรดฮิวมิก [14] (b) กรดฟูลวิค [15,18]

อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เหล่านี้แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ตัวอย่างเช่น **ตารางที่ 1.2** แสดงความเข้มข้นของกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคใน vinasse จากอ้อย

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างองค์ประกอบใน vinasse ของอ้อย [16]

Characteristics		Values	Characteristics		Values
pH	.	4.43	Total K	%	0.6
EC	dSm^{-1}	21.0	Total Ca	%	0.54
Organic Carbon	%	3.10	Total Mg	%	0.27
Organic matter	%	6.2	Total Na	%	0.068
Fulvic acid	%	0.83	SO_4	%	0.6
Humic acid	%	0.32	Total Solids	$g\ L^{-1}$	90.0
Total N	$mg\ L^{-1}$	1204	Soluble Solids	$g\ L^{-1}$	83.0
NH_4	$mg\ L^{-1}$	87.6	Total COD	$g\ L^{-1}$	100
NO_3	$mg\ L^{-1}$	182.4	Soluble COD	$g\ L^{-1}$	85
Total P	$mg\ L^{-1}$	423	Total BOD	$g\ L^{-1}$	39
Soluble P	$mg\ L^{-1}$	185	Soluble BOD	$g\ L^{-1}$	35



แผนภาพที่ 1.2 แผนผังกระบวนการการผลิตผง vinasse [17]

แผนภาพที่ 1.2 แสดงให้เห็นขั้นตอนโดยรวมทีละขั้นตอนของวิธีการทำให้ vinasse เพิ่มมูลค่าทางการเกษตร หลังจากการกลั่นไบเอทานอลจะได้ผลพลอยได้เป็น vinasse จำนวนมาก เมื่อผ่านกระบวนการจนมาถึงขั้นตอนสุดท้ายจะได้รับผง vinasse ขนาดเล็ก

1.2.3 สารฮิวมิก (humic substances)

สารฮิวมิกประกอบด้วยกลุ่มของสารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลสูง ทั้งนี้เกิดจากการแปรสภาพและสังเคราะห์รวมตัวกันขึ้นมาใหม่ของสารที่ไม่ใช่ฮิวมิก (nonhumic substances) โครงสร้างของสารฮิวมิกเป็นแบบอสัณฐาน ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน มีหลายสี เช่น สีเหลือง สีน้ำตาล จนถึงสีน้ำตาลดำ แสดงสมบัติเป็นสารคอลลอยด์ โดยมีอนุภาคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-10 นาโนเมตร และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของอินทรียวัตถุที่เหมาะสมตกค้างอยู่ในดิน ซึ่งมีอิทธิพลต่อสมบัติทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และ

ทางชีวเคมีของดิน สารฮิวมิกละลายน้ำได้น้อยมากแต่บางส่วนละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดและด่าง ถ้าอาศัยความสามารถในการละลายได้ในสารละลายดังกล่าวเป็นเกณฑ์ [5]

1.2.3.1 สารฮิวมิกแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1) กรดฮิวมิก (humic acid) ละลายในสารละลายสภาวะที่เป็นด่าง และนำสารละลายด่างที่สกัดได้นั้นมาตกตะกอนด้วยกรดจะได้ตะกอนของกรดฮิวมิก ส่วนที่ไม่ตกตะกอน คือ กรดฟูลวิคสีน้ำตาล
2) กรดฟูลวิค (fulvic acid) สารละลายที่เหลือจากการทำให้เป็นกรดในข้อ 1 สีของกรดฟูลวิคจะขึ้นอยู่กับค่า pH โดยค่า pH ที่ต่ำมาก ๆ จะเป็นสีเหลืองฟาง และเมื่อ pH เพิ่มขึ้นถึง 3 จะเปลี่ยนเป็นสีส้ม กรดฟูลวิคสามารถละลายได้ในสารละลายทุกสภาวะทั้งกรด กลาง และด่าง
3) ฮิวมิน (humin) ไม่ละลายทั้งในกรดและด่าง มีสีดำหรือน้ำตาลเข้ม

สารประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้ มีสมบัติคล้ายคลึงกันในการควบคุมสมบัติของดิน เช่น สามารถดูดยึดและแลกเปลี่ยนประจุบวกได้ดี นอกจากความแตกต่างกันในการละลายแล้ว โดยทั่วไปพบว่า กรดฟูลวิคเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ประเภทที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยเฉลี่ยมักอยู่ในช่วง 500-20,000 ดาลตัน ส่วนกรดฮิวมิกเป็นพวกที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่าคือ ประมาณ 10,000-100,000 ดาลตัน หรือมากกว่า สำหรับฮิวมินนั้นในปัจจุบันพบว่าส่วนใหญ่เป็นพวกกรดฮิวมิกที่มีมวลโมเลกุลสูง ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบต่าง ๆ รวมทั้งหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ในโมเลกุลของสารทั้งสองใกล้เคียงกัน แต่การที่ฮิวมินไม่ละลายในด่าง เนื่องจากสารดังกล่าวถูกยึดไว้อย่างเหนียวแน่นโดยอนุภาคดินสำคัญ เช่น แร่ดินเหนียว ดังนั้น ในการศึกษาธรรมชาติและสมบัติของสารฮิวมิกส่วนมากจึงเน้นเฉพาะส่วนที่เป็นกรดฮิวมิก และกรดฟูลวิค สำหรับฮิวมินถือว่ามีสมบัติใกล้เคียงไปทางกรดฮิวมิก [2]

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) ทำการสกัดกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคให้บริสุทธิ์จากไบโอเอทานอล หาสภาวะและอัตราส่วนที่ดีที่สุดเพื่อให้ได้ %การสกัด ที่มากที่สุดและค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด
2) วิเคราะห์หาปริมาณและตรวจสอบกรดฮิวมิกและกรดฟูลวิค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่หลากหลายจากการพัฒนาต่อยอดจากผลิตภัณฑ์เดิม (โพแทสเซียมฮิวเมท) และเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าของบริษัท Napnutriscience Co. Ltd.

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

1) บีกเกอร์ (beaker)
2) หลอดหยดสาร (dropper)
3) กระบอกตวง (cylinder)
4) ช้อนตักสารแบบเหล็ก (spatula)
5) ช้อนตักสารแบบพลาสติก (spoon)
6) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic stirrer)
7) หลอดทดลอง (test tube)
8) หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)
9) ไมโครปิเปต (micropipette)
10) เครื่องอัลตร้าโซนิค (sonicator bath)
11) เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
12) เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)
13) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
14) เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)
15) เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)
16) ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
17) เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)

2.2 รายการสารเคมี

1) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ความเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์
2) กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์
3) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
4) เมทานอล (methanol)
5) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
6) โมโนโซเดียมฟอสเฟต (monosodium phosphate)
7) โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (monopotassium phosphate)
8) น้ำกลั่น (deionized water)

2.3 การสกัดกรดฮิวมิกด้วยวิธี Acid-base extraction โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก

1) ชั่งโพแทสเซียมฮิวเมทด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2) ละลายโพแทสเซียมฮิวเมทด้วย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารช่วยในการคนจนกระทั่งโพแทสเซียมฮิวเมทละลายหมด พร้อมจดบันทึกอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักโพแทสเซียมฮิวเมทและปริมาตรของ 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์
3) นำสารละลายที่ได้ไป centrifuge เพื่อกำจัดตะกอนที่เป็นฮิวมินออก
4) นำส่วนที่เป็นสารละลายไปเติม 37 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก จนกระทั่งสารละลายมีค่า pH ประมาณ 1 พร้อมจดบันทึกปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่เติม
5) นำสารละลายที่ได้ไป centrifuge เพื่อแยกตะกอนที่เป็นกรดฮิวมิก และชั้นสารละลายที่เป็นกรดฟูลวิค
6) นำตะกอนที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อน 100 °C เป็นเวลาทั้งหมด 9 ชั่วโมง เพื่อทำให้กรดฮิวมิกแห้งและกำจัดกลิ่นเปรี้ยว จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อหา %การสกัด

2.4 การสกัดกรดฮิวมิกด้วยวิธี Acid-base extraction โดยใช้กรดซัลฟิวริก

ทำการทดลองเหมือน 2.3 แต่เปลี่ยนกรดที่ใช้เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริก ในขั้นตอนที่ 4) พร้อมจดบันทึกปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่เติม

หลังจากสกัดโพแทสเซียมฮิวเมทใน 2.3 และ 2.4 แล้ว นำกรดฮิวมิกที่ผ่านการอบแห้งมาเปรียบเทียบ %การสกัด ระหว่างการใช้กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกในการสกัด เพื่อหาว่ากรดใดให้ %การสกัด ที่มากกว่ากัน แล้วจึงนำกรดฟูลวิคที่ได้จากการสกัดด้วยกรดชนิดนั้นไปทำการ spray dry โดยทำการเตรียมสารตัวอย่างใหม่ที่มีสเกลใหญ่ขึ้นเนื่องจากการทำ spray dry มีความจำเป็นต้องใช้สารตัวอย่างที่มีปริมาตรมาก และนำผงกรดฟูลวิคไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

$$\text{การหา \%การสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักกรดฮิวมิกที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมฮิวเมท}} \times 100\%$$

2.5 การวิเคราะห์กรดฟูลวิคโดยเทคนิค high performance liquid chromatography

1) ปิเปตกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry 500 µL ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรเป็น 10 mL
2) ชั่งกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry 50 mg ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรเป็น 10 mL
3) จากนั้นนำกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry และผ่านการ spray dry มากรองเก็บในขวด vials เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การหาชนิดและปริมาตรของกรดที่ใช้ในการสกัดกรดฮิวมิก

จากการสกัดโพแทสเซียมฮิวเมทโดยเริ่มจากการละลายโพแทสเซียมฮิวเมทด้วย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อกำจัดตะกอนคือฮิวมิน เนื่องจากฮิวมินไม่สามารถละลายได้ในสารละลายสภาวะด่าง [2] จากนั้นจึงนำไปเติมกรดโดยเติมให้สารละลายมี pH ใกล้เคียง 1 และนำไปหมุนเหวี่ยง จะได้ตะกอนคือกรดฮิวมิก เนื่องจากกรดฮิวมิกไม่ละลายในสารละลายสภาวะกรด และได้สารละลายคือกรดฟูลวิค เนื่องจากกรดฟูลวิคสามารถละลายได้ในทุกสภาวะทั้งกรด กลาง และด่าง [2] โดยในการทดลองครั้งที่ 1 มีการเติม 37 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก และ 98 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริก และต้องการทราบว่าถ้าหากลดปริมาตรกรดที่เติมลงไปจะส่งผลต่อ %การสกัด หรือไม่ จึงทำการเติมกรดที่มีปริมาตรแตกต่างกัน 3 ปริมาตรของกรดแต่ละชนิด ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่เติม คือ a, b และ c mL โดย a>b>c ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่เติม คือ d, e และ f mL โดย d>e>f และเมื่อนำกรดสองชนิดนี้มาเปรียบเทียบปริมาตรที่เติมพบว่า a>b>c>d>e>f ซึ่งการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นเพื่อต้องการเปรียบเทียบ %การสกัด และหา %การสกัด ที่มากที่สุด ก่อนนำไปทำการทดลองสกัดซ้ำในการทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักกรดฮิวมิก และ %การสกัด จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก ในการทดลองครั้งที่ 1

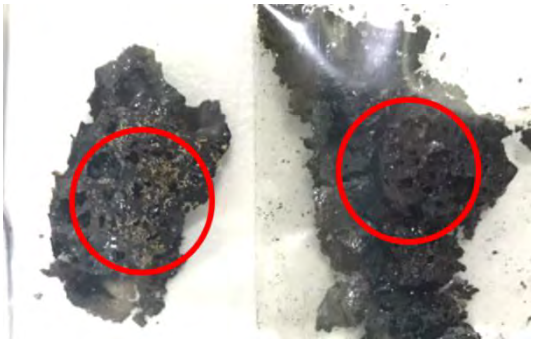
ปริมาตรกรดที่เติม (mL)	ไฮโดรคลอริก		ปริมาตรกรดที่เติม (mL)	ซัลฟิวริก	
	น้ำหนักกรดฮิวมิก (g)	%การสกัด		น้ำหนักกรดฮิวมิก (g)	%การสกัด
a	3.4810	34.81%	d	3.1958	31.96%
b	3.1058	31.06%	e	3.9241	39.24%
c	3.0274	30.27%	f	3.3212	33.21%

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าในส่วนของการใช้กรดไฮโดรคลอริกในการสกัด ปริมาตรกรดที่เติม a และ b ของกรดไฮโดรคลอริก มีน้ำหนักและ %การสกัด ที่มากกว่า และในส่วนของการใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัด ปริมาตรกรดที่เติม e และ f ของกรดซัลฟิวริก มีน้ำหนักและ %การสกัด ที่มากกว่า จึงได้ทำการทดลองซ้ำอีก 4 ครั้งของแต่ละปริมาตรกรดที่เติมในการทดลองครั้งที่ 2 เพื่อต้องการหาความแม่นยำ

ตารางที่ 3.2 น้ำหนักกรดฮิวมิก และ %การสกัด จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก ในการทดลองครั้งที่ 2

	กรดไฮโดรคลอริก				กรดซัลฟิวริก			
ปริมาตรกรดที่เติม (mL)	a		b		e		f	
	น้ำหนัก (g)	%การสกัด	น้ำหนัก (g)	%การสกัด	น้ำหนัก (g)	%การสกัด	น้ำหนัก (g)	%การสกัด
ครั้งที่ 1	3.4031	34.03	3.0214	30.21	3.8271	38.27	3.6435	36.44
ครั้งที่ 2	3.2436	32.44	3.0288	30.29	3.6217	36.22	3.0115	30.12
ครั้งที่ 3	3.1508	31.51	3.1490	31.49	3.6442	36.44	3.2536	32.54
ครั้งที่ 4	3.3560	33.56	3.0898	30.90	3.7281	37.28	3.0980	30.98
เฉลี่ย	3.2884	32.88	3.0722	30.72	3.7053	37.05	3.2516	32.52
SD	0.1135	1.14	0.0596	0.60	0.0932	0.93	0.2797	2.80
%RSD	3.45	3.45	1.94	1.94	2.52	2.52	8.60	8.60

(ก) **(ข)**



รูปภาพที่ 3.1 กรดฮิวมิกอบแห้งโดยการใช้ (ก) กรดซัลฟิวริก (ข) กรดไฮโดรคลอริก ในการสกัด

จาก**รูปภาพที่ 3.1** จะเห็นได้ว่าการใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดนั้นพบจุดสีเหลืองส้มติดอยู่ที่กรดฮิวมิกหลังอบแห้ง คาดว่าเป็นเพราะมีซัลเฟอร์ ซึ่งมีสีเหลืองและมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 115.21 ℃ [19] จึงไม่สามารถกำจัดตอนนำไปอบแห้งออกไปได้หมด จึงทำให้น้ำหนักและ %การสกัด ของกรดฮิวมิกโดยใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดมากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริก

จากการคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่าในส่วนของการใช้กรดไฮโดรคลอริกในการสกัด ปริมาตรกรดที่เติม b มีค่า SD และ %RSD ที่ต่ำกว่า a และในส่วนของการใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัด ปริมาตรกรดที่เติม e มีค่า SD

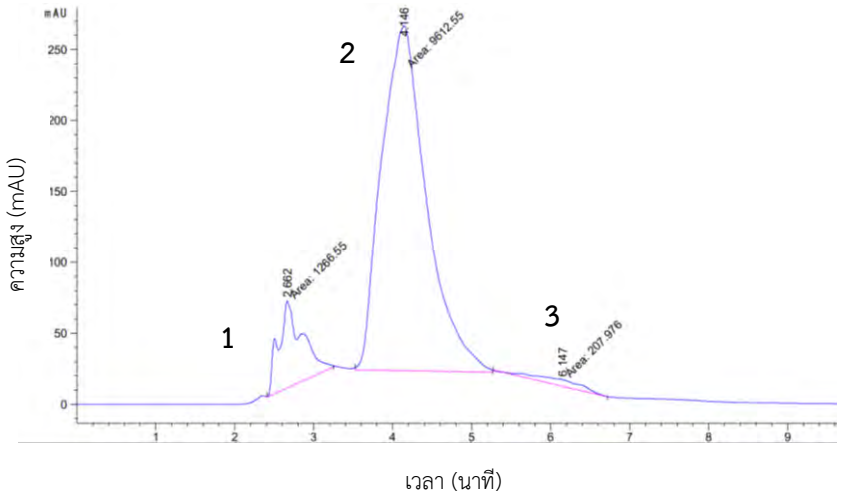
และ %RSD ที่ต่ำกว่า f ซึ่งหมายความว่าน้ำหนักกรดฮิวมิกที่สกัดได้ในแต่ละครั้งของปริมาตรกรดที่เติม b และ e มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักกรดฮิวมิกเฉลี่ย แสดงถึงความแม่นยำและมีความเที่ยงสูงในการทำการทดลองแต่ละครั้ง แต่จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า SD และ %RSD ของปริมาตรกรดที่เติม b และ e แล้ว ปริมาตรกรดที่เติม b ซึ่งเป็นการใช้กรดไฮโดรคลอริกในการสกัดจะมีค่าที่มากกว่าปริมาตรกรดที่เติม e ที่เป็นการใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อคำนึงถึงปริมาตรกรดที่จะต้องใช้และค่าใช้จ่าย จึงเลือกใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดเพราะใช้ปริมาตรของกรดน้อยกว่าและค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าเพื่อเป็นการประหยัดต้นทุน

จากผลการทดลองในครั้งที่ 2 เลือกใช้กรดซัลฟิวริกในการสกัดกรดฮิวมิกออกจากสารละลาย จากนั้นจึงนำส่วนสารละลายที่ผ่านการสกัดที่ประกอบด้วยกรดฟูลวิค (533 mL) ไปทำการ spray dry เมื่อผ่านการ spray dry แล้วได้ผงกรดฟูลวิค (43.59 g) จึงนำผงกรดฟูลวิคไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography เพื่อหาปริมาณกรดฟูลวิค

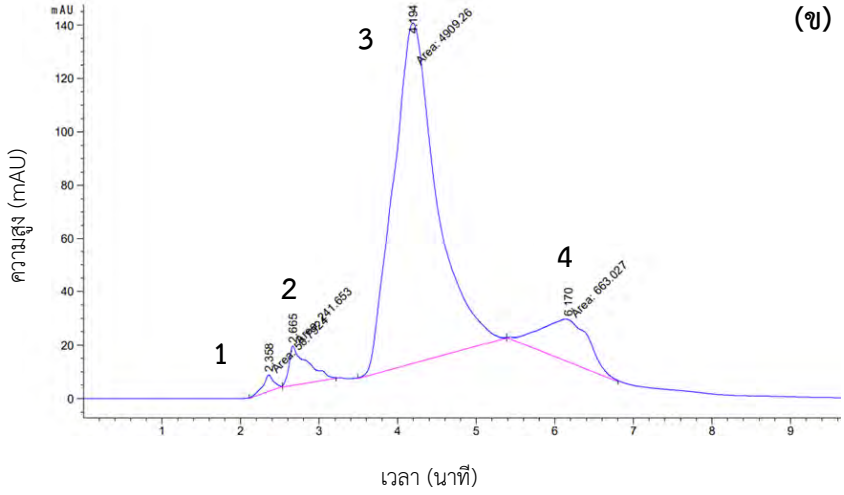
3.2 วิเคราะห์กรดฟูลวิคโดยเทคนิค high performance liquid chromatography

ในการวิเคราะห์กรดฟูลวิค โดยใช้กรดฟูลวิคที่มาจากการสกัดโพแทสเซียมฮิวเมทด้วยกรดซัลฟิวริก โดยทำการวิเคราะห์กรดฟูลวิค 2 แบบ คือ กรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry แล้ว และยังไม่ผ่านการ spray dry เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้เฟสคงที่ (stationary phase) แบบ reverse phase คอลัมน์ชนิด C18 คือ Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 มิลลิเมตร x 250 มิลลิเมตร x 5 ไมโครเมตร) ตรวจวัดด้วย UV-visible และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลาย A คือ เมทานอลและสารละลาย B คือ 0.1 M สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมคลอไรด์กับ 1 mM ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Na_2HPO_4) และ 1 mM โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟส (KH_2PO_4) โดยมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการวิเคราะห์ที่เรียกว่าระบบ gradient elution ซึ่งอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min ได้กราฟโครมาโตแกรมแสดงใน **รูปภาพที่ 3.2** ดังนี้

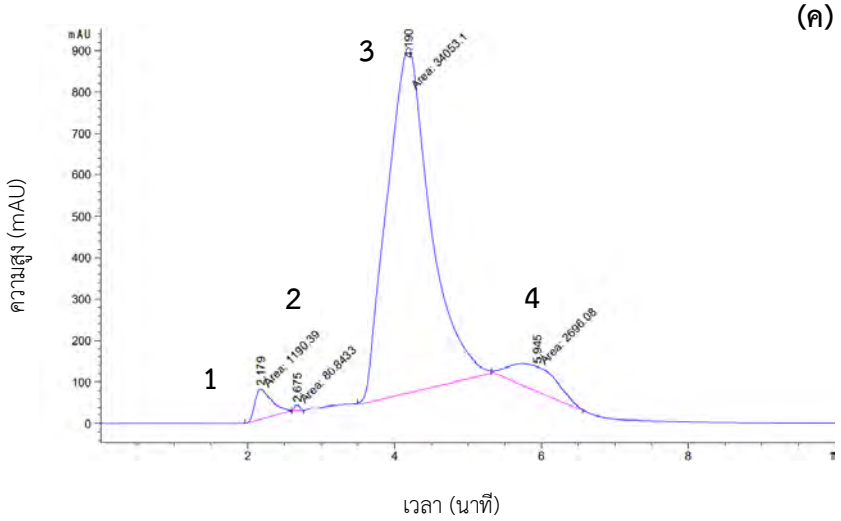
(ก)



(ข)



(ค)



รูปภาพที่ 3.2 โครมาโตแกรม (ก) กรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry (ข) กรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry (ค) สารมาตรฐานกรดฟูลวิค

ตารางที่ 3.3 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry

Peak	RetTime (min)	Area (mAU*s)
1	2.662	1266
2	4.146	9612
3	6.147	2087

ตารางที่ 3.4 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry

Peak	RetTime (min)	Area (mAU*s)
1	2.358	59
2	2.665	242
3	4.194	4909
4	6.170	663

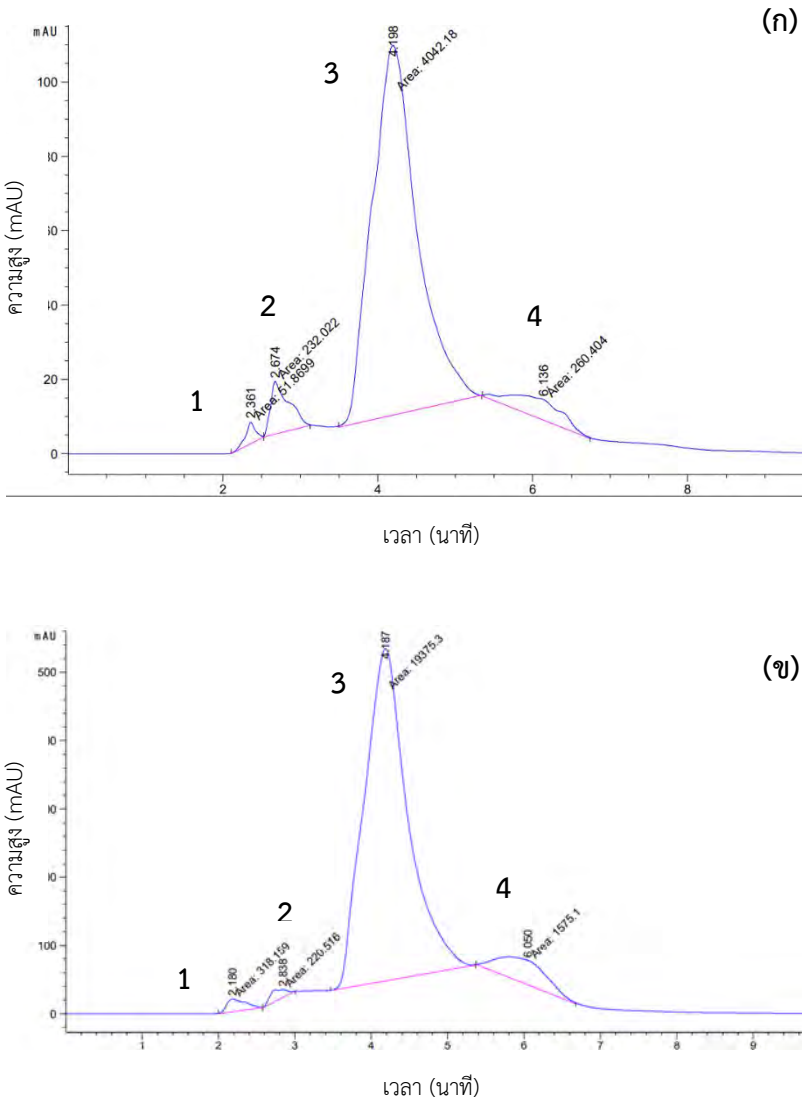
ตารางที่ 3.5 ค่า Retention time และพื้นที่ของพีคสารมาตรฐานกรดฟูลวิค

Peak	RetTime (min)	Area (mAU*s)
1	2.179	1190
2	2.675	81
3	4.190	34053
4	5.945	2696

จากการวิเคราะห์กรดฟูลวิคทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการ spray dry และสารมาตรฐานกรดฟูลวิคด้วยเทคนิค HPLC พบว่าพีคของสารปรากฏในช่วง retention time 2-7 นาที โดย retention time ที่ประมาณ 4.1 นาที ของทุกสารปรากฏพื้นที่ใต้พีคสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าเป็นพีคของกรดฟูลวิค และพีคที่ปรากฏที่ retention time ประมาณ 2.1 นาที และ 5.9 นาที ในโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดฟูลวิคคาดว่าเป็นกรดฟูลวิคที่เป็นโครงสร้างที่แตกต่างจากที่ retention time 4.1 นาที เนื่องจากกรดฟูลวิคมีหลายโครงสร้าง [15,18] และเมื่อเปรียบเทียบ Retention time สารทั้ง 3 ตัวนี้ มีพีคที่ retention time ตรงกันเพียง 2 พีค คือที่ 2.6 นาที และ 4.1 นาที แต่ที่ retention time ประมาณ 2.6 นาที พื้นที่ใต้พีคมีค่าต่างกันมากและลักษณะของพีคก็แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิงจึงคาดว่าไม่ใช่พีคของกรดฟูลวิค จึงเหลือเพียงพีคที่พบที่ Retention time ประมาณ 4.1 นาที ที่คาดว่าเป็นพีคของกรดฟูลวิค โดยจะใช้ spiking technique ในการตรวจสอบว่าเป็นพีคของกรดฟูลวิค ส่วนพีคของกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry และไม่ผ่านการ spray dry ที่ retention time ประมาณ 6.1 นาที คาดว่าเป็นกรดฟูลวิคที่เป็นโครงสร้างที่

แตกต่างจากที่ retention time 4.1 นาที เพราะลักษณะพีคและ retention time ใกล้เคียงกับพีคที่ retention time 5.9 นาที ของสารมาตรฐานกรดฟูลวิค แต่เกิดการ shift ของพีคจึงปรากฏที่ retention time ไม่เท่ากันกับสารมาตรฐานกรดฟูลวิค

ในส่วนของพีคอื่น ๆ ที่ปรากฏที่คาดว่าไม่ใช่พีคของกรดฟูลวิค อาจจะเป็นพีคของกรดฮิวมิกที่ปนเปื้อนมา จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพีคของกรดฮิวมิกจะปรากฏที่ retention time น้อยกว่ากรดฟูลวิคในโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC [20] และอาจมีกรดอะมิโนปนมา เนื่องจากโพแทสเซียมฮิวเมทของทางบริษัทที่นำมาสกัดมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ



รูปภาพที่ 3.3 โครมาโตแกรม (ก) กรดฟูลวิคที่ไม่ได้ทำการ spike (ข) spiked sample

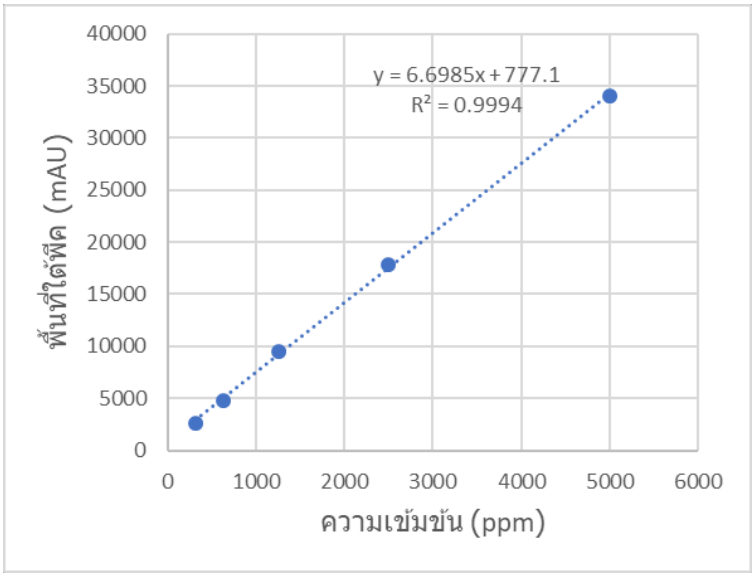
ตารางที่ 3.6 ค่า Retention time พื้นที่ และความสูงของพีค spiked sample (*กรดฟูลวิค)

Peak	RetTime (min)	Area (mAU*s)	Height (mAU)
1	2.180	318	18.927
2	2.838	220	11.638
*3	4.187	19375	486.227
4	6.050	1575	35.644

ตารางที่ 3.7 ค่า Retention time พื้นที่ และความสูงของพีคที่ไม่ได้ทำการ spike (*กรดฟูลวิค)

Peak	RetTime (min)	Area (mAU*s)	Height (mAU)
1	2.361	52	5.788
2	2.674	232	14.194
*3	4.198	4042	99.456
4	6.136	260	5.585

ในการทำ spiking technique ใช้สารตัวอย่างกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry ผสมกับสารมาตรฐานกรดฟูลวิคเพื่อเตรียม spiked sample ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างกรดฟูลวิคที่ผ่านการ spray dry เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าพีคที่ปรากฏ ณ retention time ประมาณ 4.1 นาที พบว่าพีคมีพื้นที่ใต้พีคและความสูงที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเป็นพีคของกรดฟูลวิคที่สกัดได้และยังแสดงให้เห็นอีกว่าสารตัวอย่างที่สกัดมาได้นั้นมีกรดฟูลวิคประกอบอยู่



รูปภาพที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดฟูลวิคและพื้นที่ใต้พีค

สำหรับการนำสารมาตรฐานกรดฟูลวิคที่แตกต่างกัน 5 ความเข้มข้นมาทำ calibration curve โดยแสดงใน **รูปภาพที่ 3.4** จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดฟูลวิค (x) กับความสูงของพีค (y) ดังนี้ y = 6.6985x +777.1 และค่า R^2 = 0.9994 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ายอมรับได้

เมื่อทำการแทนค่าพื้นที่ใต้พีคของพีคที่ retention time ประมาณ 4.1 นาที ที่ตัวแปร y ในสมการเพื่อหาความเข้มข้นของกรดฟูลวิคที่สกัดจากโพแทสเซียมฮิวเมท ได้ดังนี้ สารตัวอย่างกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry และที่ผ่านการ spray dry มีความเข้มข้น 1319.02 ppm และ 616.88 ppm ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณน้ำหนักของกรดฟูลวิคพบว่าในสารตัวอย่างไม่ผ่านการ spray dry มีกรดฟูลวิค 11.87% w/w ของโพแทสเซียมฮิวเมททั้งหมด และสารตัวอย่างผ่านการ spray dry มีกรดฟูลวิค 3.58% w/w ของโพแทสเซียมฮิวเมททั้งหมด จะเห็นได้ว่าทั้งความเข้มข้นและปริมาณของกรดฟูลวิคในสารตัวอย่างที่ผ่านการ spray dry มีค่าต่ำกว่าสารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ spray dry คาดว่าอาจเกิดจากการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการ spray dry ที่สเกลใหญ่ขึ้น อีกทั้งด้วยระยะเวลาของงานวิจัยที่มีอยู่อย่างจำกัดและมีข้อมูลเพียงชุดเดียวสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จึงไม่อาจสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าเพราะเหตุใดจึงมีความเข้มข้นและปริมาณที่ลดน้อยลง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดโพแทสเซียมฮิวเมทเพื่อให้ได้กรดฮิวมิกและกรดฟูลวิคที่บริสุทธิ์โดยวิธี acid-base extraction ในสภาวะที่เหมาะสม และใช้ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตน้อยที่สุด พบว่ากรดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดคือกรดซัลฟิวริก เนื่องจากกรดซัลฟิวริกมีราคาที่ต่ำกว่ากรดไฮโดรคลอริกและยังได้ %การสกัด ของกรดฮิวมิกที่มากกว่า

สารตัวอย่างกรดฟูลวิคที่ไม่ผ่านการ spray dry พบว่ามีกรดฟูลวิคอยู่ 11.87% w/w ของโพแทสเซียมฮิวเมททั้งหมด ในขณะที่สารตัวอย่างที่ผ่านการ spray dry มีกรดฟูลวิคอยู่ 3.58% w/w ของโพแทสเซียมฮิวเมททั้งหมด

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการในการสกัดโพแทสเซียมฮิวเมทเพื่อให้ได้กรดฮิวมิกและกรดฟูลวิค ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจต้องนำไปพัฒนาต่อในการผลิตระดับอุตสากรรมขนาดใหญ่ จึงมีข้อเสนอแนะดังนี้

1) ในการละลายโพแทสเซียมฮิวเมทอาจเปลี่ยนไปใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์แทนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถึงแม้ว่าโซเดียมจะเป็นธาตุที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและเป็นตัวเปลี่ยนโครงสร้างของดิน ถ้ามีโซเดียมปริมาณที่มากก็อาจจะเป็นอันตรายต่อพืช ความเป็นพิษของโซเดียมเป็นอาการที่เห็นได้ชัด โซเดียมจะไปสะสมอยู่ในใบของพืชทำให้เนื้อเยื่อตามขอบใบแห้ง [9] แต่โพแทสเซียมเป็นธาตุอาหารหลักของพืชอยู่แล้วจึงเหมาะสมกว่า

2) ในการละลายโพแทสเซียมฮิวเมทด้วยสารละลายด่างควรค่อย ๆ ใส่โพแทสเซียมฮิวเมทลงไปในสารละลาย เนื่องจากถ้าเทโพแทสเซียมฮิวเมทลงไปครั้งละปริมาณมาก ๆ โพแทสเซียมฮิวเมทจะจับตัวเป็นก้อน เนื้อของสารด้านในจะไม่โดนสารละลายด่าง ทำให้สารละลายด่างละลายโพแทสเซียมฮิวเมทได้ไม่ทั่วถึง และคนยาก โพแทสเซียมฮิวเมทอาจจะละลายได้ไม่ดี

3) ขั้นตอนกำจัดฮิวมินและแยกระหว่างตะกอนที่เป็นกรดฮิวมิกกับสารละลายที่เป็นกรดฟูลวิค การผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่อาจจะต้องใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงขวดเหล้าแนวนอนในการแยก

4) ในการเติมกรดซัลฟิวริกควรระมัดระวังฟองและกลิ่นที่เกิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

[1] Reza Shahryari, Aladdin Gadimov, Elshad Gurbanov, mustafa valizade, application of potassium humate to wheat for organic agriculture in Iran, asian journal of food and agro-industry, 2009, 164-168.

[2] วิวัฒน์ โตธิกุล, พลยุทธ ศุขสมิติ, จินดารัตน์ โตกมลธรรม, การเตรียมสารประกอบเกลือฮิวเมตจากดินปนถ่านหินจากเหมืองลิกไนต์แม่เหมาะ จังหวัดลำปาง, 2552, 17.

[3] Harley Smith, humic or fulvic acid: what kind are your plants on, 2012. Retrieved from. https://www.maximumyield.com/humic-or-fulvic-acid-what-kind-are-your-plants-on/2/1352 (accessed 04.11.20)

[4] Marc, Y. M., the potential environmental impact of waste from cellulosic ethanol production, j air waste management, 2010, 60:2, 245-250.

[5] Jan, B., Qian, K., Lise, A., Raf, D., Yongqin, L., & Tianwei, T., challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol, progress in energy and combustion science, 2015, 47, 60-88.

[6] Morholt, E.; Brandwein, P. F., a sourcebook for the biological sciences, 3rd ed., harcourt brace jovanovich: orlando, 1986, 247–248.

[7] Cintya, A. C., Janaina, P. E., Jorge, E. C., Julia, F. U. M., Carmen, S. F., sugar vinasses, environmental implications of its use. waste management, 2013, 33, 2752-2761.

[8] Ayuso, M., T. Hernandez, V. Garcia and J.A. Pascual, stimulation of barely growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. bioresource technology, 1996, 57, 251–257.

[9] กองวิเคราะห์กรมทรัพยากรธรณี, การพิจารณาคุณภาพน้ำบาดาลเพื่อการเกษตรของโครงการน้ำบาดาลเพื่อพัฒนาทุ่งกุลาร้องไห้ระยะที่ 1, 2545, 8.

[10] Wellesley college, experiment in gene regulation & enzymology, 2009. Retrieved from. https://openwetware.org/wiki/BISC110:_Series_4_Lab_11_Enzymology (accessed 20.11.20)

[11] Cintya, A. C., Janaina, P. E., Jorge, E. C., Julia, F. U. M., Carmen, S. F., sugarcane vinasse: environmental implications of its use, waste management, 2013, 2754.

[12] Teruhito Miyamoto, Koji Kameyama, reduction in saturated and unsaturated hydraulic conductivities of an andisol by vinasse application, soil science society of america journal, 2013, 2.

[13] Liquid energy trading company swiss S.A., condensed molasses solubles/vinasses [PDF file]. Retrieved from. http://www.liquid-energy.ch/wp/wp-content/uploads/A-2-CMS-Vinasses-General-information-EN-LQS-INT2alle-1.pdf (accessed 20.11.20)

[14] Yasair S.S. Al-Faiyz, CPMAS ^{13}C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste, Arabian journal of chemistry, 2012, 2-3.

[15] M. F. Atan, K.A. Mapi, S. N. F. Ghazali, N. Abdul Rahman and S. F. Salleh, utilization of coconut copra as low cost biosorbents for removal of humic substances from peat swamp run-off, journal of advanced research in fluid mechanics and thermal sciences, 2014, 8.

[16] ARAFAT Sayed, YASSEN Abd Elazim, agronomic evaluation of fertilizing efficiency of vinasse, symposium no. 14, 2002, 1992.

[17] John Steven Devia-Orjuela, Christian E Alvarez-Pugliese, Dayana Donneys-Victoria, Nilson Marriaga Cabrales, Luz Edith Barba Ho, Balazs Brém, Anca Sauciuc, Emese Gál, Douglas Espin, Martin Schichtel, Dimitrina Lang, Sebastiano Giardinelli, Maria Briceno, evaluation of press mud, vinasse powder and extraction sludge with ethanol in a pyrolysis process, energies, 2019, 12, 4145.

[18] Saint humicacid, fulvic acid improves fertilizer utilization, 2019. Retrieved from. https://www.humicacid.org/fulvic-acid-improves-fertilizer-utilization/ (accessed 24.11.20)

[19] Prehistoric, sulfer, 2020. https://www.rsc.org/periodic-table/element/16/sulfur (accessed 25.11.20)

[20] F.C. Wu, R.D. Evans, P.J. Dillon, Y.R. Cai, rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters, applied geochemistry, 2007, 1598-1605.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวชัญญา ติ๊บปละ เกิดเมื่อวันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี จังหวัดพิษณุโลก เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 444/162 ตำบลสมอแข อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 อีเมล chanya.viewz@gmail.com